

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658186

研究課題名(和文) 分子シミュレーションによる魚介類タンパク質の不安定性の解明

研究課題名(英文) Instability of proteins from aquatic animals as revealed by molecular dynamics simulation

研究代表者

落合 芳博(Ochiai, Yoshihiro)

東海大学・海洋学部・教授

研究者番号：50160891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：魚介類由来の代表的なタンパク質(トロポミオシン、ミオグロビン、ミオシン)につき、構造の不安定性について分子動力学シミュレーションを用いて検討した。温度や圧力を变化させた時の構造揺らぎを推定し、種特異的な安定性の違い、同一タンパク質分子内における揺らぎの程度などについて詳細に調べた。巨大分子のミオシンを除くタンパク質については、不安定性に関わる分子内の領域を特定することができた。特にトロポミオシンでは、分子の屈曲に及ぼすアミノ酸置換の影響について新たな知見を得ることができ、一方、ミオグロビンについては、広範囲の温度帯や圧力条件下における構造揺らぎの程度を詳しく解析できた。

研究成果の概要(英文)：Molecular dynamics simulation was applied to the mechanism of instability of proteins (namely, tropomyosin, myoglobin and myosin) from some aquatic organisms. The extent of structural fluctuations under varied temperature and pressured conditions were examined in detail. Regarding the two proteins except myosin, the regions responsible for the instability could be identified. Especially in case of tropomyosin, the effects of amino acid substitutions on the bends in the molecule could be addressed. On the other hand, in the case of myoglobin, the detailed study revealed the extent of fluctuation under the wide range of temperature and pressured conditions, which might be a possible factor for the molecular adaptation of each animal species to the respective habitat.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水圏生命科学

キーワード：タンパク質 構造揺らぎ 不安定性 魚介類 分子シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

水圏生物由来のタンパク質は一般に不安定であり、貯蔵、加工時において変性しやすいため、有効利用上の大きな障害となっている。この不安定性の解明に向けて数多くの試みがなされてきたが、分子レベルでの説明は十分になされていない。それぞれのタンパク質がとる立体構造は生体機能と密接に関連していること知られているが、水圏生物は高温、低温、高圧など極限状態に生息するものが少なくなく、不利な環境を補償するために各タンパク質は適応の過程で安定性と機能性の絶妙なバランスを獲得してきた。しかし、その機構については、これまでの膨大な研究にもかかわらず不明の点が数多く残されている。その主たる原因は、タンパク質の著しい不安定性と生化学的アプローチの限界にあると考えられた。

水圏生物の生息水温（または体温）とタンパク質の不安定性との間には一定の相関関係があるとされる。本課題では、その関係のさらなる解明を目的として、分子動力学的手法による分子シミュレーションを駆使し、魚介類の筋肉タンパク質の立体構造とその「構造ゆらぎ」の大きさが生体内および死後等においてどのように変化するかを視覚的に示すことにより、タンパク質の不安定性の原因と安定化条件を究明することを考えた。ミオグロビンやミオシンなど、筋肉の特徴を決定づける主要タンパク質成分を対象に、旧来の生化学的手法では迫れなかった水圏生物タンパク質の「素顔」を明らかにすることにした。

生化学的な実験では、組織から目的タンパク質を抽出し、精製した後に性状を調べることが常套手段である。しかし、精製の過程においてさえタンパク質の立体構造は徐々に崩壊し、本来の性質は失われてしまう。時々刻々と変化する構造揺らぎを結晶構造から推定することは不可能である。そこで本研究

では、生息環境下における構造、死後あるいは貯蔵、加工中における変性や構造崩壊のパターンを可視化（コンピュータ上で映像化）することを目標とした。

水圏生物由来のタンパク質が示す不安定性は、貯蔵・加工時の大きな障害である。特に、変性や分解は有効利用上のボトルネックである。魚介類由来タンパク質の不安定は主として、酵素活性や種々の不安定性の指標（プロテアーゼ消化性、加温による濁度上昇など）の測定など、間接的な証拠を基に確立されてきた。近年、タンパク質の不安定性をアミノ酸配列の相違に基づいて検討する試みが多くなされたが、安定性に関わるアミノ酸残基の特定に成功した事例は散見されるものの、魚介類由来のタンパク質の不安定性に関しては、依然として明確な説明がなされていない。近年、生物学、生化学などの分野でもコンピュータを用いた計算科学、情報科学の重要性が認知されている。このような背景の下、本研究は、タンパク質の立体構造がもつ「揺らぎ」などの不安定性情報を分子動力学シミュレーションによって明らかにしようとするものである。

## 2. 研究の目的

水圏生物タンパク質の構造研究に関するシミュレーション研究例がほぼ皆無であることから、まず、比較的精密な結晶構造が得られているトロポミオシン、ミオグロビンおよびミオシン断片(S1)について検討する。これらのタンパク質の結晶構造を鋳型としてシミュレーションを行うことで、球状および繊維状タンパク質の特性が解明される。本法により、試験管内の実験では再現できない各種の条件（温度、pH、圧力）におけるタンパク質分子の挙動を追跡することができる。

生物の組織からタンパク質を抽出した時点や捕獲時に生物が暴れたり、死亡した

時点から、構成タンパク質の構造変化は始まっていると考えられる。したがって、可及的高鮮度の試料を用いたとしても、生化学的アプローチでは各タンパク質の自然状態の性状には迫れない。タンパク質分子は概して小さく、電子顕微鏡によってもその姿を明確には捉えられない。しかし、タンパク質など高分子物質も例外なく物理的法則に従いつつ構造を形成し機能することが知られている。その点、分子力学的手法は、分子を構成するすべての原子について運動方程式を計算し、位置やエネルギー等の時間変化を追跡できるため、特定の分子について、いかなる条件における構造についても予測が可能であるため、水圏生物タンパク質の構造研究に最も適した手法の一つである。試験管内実験ではわからない極めて短時間に起こる変化や、再現できないさまざまな環境下（例えば、超低温や高圧下）でも構造予測が可能であり、しかも結果を視覚的に捕らえることを特長とする。本研究では、従来の遺伝子やタンパク質の配列情報からは説明できなかった水圏生物タンパク質の不安定性を分子シミュレーションにより解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

構造計算には専用プログラム AMBER 11 を用いた。トロポミオシンのカルボキシ末端側断片(アミノ酸配列が魚類のものとはほぼ同一)については Protein Data Bank (PDB) ID: 2D3E の原子配置情報を用いる。計算に先立ち、対象タンパク質の電荷調整のため、ソフトウェア PROPKA を用いて各ヒスチジン残基の  $pK_a$  値を求めておき、さらに、分子間で架橋を形成する可能性のあるシステイン残基のデータを削除するなど、PDB ファイルデータを適宜編集した。分子表面の各方向に一定厚以上の水の層

ができるように、水分子を適切な数だけ加入した。構造ねじれを避けるため、エネルギー最小化を行い、溶媒の平衡化を 27°C (300 K)においてシミュレーションを行った。温度、pH などの条件を段階的に変化させ、100 段階の計算毎にデータを取り込みながら連続的に構造変化の予測を行った。

ミオグロビンについては、蛋白質構造データベース (PDB) から得た各タンパク質の構造情報について、同様にファイル情報の編集を行った。原子配置については、詳細な情報が得られるタイセイヨウマダロ・ミオグロビンの PDB データを活用した。構造情報の無い生物種のものについては、構造情報にアミノ酸置換を付加した上で検討を加えた。高圧条件下における構造変化についても計算を行った。

ホタテガイ貝柱筋のミオシン S1 は複雑な立体構造をとるため、高速度計算が必要となる。すなわち、ソフトウェア Visual Molecular Dynamics (VMD) を利用して、原子配置を示したトポロジーファイルや座標ファイルにより分子運動を可視化して、時系列的な変化を追跡した。対象系全体のエネルギー最小化計算を行うとともに、溶媒および系全体の平衡化計算を行った後、上記の VMD により可視化を試みた。分子数、体積、エネルギーを一定にした条件下で、温度のみを上げた場合の計算を実行し、計算結果を可視化することによってタンパク質の高次構造が崩壊していく過程を明らかにすることを試みた。

### 4. 研究成果

筋収縮調節タンパク質の一つ、トロポミオシンについては PDB: 2D3E (C末端側断片) を鋳型とし、0.1 M KCl、300 Kにおいて分子力学シミュレーションを行なった。コイルドコイル半径およびアミノ酸側鎖の曲がり角を

指標に、分子の局所的な固さ、および柔らかさや揺らぎについて検討した。その結果、魚類トロポミオシンで見られる特定のアミノ酸置換が不安定性の発現に関与していることが示唆された。

次に、ヘムタンパク質の一つ、ミオグロビンについては $-80\sim 37^{\circ}\text{C}$ において100ナノ秒間(ns)実施した。マグロ *Thunnus atlanticus* (PDB ID: 2NRL)、クジラ *Physeter catodon* (同1U7R) およびアメフラシ *Aplysia limacina* (同1MBA) 由来のミオグロビンの結晶構造を鋳型に、分子表面の水の層を7 Åとし、ff99SB力場における周期境界条件下、グロビンの部分について計算を実施した。His残基の電離状態についてはデータを編集し、中性付近における構造ゆらぎについて検討した。根平均二乗偏差(RMSD)および根平均二乗ゆらぎ(RMSF)を指標として、構造変化を予測した。マグロ・ミオグロビンのRMSD値の経時変化を図1に示す。上記3種のミオグロビンは明らかに異なる挙動を示し、温度安定性や分子内の領域別安定性が異なることが示された。

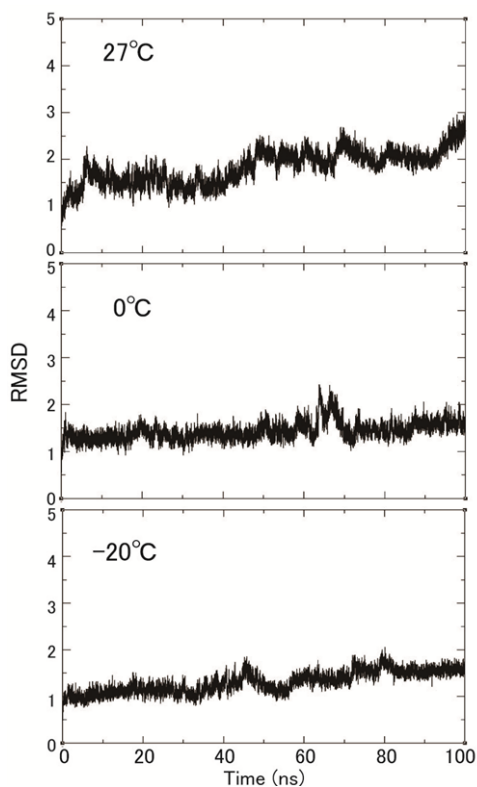


図1. マグロ・ミオグロビンのRMSD値の温度依存的な変化。

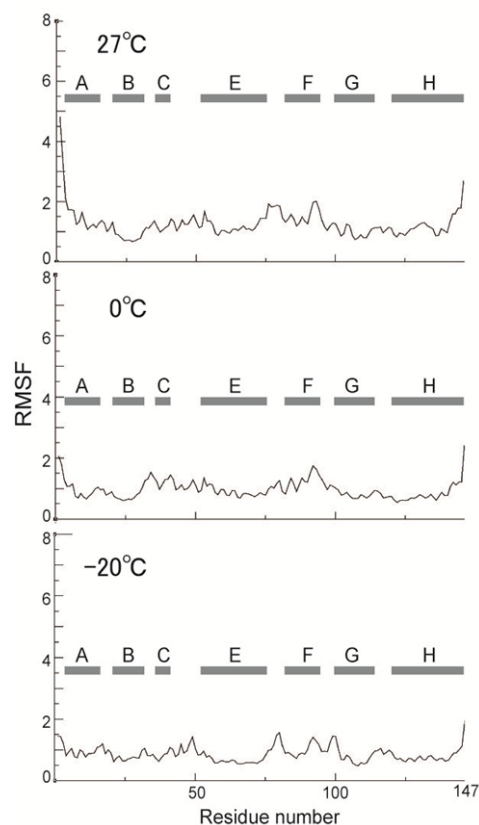


図2. マグロ・ミオグロビンのRMSF値に及ぼす温度の影響。A~Hはヘリックス領域を示す。横軸はN末端からの残基番号。

いずれもN末端およびその周辺の構造が不安定であり、ヘリックスをつなぐループ部分の揺らぎが大きく、温度低下に伴って揺らぎが減少する傾向が認められた。マグロ・ミオグロビンのRMSF値の温度依存性を図2に示す。一方、本タンパク質の構造揺らぎに及ぼす圧力の影響について調べたところ、生物種により明確に異なり、深海適応している種のタンパク質では、その影響が比較的小さいことが示唆された。

一方、ミオシンについては、分子の大きさによる計算量の膨大さがシミュレーションのネックとなり、構造揺らぎの解析には至らなかった。本タンパク質の構造解析にはスーパーコンピュータなど、高速演算が可能な計算機が必要であり、今後の課題としたい。

以上のように、分子動力学シミュレーションによって、水圏生物由来タンパク質の構造

の特性、特に揺らぎの温度依存性の一端が詳細に明らかにされた。これらの成果は、タンパク質の不安定性を理解する上で、大きな一助となるものと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

落合芳博: ミオグロビン—基礎から応用まで. 冷凍, 87, 341-347 (2012).

[学会発表] (計 6 件)

1. Y. Ochiai: MD simulation of the structural fluctuations of sea hare *Aplysia limacina* myoglobin. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2012年7月13日, カルポート(高知).
2. 落合芳博: 水産分野における分子シミュレーションの有用性. 日本水産学会中部支部大会, 2012年12月8日, アスト津(津市).
3. Y. Ochiai: Simulation of the Thermal-stability differences of myoglobins from aquatic animals. Asian Biophysics Association. 2013年5月27日, Ramada Plaza, Jeju (韓国).
4. H. Ozawa, Y. Ochiai, K. Umezawa, S. Ishiwata, M. Takano: Analysis of flexibility and curvature of tropomyosin by molecular dynamics simulation. 日本生物物理学会年会, 2013年10月29日, 京都国際会館.
5. 小澤秀夫、梅澤公二、高野光則、石渡信一、渡部終五、落合芳博: 分子シミュレーションを用いた筋肉トロポミオシン断片の局所構造解析. 日本水産学会秋季大会, 2013年9月21日, 三重大学生物資源学部.
6. Y. Ochiai, H. Ozawa: Strategies of acclimation to deep sea: Structure simulation of myoglobin molecules from aquatic animals under high pressure. 10<sup>th</sup> International Marine Biotechnology Conference, 2013年11月12日, Brisbane Convention & Exhibition Centre, Australia.

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合芳博 (東海大学・海洋学部・教授)

研究者番号: 50160891