

明示的に水を取り扱った分子動力学シミュレーションの変異体の計算に対する有用性の検討. Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor を用いた試験

小林 佳奈,* 小田 彰史, 高橋 央宜

Evaluation of Molecular Dynamics Simulation with Explicit Solvent Using Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor

Kana KOBAYASHI,* Akifumi ODA, and Ohgi TAKAHASHI

(Received November 20, 2010)

Computational simulations can reproduce or predict structural changes of proteins upon various mutations in a short time. In this study, molecular dynamics simulations of the wild type and mutants of bovine pancreatic trypsin inhibitor with explicit solvent were carried out to evaluate reliability of molecular dynamics simulation. We used two force fields, ff03 and ff99SB, and compared the results. Effects of the amino acid mutations on structural stability were largely reproduced by the simulations.

Key words — explicit solvent, molecular dynamics, bovine pancreatic trypsin inhibitor, force field, mutant

体内における薬物の代謝, 薬効, 副作用の発現などには個人差が生じることが知られており, その原因の1つにタンパク質の変異体が関与していることが考えられる.¹⁾ そのため, タンパク質の一部に変異が生じたときにタンパク質全体の構造がどのように変化するか, また, 変異体の性質や変異体の及ぼす影響はどのようなものかなどを考慮することが重要である. その際に, 計算機を用いたシミュレーションを行うことにより, 実際に起こりうる変化を短時間で予測することができる. 本研究では分子動力学 (Molecular Dynamics, MD) 法に基づくシミュレーションを行った. MDシミュレーションは, 計算機を用いて原子や分子1つ1つに対してニュートンの運動方程式を数値的に解き, 位置, 速度, エネルギーなどの時間変化を追跡する手法である.²⁾ このMDシミュレーションの信頼性を評価するため, bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) を用いて解析を試みた.

BPTIはウシ膵臓由来のトリプシン阻害剤である. これまでに, BPTIのアミノ酸配列の一部を変異させた変異体について, 安定性が多く報告されている.^{3,4)} BPTIは57残基からなるタンパク質で, Cys5-Cys55, Cys14-Cys38, Cys30-Cys51の3カ所にジスルフィド結合を有している. これまでの研究から, この3つのジスルフィド結合のうちCys5-Cys55がBPTIの立体構造形成に重要であることが示唆されている.⁵⁾ このCys5-Cys55間のジ

スルフィド結合があれば, 他のシステインを変異させてもBPTIの立体構造が保たれる. 一方で, システイン以外の残基を変異させた場合でもBPTIの立体構造が失われる例が報告されており,^{3,6)} BPTIは残基の変異が立体構造に影響を与える顕著な例となっている. そのため, BPTIの変異体に対する分子シミュレーションはBPTIの構造的特徴を解明するだけでなく, シミュレーション手法が残基の変異による影響を正しく評価できるかどうかのテストとしても重要である. 近年, 創薬においても遺伝多型による薬物代謝酵素等の変異が重要なトピックスとなっており, これを計算機シミュレーションによって正しく評価することは, 副作用の軽減などの面において非常に重要である.

MDシミュレーションを行う際, 計算対象とするタンパク質に及ぼす溶媒効果を扱う方法には, 溶媒分子をあらわに取り扱う explicit solvent 条件と, 平均的な溶媒環境をパラメータとして近似的に取り扱う implicit solvent 条件がある.⁷⁾ 以前, 我々が行った implicit solvent 条件におけるBPTIを用いたBrownian 動力学シミュレーションおよびMDシミュレーションでは, 実験で得られている立体構造の変化をおおむね再現できていた.⁸⁾

本研究では explicit solvent 条件において, MDシミュレーションが変異体のシミュレーションに対して用いることができるかどうかを検討した. また, 用いる力場の違いによる計算結果の違いにも注目した.

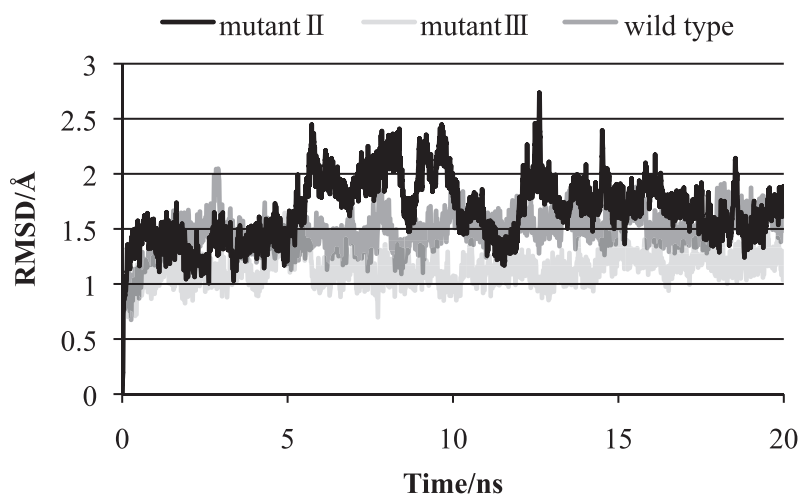
方 法

本研究では、野生型および変異型のBPTIについてMDシミュレーションを行った。BPTIの立体構造は、PROTEIN DATA BANK⁹⁾に登録されている実験的に解明された構造を用いた (PDB ID:

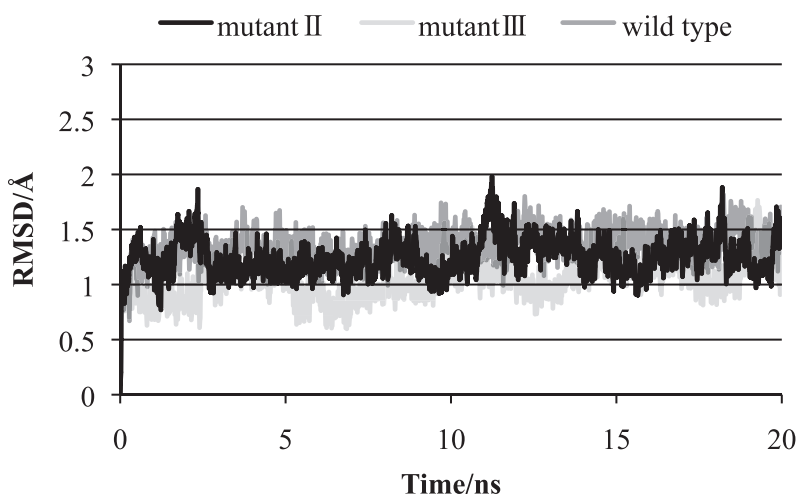
6pti)。使用した変異体を Table 1 に示す。変異体の立体構造は、ジスルフィド結合を切断するためにアミノ酸の側鎖を削除しアラニンに置き換えることにより、人工的に作成した。さらに、実験で得られている変異体の構造安定性も同時に示しており、melting point が 300 K 以上である変異体を “stable” と表記している。

Table 1. Numbering and stability of the wild type and mutants of BPTI used in this study.

| number | mutations | stability |
|--------|-----------------------------------|-----------|
| I | wild type | stable |
| II | C5A, C14A, C30A, C38A, C51A, C55A | instable |
| III | C14A, C30A, C38A, C51A | stable |
| IV | C30A, C51A | stable |
| V | C14A, C30A, Y35A, C38A, C51A | stable |
| VI | C14A, Y23A, C30A, C38A, C51A | instable |
| VII | C14A, C30A, F33A, C38A, C51A | instable |



a) RMSDs with ff03 force field

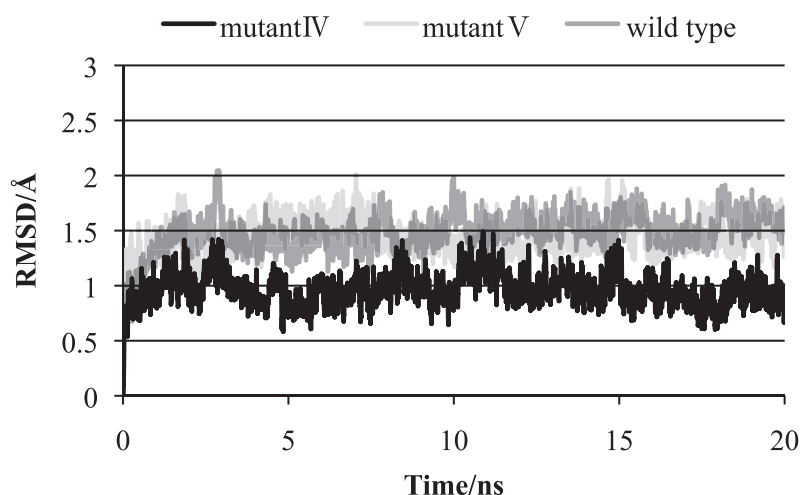


b) RMSDs with ff99SB force field

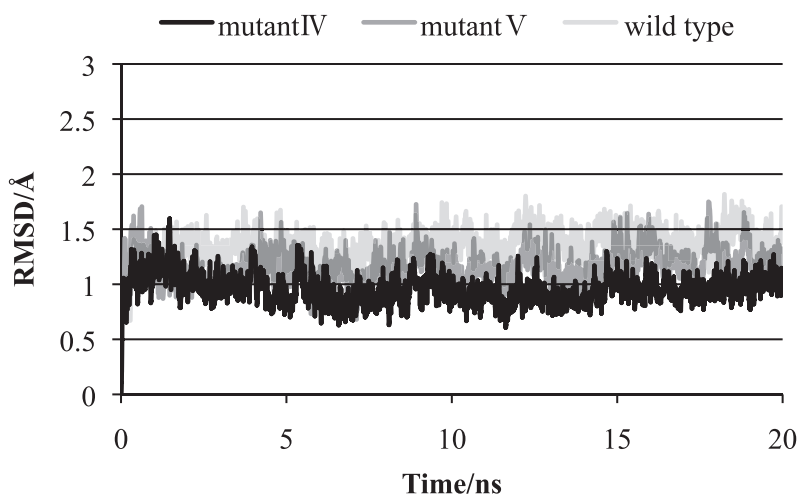
Fig. 1. RMSDs of for the main chains of the wild type, mutant II, and mutant III.

はじめに, 上記の BPTI の立体構造から水分子とリン酸を取り除いた. 得られたこの立体構造に対し, 構造最適化および MD シミュレーションを行った. このとき, 基本セルと同じ構成の分子を持ったイメージセルを周期的に配置する, 周期境界条件を用いて計算を行った. また, cutoff 距離は 10 \AA とし, さらに, 長距離に及ぶ静電相互作用を考慮するために Particle Mesh Eward 法¹⁰⁾ を使用した. そして, タンパク質の表面から 8 \AA の幅を確保した上で水を配置し, 全体の電荷を中和するためのカウンターイオンには Cl^- を用いた. explicit solvent 条件における計算を行うため, 水をあらわに取り扱う TIP3P¹¹⁾ を用いて溶媒和した. TIP3P は水分子を酸素原子 1 個, 水素原子 2 個で表す 3 点モデルであり, 各原子上に電荷を配置している.

力場は AMBER 力場の ff03 力場^{12,13)} と ff99SB 力場¹⁴⁾ の 2 種類を使用し, 比較検討を行った. ff99SB 力場は ff99 力場¹⁵⁾ の改良版である. ff99 力場は現在のところ生体高分子の計算に広く使用されている力場であり, それまでの ff94 力場¹⁶⁾ では扱いの不十分だった二面角のパラメータに修正を加えている. また, ff94 力場と同じ式を用いて計算するため, トポロジー等については互換性を保っている. しかし, 一方で ff99 力場はヘリックス構造と β 構造との間の配座変化に必要なエネルギーを正確に算出することができず, また, グリシン関連のパラメータに不備が存在することが知られている. そこで, Simmerling らによって ff99 力場に改良が加えられ ff99SB 力場が開発された. これは, 二面角の力場パラメータを量子化学計算を用いて再



a) RMSDs with ff03 force field



b) RMSDs with ff99SB force field

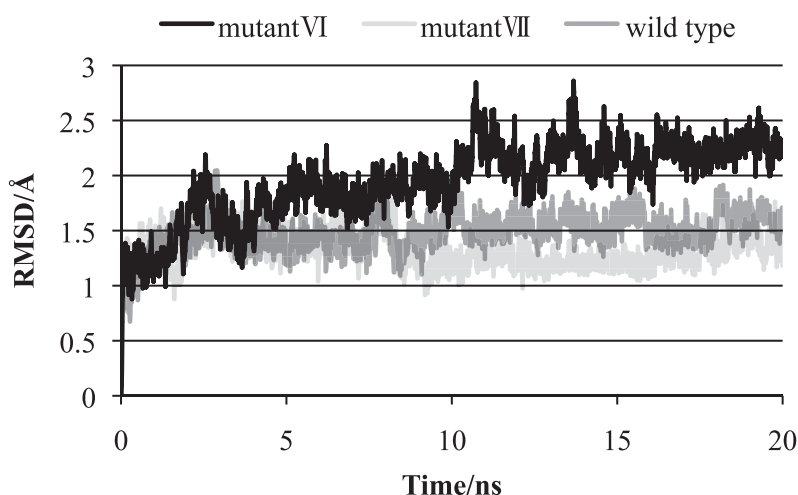
Fig. 2. RMSDs of for the main chains of the wild type, mutant IV, and mutant VII.

パラメータ化し、2次構造の出現頻度が妥当な値になるように調整した力場である。一方の ff03 力場も ff99SB 力場の改良であるが、こちらについては、量子化学計算によって原子電荷を算出する際に implicit solvent を使用し、この段階から溶媒効果を取り込んだ点が特徴である。また、主鎖の二面角のパラメータにも改良を加え、ff99 のヘリックスを過剰に取りやすい傾向を修正している。

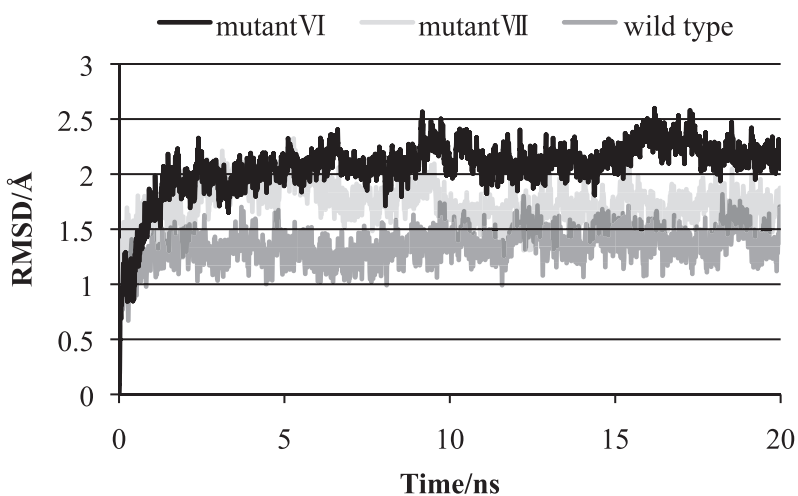
まず、0 K から 300 K まで温度を上げるシミュレーションを行い、その後 300 K の平衡状態において定圧下シミュレーションを行った。昇温時には 1.0 fs のタイムステップで計 20 ps のシミュレーションを、また、平衡状態では 1.0 fs のタイムステップで計 20 ns (20000 ps) のシミュレーションを行った。これらの計算には全て AMBER9¹⁷⁾ を使用した。

結 果

野生型 I と変異体 II, III について、MD シミュレーションを行ったときの主鎖の root mean square deviation (RMSD) の変化を、ff03 力場と ff99SB 力場にわけて Fig. 1 に示す。まず、ff03 力場において、野生型 I と、全てのジスルフィド結合を切断した変異体 II の結果を比較する。野生型 I では初期構造との RMSD がおよそ 1.5 Å であるのに対し、変異体 II では 6 ns から 10 ns まで 2.0 Å 程度の RMSD 値を示し、野生型 I よりも大きい値である。また、10 ns 以降では野生型 I と同程度の RMSD 値を示しているものの、2.5 Å を超える値もあるため、構造が壊れていることが示唆される。



a) RMSDs with ff03 force field



b) RMSDs with ff99SB force field

Fig. 3. RMSDs of for the main chains of the wild type, mutant VI, and mutant VII.

これは変異体 II が立体構造を保持する上で不安定であるという実験結果と一致している。一方、ff99SB 力場において、変異体 II は野生型 I と同程度の RMSD 値を示しているため構造が壊れているとはいえず、立体構造を保持する上で不安定であるという実験結果を再現できていない。また、変異体 III については、ff03 力場、ff99SB 力場とも RMSD は 1.0 Å 程度を示しており、初期構造からあまり離れていないことがわかる。従って、どちらの力場でも変異体 III が安定構造を示すという実験結果と一致しているといえる。

次に、ff03 力場と ff99SB 力場における変異体 IV, V の RMSD の変化を Fig. 2 に示す。比較のために野生型 I の結果も再度示している。変異体 IV, V では ff03 力場、ff99SB 力場ともに RMSD 値は 1.0~1.5 Å 程度を示しているため初期構造からあまり離れておらず、実験で得られている安定構造を示すという結果と一致している。これは、MD シミュレーションが BPTI の安定性を評価しうる可能性を示唆している。また、用いた力場で大きな差は見られなかった。

最後に、ff03 力場と ff99SB 力場における不安定変異体 VI, VII の RMSD の変化を Fig. 3 に示す。Fig. 2 同様、比較のために野生型 I の結果も再度示している。まず、ff03 力場では変異体 VI が野生型 I とはかけ離れた挙動を示しており、変異体 VI の構造が壊れていることが示唆される。しかし、変異体 VII では野生型 I とあまり変わらない RMSD 値を示しているため、初期構造から大きな変化がないものと思われる。これは、変異体 VII が立体構造を保持する上で不安定である実験結果とは異なった結果となっている。一方、ff99SB 力場においては、変異体 VI は 2.0 Å 程度あるいはそれ以上の RMSD 値を示し、変異体の構造が壊れていることがわかる。しかし、変異体 VII では、10 ns までは RMSD 値が大きくなっているものの、10 ns 以降は野生型とほぼ同じ挙動を示していた。

考 察

変異体 VI を例にとると ff03 力場では約 4 ns 以降、また、ff99SB 力場では約 2 ns 以降で初期構造から大きく離れている。このことから、MD シミュレーションは計算時間が短すぎると高い信頼性を得ることができないと考えられる。一般に、

explicit solvent を使用した場合は、計算時間をはじめとしたコンピュータ資源を多く必要とするため、数 ns 程度で MD シミュレーションを終了させることが多い。側鎖の変化などの微小な変化については、そのようなシミュレーションであっても妥当な結果が得られる可能性があるが、本研究のように残基変異に伴った立体構造の変化など、主鎖も関係した構造変化のシミュレーションを行う場合には、十分に長い時間のシミュレーションが必須であることが示唆されている。本研究では 20 ns までシミュレーションを実行したが、不安定な構造をとる変異体では 10 ns までに構造が壊れていた。従って、信頼性の高いシミュレーションを行うためには、10 ns 程度の計算を実行することが望ましいと考えられる。

また、変異体 VII は implicit solvent 条件下で行ったシミュレーションでも正しく安定性を評価できていない。前述のように、ff99 力場はヘリックス構造を過剰に取る傾向があることが知られており、改良版の ff03 力場、ff99SB 力場でも同様の傾向が残っているのかもしれない。それが、変異体 VII の結果に影響を与えた可能性がある。一方で変異体 II については、ff99SB 力場では変異の効果が再現できていないのに対して、ff03 力場では変異の影響を正しく再現することができた。ff03 力場、ff99SB 力場ともに ff99 力場に修正を加えているが、ff99SB 力場に比べて ff03 力場の方が大きな変更が加えられている。BPTI は両末端領域にヘリックスを含んでおり、立体構造の保持において重要とされる Cys5, Cys55 はこの両末端領域に存在している。従って、ff99SB 力場が過剰にヘリックスを保とうとする傾向があるためにこの領域の構造が変化せず、本来不安定となるべき BPTI の変異体全体の構造が保たれてしまったのかもしれない。ff03 力場は、特に原子電荷において ff99SB 力場とは根本的に異なっており、この問題を回避できた可能性がある。ただし、ff03 力場については ff99 力場と比べてテストが十分ではなく、また、それまでの力場と設計思想が大きく異なっているため、さらなる検討が必要であろうと考えている。また、ff99SB 力場でも安定変異体については構造を保っており、ff03 力場よりも多数のテストが行われている現状とあわせて、BPTI に限らず、立体構造が壊れない安定変異体に対しては十分に有用であろうと考えられる。

ま と め

本研究ではBPTIを用いて、明示的に水を取り扱う explicit solvent 条件のもと、MD シミュレーションがアミノ酸変異の影響を正しく再現できるかどうかを検討し、構造安定性についての実験結果をほぼ再現することができた。従って、implicit solvent 条件に限らず、explicit solvent 条件においても MD シミュレーションが有用であると考えられる。このことから、遺伝多型に起因する薬物の代謝、薬効、副作用などの個人差を考慮する上で、短時間で予測しうる MD シミュレーションの利用が期待される。

REFERENCES

- 1) Shah R. R., *Phil. Trans. R. Soc. B*, **360**, 1617–1638 (2005).
- 2) Nagaoka M., “An Easy Guide to Molecular Simulations,” Kodansha Scientific Ltd., Tokyo, 2008.
- 3) Yu M., Weissman J. S., Kim P. S., *J. Mol. Biol.*, **249**, 388–397 (1995).
- 4) Hagihara Y., Kim P. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 6619–6624 (2002).
- 5) Staley J. P., Kim P. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 1519–1523 (1992).
- 6) Li R., Battiste J. L., Woodward C., *Biochemistry*, **41**, 2246–2253 (2002).
- 7) Kamiya N., “Computational Protein Science: Basic Theories and Medical applications,” Chap. 4, Kamiya N., Higo J., Hukunishi Y., Nakamura H., Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., Tokyo, 2009, pp.83–128.
- 8) Oda A., Yamaotsu N., Hirono S., Takahashi O., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2182–2186 (2008).
- 9) Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E., *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235–242 (2000).
- 10) Darden T., York D., Pedersen L., *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089–10092 (1993).
- 11) Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J., Klein M. L., *J. Chem. Phys.*, **79**, 926–935 (1983).
- 12) Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M. C., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., *J. Comput. Chem.*, **24**, 1999–2012 (2003).
- 13) Lee M. C., Duan Y., *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, **55**, 620–634 (2004).
- 14) Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C., *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, **65**, 712–725 (2006).
- 15) Wang J., Cieplak P., Kollman P. A., *J. Comput. Chem.*, **21**, 1049–1074 (2000).
- 16) Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M., Jr., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W., Kollman P. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5179–5197 (1995).
- 17) Case D. A., Darden T. A., Cheatham T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E., Luo R., Merz K. M., Pearlman D. A., Crowley M., Walker R. C., Zhang W., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Wong K. F., Paesani F., Wu X., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Mathews D. H., Schafmeister C., Ross W. S., Kollman P. A., AMBER9, University of California, San Francisco, 2006.