

## MD シミュレーションによる GFP 変異体のトラジェクトリ解析

黒田研究室

学籍番号 03251033

小林貴幸

### 【研究背景】

現在までの本研究室における GFP をモデルタンパクに用いたトランススプライシング研究で、数残基の置換・挿入が導入されることで GFP 変異体の蛍光強度が著しく低下してしまうという現象が明らかになった。そこで、本研究では分子動力学計算 (Molecular Dynamics Simulation) を用いて導入された変異がタンパク質のダイナミクスにどのような影響を与えるのか計算的に求める。

### 【実験方法】

- 本研究では GFP 変異体のトラジェクトリ解析を行うために野生型 GFP を含んだ 5 種類の GFP (野生型 GFP、GFPUV、置換が導入された GFPUV2 種、残基の挿入をした GFPUV1 種) に対して MD シミュレーションを行う。シミュレーションは専用のハードウェアである MD Engine II ボードを搭載したワークステーションと、ソフトウェアパッケージである AMBER6.0 を用いて行う。シミュレーション条件として定温定圧下 (300K、1atm) でシミュレーション時間は 1200psec、タイムステップは 2fsec に設定する。構造の RMSD が平衡化した、900~1200psec でのトラジェクトリをサンプリングし、これを比較する。

- GFP の発色機構の活性中心である GFP 発色団は、Ser65-Tyr66-Gly67 の 3 つのアミノ酸残基が翻訳後修飾を受けることで形成される。そのために、既存の AMBER 力場には GFP 発色団に対応した力場 (force field) が用意されていない。そこで、Nathalie ら、Nifoshi らのデータを参考に新規に力場を設定した。

- MD シミュレーションによって得られたトラジェクトリを基に各変異体の初期構造からの RMSD 変遷、B-factor などの比較をする。特に変化があらわれると想定される部位は、変異導入部位・またはその近傍の  $\beta$  シートの形成・崩壊などの変化である。さらに、GFP 発色団の周囲の環境の変化についても解析する。

### 【結果・考察】

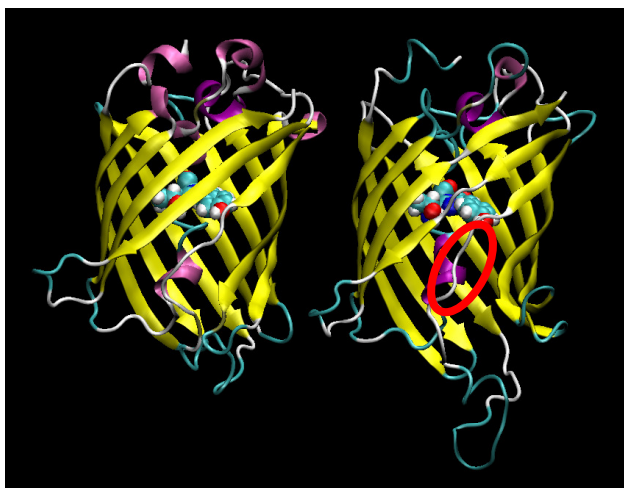
GFP は 11 本の  $\beta$  ストランドが樽上に並んだ  $\beta$  シート構造を持ち、その特異な構造は  $\beta$  バレルと呼ばれる。GFP 発色団はその  $\beta$  バレル構造の中心に位置し、 $\beta$  シートに保護されて外部 (溶媒) からの影響を受けにくい構造をしている。(参照: 図 1)

GFP の  $\beta$  バレル構造は強固で、残基置換のみを行った GFP 変異体では、置換部位前後の  $\beta$  シート構造の水素結合形成に野生型のそれと目立った差は見られなかった。一方で、5 残基の挿入をした GFP 変異体では、挿入部位前後または近傍の  $\beta$  シート構造の崩れが観察された。さらに  $\beta$  シート構造の崩壊の結果、 $\beta$  バレル構造の中に閉じ込められていた水分子がタンパク質外に飛び出てしまう、といった事象も観察された。1ns オーダーのわずかな時間のダイナミクスを観察しただけでこのような事象が起きてしまうことから、実際に水分子が  $\beta$  バレル構造に出入りするということが考えられる。これが蛍光強度の低下の直接の原因と断言することはできないが、かなりの影響を与える要素であると考えられる。

今後の展望として、残基を挿入した GFP 変異体の構造構築方法を変更しての再試験、 $\beta$  バレル構造のダイナミクスに特徴的な差異が見られなかった、残基置換を施した GFP 変異体に対しての量子 MD シミュレーション、最終的に GFP の蛍光強度に影響を与えない変異の導入部位の探索が挙げられる。

↓ 図 1: GFPUV (左) と GFPUV 挿入モデル (右)

: 右の赤丸で囲まれた部分が変異 (挿入) が導入された部位中央の VDW で表示している部位が GFP 発色団



↓ 図 2: 野生型 GFP 発色団周辺の  
水素結合ネットワーク

