

オリゴペプチドのナノセカンドフォールディング

村山真一 西垣功一

埼玉大学 工学部 機能材料工学科

【目的】

タンパク質工学の基礎に「タンパク質フォールディング問題」がある。この問題解決に分子動力学が寄与する可能性があるが、まだ十分に展開されていない現状がある。計算量の限界が横たわっているためである。一方、進化分子工学は実践的にこの問題を解決する一つの有力な方法である。それは実験的に膨大な計算（分子コンピュータの利用）をして求めた結果を踏まえて、フォールディング過程を推定するというアプローチである。結局、どちらのアプローチにしる、有効な法則（それがあるとして）を見つけ出すまでには膨大な計算を覚悟しなければならない。当然ながら、これらの方法を独立に行うだけでなく、折衷したアプローチが考えられる。本研究では、有用ペプチド分子を高速淘汰するための補助的ツールとして分子動力学の導入を試みている。そこでは、最終構造を厳密に求める必要よりも、目的構造（や機能）に合致する、ある程度の可能性を持った分子予備軍を *in silico* で選別することの方が重要になる。このための分子動力学展開は今のところ、我々以外に見られないために、この分野を開拓しつつある。そのために、先ず構造が単純で計算が容易であるのみならず、モジュールとしてタンパク質の構造単位にもなっているペプチドの研究を行っている。

タンパク質は一般的にマイクロ秒からミリ秒の時間スケールでヘリックスやシート等の二次構造形成を終えた後に最終的にフォールディングした(折り畳まれた)構造となる。実験的にこの現象全体を観察することは今のところ実現していない。一方、分子動力学シミュレーションを用いるとこの現象に比較的容易に迫ることができるが、ミリ秒の MD シミュレーションはコンピュータの限界から現実性に乏しい。そこで、オリゴペプチドのナノ秒のシミュレーション観察から最終的なオリゴペプチド安定構造が推定可能かどうかを調べている。CAVE を用いた可視化はこの活動範囲を広げる意味がある。

【方法】

(1)MD シミュレーション

天然構造においてヘリックス構造を形成することが知られている ribonucleaseA の N 末端から 1 ~ 13 残基部分を含む 1 ~ 16 残基 ribonucleaseA-pept.(アミノ酸配列 Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser-Ser) に対して分子動力学プログラム AMBER7 を用いてフォールディングシミュレーションを行った。シミュレーション開始前の初期構造はペプチド平面の二面角である、 ϕ 、 ψ をランダムに回転させ、立体障害がないものを 50 個作成した。力場パラメータは AMBER99 を使い、溶媒モデルは溶媒を関数として取り扱う Generalized Born モデルを採用した。初期構造に対し、エネルギー極小化を行い、その後 300K で 1 ナノ秒の MD シミュレーションを行った。また、一つの構造に対しては 200 ナノ秒までのシミュレーションを行った。計算には Onyx3400 を使用した。また、本研究で用いた 3 次元没入型可視化装置 CAVE は埼玉大学総合情報処理センター設置のものを利用した。

(2)結果の解析

シミュレーション後の解析には Rg(回転半径)、%-stickiness(対象原子同士の接近持続性、Fig.1)を用い、またスナップショットから統計的にヘリックス含量を算出した。1 ナノ秒での結果と 200 ナノ秒での結果を比較した。同時に、CAVE システムにより経時的に動的分子構造を立体可視化しこの時間スケールにおける分子運動を実感した。

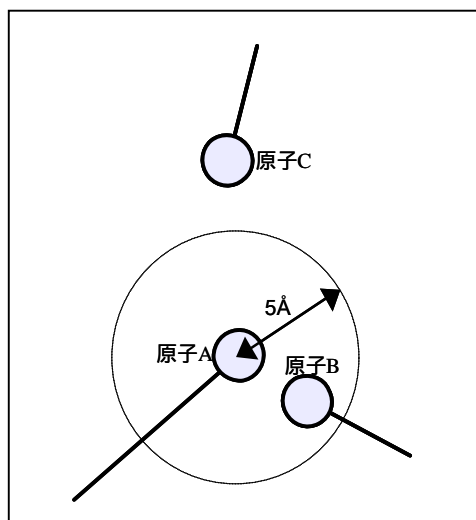


Fig.1 %-stickiness の考え方。左図の場合、原子間距離 5 Å 内に原子 A と原子 B が観測時間内の X%時間存在するときこれらの原子は X%-stickiness なペアとする。既存の結合(水素結合、ファンデアワールス結合他)にとられない広義の結合を表現するものとなる。

【結果】

ribonucleaseA-pept. に関して行った 200 ナノ秒間での ヘリックス含量の時間変化は Fig.2 に示されるとおりであり、10 ナノ秒から 200 ナノ秒に渡って構造に揺らぎが見られるものの全体としてはランダム配列(28.4%)より有意に高い ヘリックス含量になっている(図中の平均で 43.7%)。Fig.3 のスナップショットからも ヘリックス構造(赤の部分)が形成されたり、崩れたりしているおよその様子がわかるが CAVE により一層鮮明に実感された。本研究はオリゴペプチド(16 残基)クラスの分子の構造安定性を見通すために、ナノ秒レベルの時間変化における観測が有効であることを示唆するものとなっている。さらに、この時間スケールでの分子の動きを実感し、他の分子との相互作用を推定するのに CAVE による視覚化は有効であった。

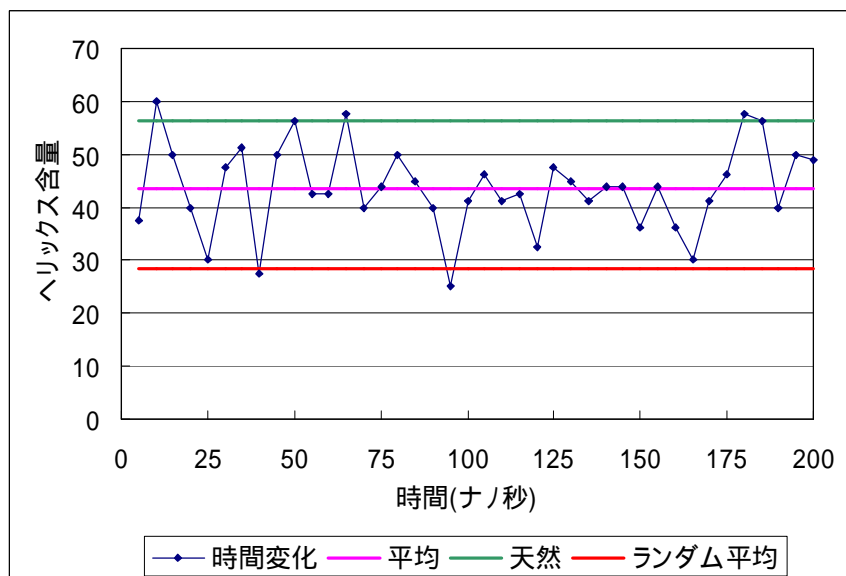


Fig.2 200ns 間の ヘリックス含量の時間変化。平均(43.7%)は 200ns 間の平均値、天然(56.3%)は天然構造において ヘリックスを形成しているペプチドに関して行ったシミュレーションでの ヘリックス含量を表している。またランダム平均(28.4%)はアミノ酸をランダムに並べた配列のシミュレーションを行った結果である。

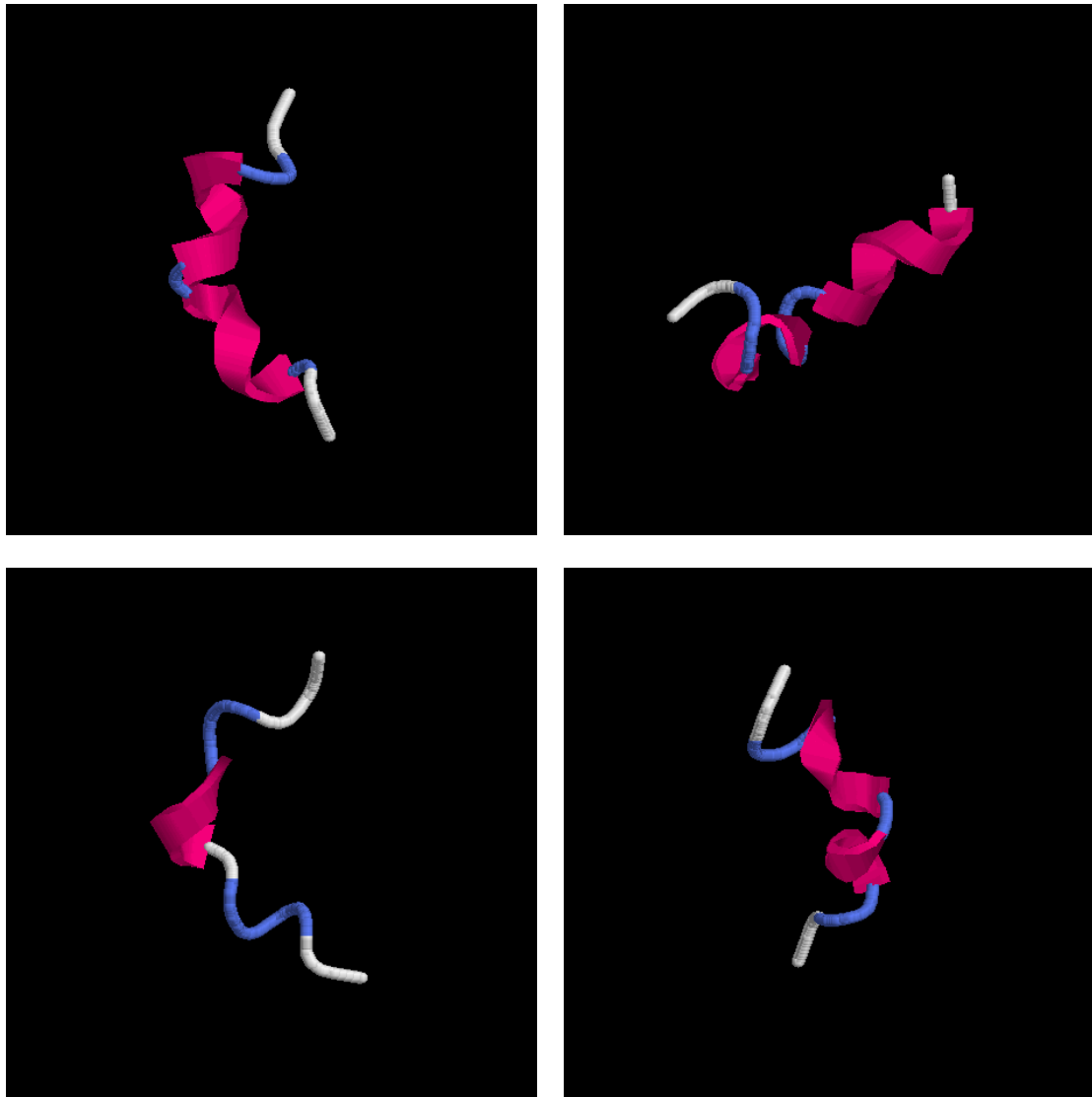


Fig.3 ribonucleaseA-pept.の分子動力学におけるスナップショット。ヘリックスの部分は赤いらせんで見られている。左上から 25ns、50ns、75ns、100ns。出力は RasMol を用いて行った。

【結論】

オリゴペプチドの構造安定性解析にナノ秒レベルでの分子動力学解析が有効で、短時間にもかかわらず実験時間スケール(秒~分)における挙動が推定可能であることが示された。さらに詳細な分子挙動を解析するためのヒントを得る上で(とりわけほかの分子との相互作用の可能性の範囲を推定する上で)CAVE による視覚化は有効であった。

【謝辞】

本研究の機会をご提供いただいた CAVE 研究会(代表幹事 井戸俊治)ならびに CAVE を利用するに際してご指導いただいた(株)ケイ・ジー・ティーの方々に深く感謝いたします。