

1 および 2 残基置換による熱安定化 BPTI 変異体の分子動力学シミュレーション解析		
黒田研究室	学籍番号：06251057	馬場美香

### [ 背景・目的 ]

タンパク質の熱安定性は、アミノ酸配列情報と立体構造により決まる。しかし立体構造の第一原理からの予測は難しく、タンパク質の安定化に関するポテンシャルの理解は未だに発展途上である。従って、アミノ酸配列中でのどの残基が安定化に特に寄与しているのかを理論計算から解明することは重要である。本研究では、構造や運動性に局所的でわずかな影響しか与えない1および2残基置換による熱安性の変化を理論計算によって評価できると考え、全 58 残基から成る BPTI-[5,55]Ala タンパク質の 4 つの変異体の分子動力学シミュレーションを行った。

[5,55]Ala: ...TGP<sup>14</sup>AKARII...TFVYGG<sup>38</sup>ARAK...  
 A14G: ...TGP<sup>14</sup>GKARII...TFVYGG<sup>38</sup>ARAK...  
 A38V: ...TGP<sup>14</sup>AKARII...TFVYGG<sup>38</sup>VRAK...  
 A14GA38V: ...TGP<sup>14</sup>GKARII...TFVYGG<sup>38</sup>VRAK...



図 1 : BPTI 変異体の配列及び構造。

	T <sub>m</sub> (K)	ΔHT <sub>m</sub> (kJ/mol)
[5,55]Ala	312.40	152.22
A14G	325.41	218.44
A38V	316.77	146.71
A14GA38V	326.03	226.75

### [ 手法 ]

本研究ではシミュレーション結果と実験的に求められた熱安定性の関係を以下のように調べた。解析に用いた 4 種類の変異体は、BPTI-[5,55]Ala のほか、14 番目、38 番目残基をそれぞれ Gly、Val に置換し変性温度 ( $T_m$ ) が 13°C 近く上昇した A14GA38V 変異体、ほぼ同様の熱安定化を示す 14 番目のみを置換した A14G 変異体、38 番目のみを置換しわずかに安定化した A38V 変異体である (表 1)。さらに初期構造作成に 3 種類の BPTI 結晶構造を用いた。A14G、A14GA38V 変異体二つの結晶構造を用いたものを **Original** とし、その他に Protein Data Bank に登録されている結晶構造から選んだ 2 種類を **5PTI**、**7PTI** とし、3 種類の構造モデルそれぞれにつき 4 つの変異体を作成した (計 12 個)。計算には分子動力学シミュレーションソフトウェア Amber9.0 を用い、理化学研究所の MD-GRAPE3 上にて 300K の温度で 150 ナノ秒間行った。

表 1 : pH4.7 で実験的に求められた熱力学パラメータ

### [ 結果・考察 ]

解析の結果、14 残基目を含むループ部分と 38 残基目を含むループ部分において局所的な構造の違いが見られ、βシートおよびヘリックス部分には変異体間で大きな差異は見られなかった。14 番目と 38 番目の C $\alpha$  原子間距離の分布を取ると、A14G と A14GA38V 変異体では 6.5 ~ 7 Å を中心とした値に集中する傾向にあった (図 2)。また、この距離が 5.0 Å 近くまで狭くなるような構造が存在した (図 2 : 分布の左肩)。一方 [5,55]Ala および A38V 変異体ではこの距離の分布は初期構造に依存していたが、どの初期構造でも距離は多くの場合広い値まで分散し、5 Å まで狭くなるものはあまり見られなかった (図 3)。これらのことから、14 番目に Gly を入れることにより残基の立体障害が緩和され分子間相互作用が強まり、二つのループがより近づいた形で固定されやすくなる結果、安定化することが推察できる。また、**Original**、**5PTI**、**7PTI** の 3 種類の結晶構造において主鎖構造の一致度を表す RMSD 値(Root mean square deviation)が 0.5 Å 程度とほとんど変わらないにも関わらず、変異体によっては計算結果の初期構造依存性が見られた。このことから、構造への影響が小さいと推定した 1 および 2 残基の変異による安定性の変化の評価であっても、広いエネルギー空間における遷移を可能とする十分なサンプリングを行う必要性が強く示唆された。

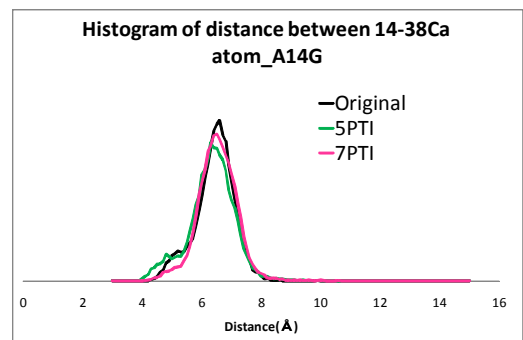


図 2

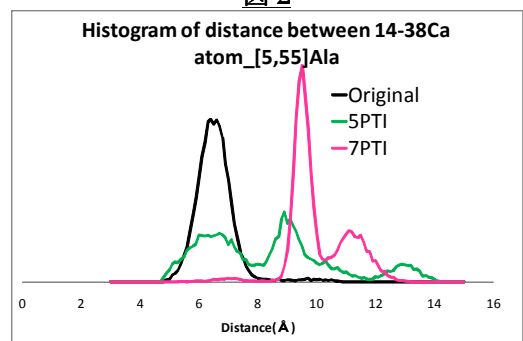


図 3