

熱安定性計算に基づいた蛋白質の変性状態の構造予測

●齋藤 稔 ◆岡崎 功

弘前大学理工学部

〈研究の目的と進め方〉

変性状態の立体構造を明らかにすることは、実験的手法のみでは困難である。本研究の特色は、熱安定性の実験結果と申請者が開発してきた高い信頼性の計算機実験を組み合わせることにより、変性状態の立体構造を予測することにある。蛋白質の熱安定性の実験的研究は、蛋白質のあらゆるアミノ酸について網羅的に行われるようになって、実験データは大量にデータベースに蓄積されている。一方、申請者の計算機実験は、フィッティングパラメータを一切用いずに、変性剤による熱安定性の実験結果と良く一致した結果を与えた。

蛋白質は変性剤を加えると変性する(変性剤変性)。温度を上げて変性するが(熱変性)、多くの研究者は変性剤変性と熱変性の蛋白質構造は似ていると想像している。しかし、この想像に反するような結果が我々の熱安定性の計算及び他のグループによる幾つかの実験によってわかり始めている。本研究の目的は、ヒトリゾチームについて、熱変性状態の構造を熱安定性計算に基づいて予測することであった。

齋藤と共同研究者らは、分子動力学シミュレーション/アミノ酸置換/自由エネルギー計算によって求めた熱安定性の計算結果が、変性剤による熱安定性の実験結果に良く一致することを十数個の変異蛋白質について示した。この計算手法では、変性状態として高次構造が完全にほどこけた構造モデル(アミノ酸変異部位を含むペプチド断片)を唯一仮定しているだけである。したがって、変性剤による変性構造として、アミノ酸の鎖が良くほどこけた構造であることを予測したことになる。

一方、熱変性による変性構造は、どのような構造なのか?変性剤変性と同等に、熱変性の変性構造もまた、実験的にはわかっていない。しかし、変性剤変性とは異なり、高次構造が部分的に残っているのではないかと思わせる実験データがある。それをうけて、天然状態の部分構造をそのまま取り出し、変性状態の構造と仮定して熱安定性計算を実施した例もある。しかし、我々は、変性状態の構造として特定の構造を仮定しないことにした。すなわち、高温の分子動力学シミュレーションを長時間行うことによって、天然状態から完全にほどこけた一連の構造を求める。それらの様々な変性構造について、次々に熱安定性計算を実施する。熱安定性の計算結果が、実験値に一致した構造を変性状態の構造とする。この手順を様々なアミノ酸置換部位に対して行う。選択された部分構造を組み合わせることで変性状態の全体構造を構築する。

すなわち、我々の熱安定性の計算手法を逆手に使って「熱安定性から熱変性時の変性状態の構造を予測する」のである。多くの部位に対してアミノ酸置換が行われ、それぞれに対して熱安定性実験(熱変性)が行なわれているヒトリゾチーム蛋白質を対象とした。まず、A) 変性状態の構造モデルを多数作成し、それを変性構造として仮定する。B) 個々の構造モデルについて変異体の熱安定性計算をする。最後に、C) 実験値と一致するモデルを選択し、変異部位周辺の構造を組み合わせることで蛋白質全体の熱変性

構造を構築する。

〈研究開始時の研究計画〉

2002年度の研究の当初計画

- 1) ヒトリゾチーム蛋白質について、変性状態の立体構造の多数の候補を、高温の分子動力学シミュレーションを行って発生させる。
- 2) 立体構造の候補について、アミノ酸置換に対する熱安定性変化を自由エネルギー計算により求め、実験値と比較する。
- 3) 実験値と計算値が一致した立体構造の候補を、アミノ酸置換部位周辺の構造として採用する。様々なアミノ酸置換部位周辺の構造を繋ぎ合わせて、変性状態の全体構造を予測する。

2003年度の研究の当初計画

- 1) 前年度に引き続いて、高温(500K)の分子動力学シミュレーション(0~12.6nsec)から得た多数の構造モデルについて、V100T変異体の熱安定性計算を行う。
- 2) 熱安定性計算の結果について自由エネルギーの成分解析等を詳細に行う。
- 3) 実験値(熱変性)に一致した場合、及びそれ以外の場合で計算結果を総合的に比較し、熱変性時に形成していると考えられる高次構造の特徴を明らかにする。
- 4) 温度400Kで長時間の分子動力学シミュレーションを行い、500Kの構造モデルと比較する。
- 5) 100番以外の変異部位について、V100Tと同様に熱安定性を計算し、高次構造の特徴を調べる。

〈研究期間の成果〉

2002年度の成果

- 1) 高温(500K)の分子動力学シミュレーションを10ナノ秒にもわたる長時間実行した。ヒトリゾチームの変性状態の様々な構造候補を発生させた。この際に、力場パラメータの信頼性の検証も同時に行なった。
- 2) アミノ酸置換(V100T)に対する熱安定性変化を、アミノ酸置換周辺部位からなるペプチド断片を変性状態のモデル構造として計算した。計算結果は、温度変性による実験結果とは異なった。しかし、その後、阪大の高野が行った変性剤変性による実験結果は、計算結果と一致した。したがって、変性状態の構造は、変性剤変性と温度変性とで異なり、変性剤による変性構造は、解けていることが実証された。
- 3) 高温のシミュレーションから得られた変性状態の構造候補の一つについて、熱安定性の計算を行なっている。また、同時に、シミュレーションから得られた多数の変性状態のモデル構造を効率よく抽出するために、シミュレーションで得られた膨大な構造の分類を行なっている。

2003年度の成果

- 1) 前年度と合わせて30個程の構造モデルについて熱安定性計算を行った。
- 2) 各の構造モデルについて、自由エネルギー成分及びア

ミノ酸残基の寄与、変異アミノ酸残基(100番)を中心とする動径分布や溶媒露出面積、アミノ酸の主鎖側鎖の二面角分布、100番と他アミノ酸残基との近接性等の解析を行った。

- 3) 熱変性の実験値(-0.3kcal/mol)に一致した構造モデルは少数であった。これ以外は、変性剤変性の実験値(-1.9kcal/mol)に一致するモデル、及び両者の中間の値を示すモデルを得た。これらの結果と2)の詳細な解析結果をもとに、熱変性構造のV100近傍の特徴を明らかにした。
- 4) 400Kの分子動力学シミュレーションを40.4nsec行った。しかし構造は顕著にほどけることは無く、500Kのシミュレーション時の2~3nsec程度に相当する変性状態のモデル構造を得た。

成果のまとめ

まず、従来と同様に、ヒトリゾチームの完全にほどけたモデル(ペプチド断片)を仮定して、V100T変異体の熱安定性計算を行なった。計算値は、すでに報告されている実験値(熱変性による)と一致しなかった。我々の計算は、むしろ変性剤変性による安定性に一致すると考えた。そこで、高野氏(阪大)に変性剤変性によるV100Tの安定性実験を依頼した。その結果、実験結果は、我々の計算結果に良く一致した。

変性状態の構造モデルを仮定することをせずに、変性状態にいたる様々な構造を、12.6ナノ秒の長時間の高温(500K)の分子動力学シミュレーションを行なって得た。ヒトリゾチームの高次構造が様々なほどけていた構造を得た。

高温シミュレーションから得られた数個の構造について、熱安定性計算を行った。その結果、高次構造が完全に壊れている変性後期の構造は、変性剤使用時の実験値に一致した。また、100番近傍の高次構造がある変性初期の構造は、熱変性の実験値に一致した。従って、100番付近の変性構造は、変性剤変性では高次構造が完全に壊れているのに対して、熱変性ではシミュレーションから得られたと同様の高次構造が存在していることがわかった。

各構造モデルについて、自由エネルギー成分及びアミノ酸残基の寄与、変異アミノ酸残基(100番)を中心とする動径分布や溶媒露出面積、アミノ酸の主鎖側鎖の二面角分布、100番と他アミノ酸残基との近接性等の解析を行った。

国内外での成果の位置づけ

国内外を見渡して、蛋白質の変性構造を研究しているグループは非常に少ない。しかし、FershtとDaggettのグループは、変性構造についての重要な発見を次々に行っている(Nature, 2003年)。Fershtは、フォールディングと熱安定性の実験を長年行ってきた。Daggettは、フォールディングの研究を、高温の分子動力学シミュレーションによって行ってきた。最近、彼女は、熱安定性の計算も始めた。彼らは、我々と競合する強力なグループである。しかし、Daggettの計算は、カットオフに基づいた計算であるために、我々よりも計算精度が劣る。また、彼らは、我々のアプローチ「熱安定性計算から変性構造を明らかにする」の方法では、研究を行っていない。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

ヒトリゾチームの熱変性状態の100番付近の立体構造を予測することができた。この立体構造は、変性剤変性による構造とは大きく異なった特徴を持っていることを明らかにした。したがって、我々の熱安定性計算手法を逆

に使う「熱安定性から熱変性時の変性状態の構造を予測する」という当初の目的は達成したと言える。しかし、100番以外の変異体の熱安定性については、準備的な計算をしたにとどまっている。この理由は、変性状態のモデル構造が、大きく膨れているために、V100T変異体の計算に予想外に多くのCPU時間を消費したためである。この問題を克服するために、その後、シミュレーションのプログラム(COSMOS90)を、最新のスーパーコンピュータにおいて高速化する検討を行った(論文1)。その結果、現在では、十倍近い高速化が達成されている。一方、長時間にわたる高温シミュレーションから、膨大な数の変性構造の候補が得られる。予測計算を効率よく行うために、これらの構造を適切に分類するための構造分類方法が必要になった。現在、その研究も行っている。

今後の課題

我々の研究アプローチでは、アミノ酸置換に伴う自由エネルギー変化の計算を、様々なアミノ酸置換に対して、次々に高速に処理する必要がある。しかし、スーパーコンピュータを含む従来のコンピュータは、そのような計算に対応していない。むしろ、一人のユーザーの1つの計算を高速に処理し、別のユーザーの計算を処理するような仕様になっている。この障害を克服するために、最新のグリッドコンピューティング技術を取り入れた自由エネルギー計算手法の準備に取りかかっている。

研究期間の全成果公表リスト

- 1) 斎藤稔 “地球シミュレータによる蛋白質の大規模シミュレーション：ベクトル化と並列化による加速性能” 情報処理学会論文誌, vol.46, No.SIG7(ACS10), pp.9-17, 2005年
- 2) M.Saito, I.Okazaki, M.Oda, I.Fujii, "A Free Energy Calculation Study of the Effect of H->F Substitution on Binding Affinity in Ligand - Antibody Interactions", J.Comput.Chem.,vol.26, pp.272-282 (2004)
- 3) K.Takano, M.Saito, M.Morikawa, and S.Kanaya, "Mutational and Structural-Based Analyses of the Osmolyte Effect on Protein Stability", J.Biochem. vol.135, pp.701-708 (2004)
- 4) M.Saito, A.Sarai, "Free energy calculations for the relative binding affinity between DNA and λ -repressor." PROTEINS, vol.52, pp.129-136 (2003)
- 5) M.Saito, "Accurate calculations of relative melting temperatures of mutant proteins by molecular dynamics /free energy perturbation methods" in "Structure and function of biological systems under extreme conditions: Pressure and temperature effects", Eds.:Y.Taniguchi, H.E.Stanley, H.Ludwig, Springer-Verlag pp.139-165 (2002)
- 6) 斎藤稔, “第13章 蛋白質の熱安定性の計算ができるまで” “生体系のコンピュータ・シミュレーション”, 編集:岡崎進, 岡本祐幸, 化学同人, pp.149-159, 2002年