

## 計算科学フロンティアの展開 その4 — 巨大分子，タンパク質の構造変化のシミュレーション —

渡 辺 宙 志

### I. はじめに

ゲノムプロジェクトの成果により多様な生物の遺伝子配列があきらかになってきた。しかし、それは生命の神秘の解明への終着点になるどころか、数多くの新たな課題を浮かび上がらせた。DNAが記述しているもの、それはタンパク質を構成するアミノ酸の一次元的な配列である。生体機能の最小単位の物質と言えるタンパク質は、そのアミノ酸の配列を基にして機能を発現する3次元的な構造に自ら折りたたまっていく。つまりタンパク質の機能発現のメカニズムを理解しようと思えば、1) アミノ酸の配列情報、2) タンパク質の3次元構造、3) タンパク質の機能、の三つの階層を結び付けていかなければならない。その作業は容易なものではない。しかし応用の面からもさまざまな可能性を秘めているタンパク質研究に対して、生物学者はもとより、化学、物理、医学、工学、農学、情報学などさまざまな分野から、多くの研究者が参入してきており、まさにこの分野は境界領域となっている。本稿では、タンパク質の機能発現にかかわる構造変化の計算機シミュレーションによる研究例を紹介したい。

生物の光エネルギーから生体エネルギーへの変換で広く知られているものに光合成と光駆動プロトンポンプがある。その光駆動プロトンポンプの代表タンパク質バクテリオロドプシン (bR) は、塩田など塩濃度が高い場所に生息する高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* が保有する。この細菌は降雨などによりその塩濃度が低下すると塩濃度が高い深部へ潜る。この時通常の酸素呼吸ができなくなるために、bRを大量に含む紫膜を発現する。bRは基底状態で光を吸収すると一連の構造変化を伴った循環的な光反応サイクルを起こし、最終的にプロトンを細胞内から外へ輸送する。こうして生じたプロトン濃度差のエネルギーを活用して生命活動に必要な物質ATPを合成する。

bRの光反応サイクル過程で固有の吸収波長と構造をもった中間状態 (K, L, M, N, O) が報告されている。これら各中間状態の構造と特性を利用することによって、bRは非常に精密なプロトンポンプを実現している。すなわち、プロトンポンプの詳細なメカニズムの解明には、各中間体の構造情報が必要不可欠である。現在まで、反応の初期過程に関しては、分光スペクトルやX線結晶解析によって構造や動力学的多くの特性があきらかになってきた。しかし光反応サイクルの後半の中間体NとOに関しては、その精製の難しさのために構造をはじめ、多くの特徴が未知のまま残っている。

## II. 研究手法

本研究は、最終的にO中間体の構造予測を目的としている。ではどのようにしてその構造をつくれればよいのだろうか。我々が注目したのは、bRはプロトンを輸送する際、特定の酸性アミノ酸残基が順にプロトンを脱着することによりプロトンを輸送する、という実験事実である。つまり、プロトン位置に由来するタンパク質内部の電荷分布が中間体ごとに異なることになる。我々は中間体の本質的な違いは、この電荷分布の違いであると考えた。つまり、中間体の構造の違いは、この電荷分布の違いによって誘導されていると仮定したのである。よって、この仮定が正しければ、目的の状態の電荷分布を人工的に設定して、時間発展のシミュレーションを行えば、最終的にその電荷分布に対応した構造に変化すると考えられる。幸いプロトン化状態が変化するアミノ酸残基の情報は過去の実験から分かっている。よって、すでにX線結晶回折実験により構造の解けている基底状態の構造に対して、上記の残基のプロトン化状態を変化させることにより、O中間体の構造を得ることができるとは思われる。

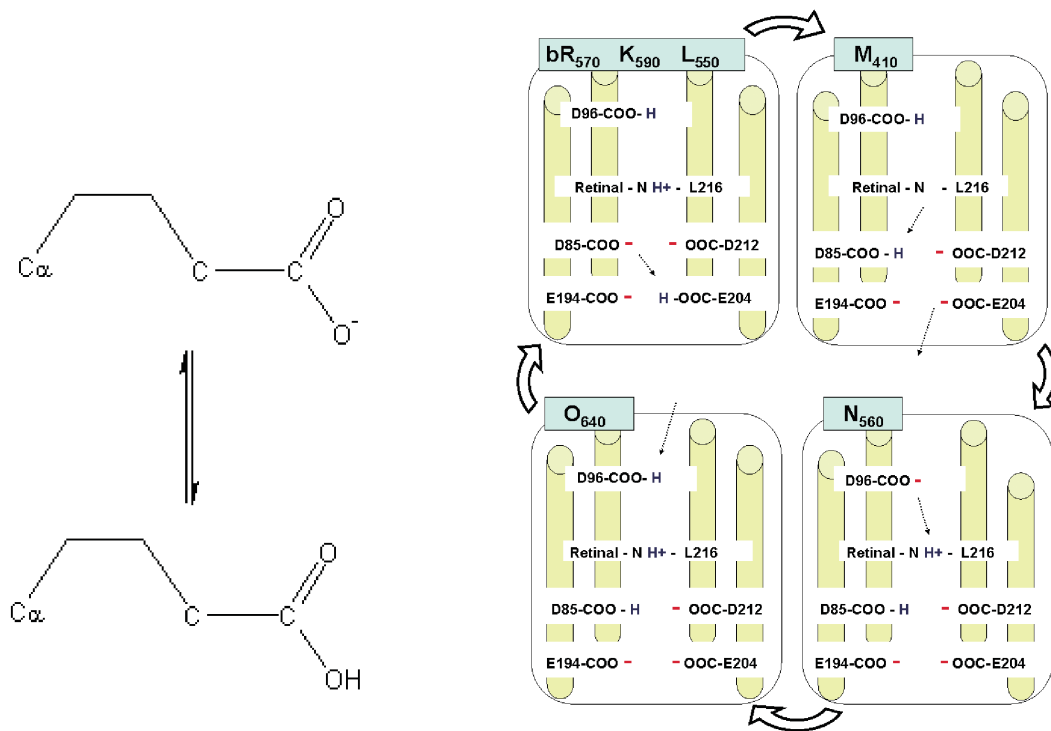


図1 酸性アミノ酸残基のプロトン化及び脱プロトン化（左）と bRのアミノ酸残基のプロトン化状態の変化とプロトン輸送モデル（右）

しかし、O中間体を扱う上でいくつかの問題が存在する。1つはO中間体の立体構造がタンパク質の周囲の環境に敏感であるという点である。これは実験的なO中間体の研究を困難にする1つの要因にもなっている。紫膜を構成する脂質種は、一般の膜タンパク質のそれとは異なっ

ている [1]。そして紫膜を構成する脂質を別の種に置き換える，あるいはその組成比を変えると O 中間体の生成が妨げられることが過去の実験より分かっている [2]。過去の理論的研究で，中間体において脂質までを正確に考慮した研究例はなかった。したがって，慎重に bR の三量体構造，脂質，イオン等を考慮し現時点で最も精密な紫膜のモデリングを実行した。さらにこのモデルに対して，特定アミノ酸のプロトン化状態を変化させることで構造変化のシミュレーションを行った。

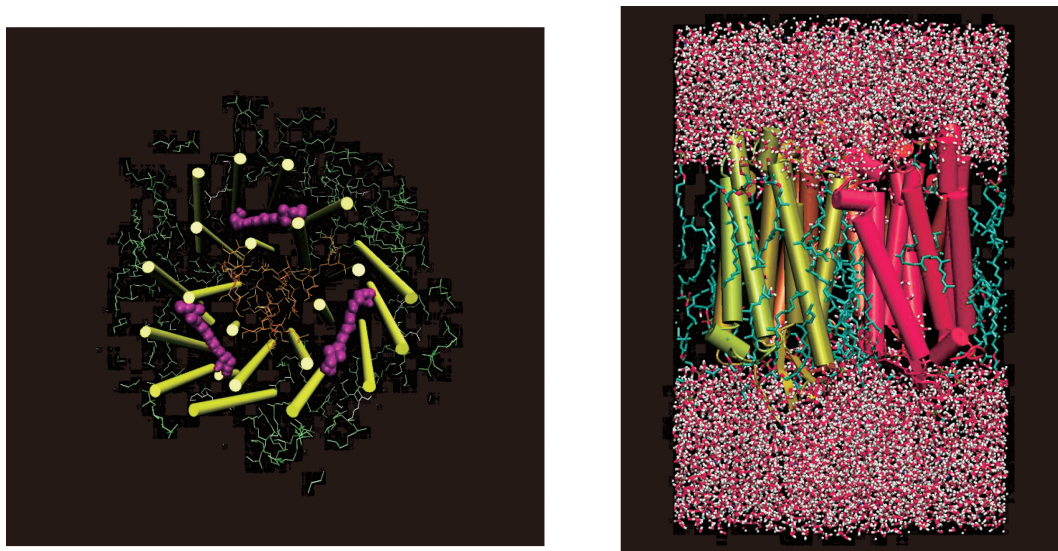


図 2 再現された紫膜：膜に対して垂直な軸から見た図（左）膜を横から見た図（右）  
 円柱はタンパク質のヘリックス構造をあらわす。  
 左図中 レチナル（紫）脂質分子（緑）  
 右図中 脂質分子（緑）水分子（赤&白）

上述のように，計算手順は確定したが，O 中間体構造が実験的に解けてない以上，仮に O 中間体構造と呼べるものをモデリングしても，その妥当性を正確に検証できない。そこで，我々はすでに構造が実験的に報告されている酸性状態に着目した。bR の酸性状態は，内部電荷分布の点から，O 中間体との構造の類似性が指摘されている。[3, 4] したがって，酸性状態に対して本研究のモデリング手法が有効であるならば，O 中間体に対しても有効と言えるであろう。

### Ⅲ. ヘリックス構造の変化

bR は  $\alpha$  ヘリックスと呼ばれる構造を骨格としている（図 2）。シミュレーションで再現した酸性状態のグローバルな構造の評価を行うために，主成分解析という方法を適用した。この手法により，まず実験値が示す酸性状態の構造の特徴を抽出した。酸性状態の構造上の特徴は，主に図 3 が示す 2 つのベクトルの一定割合の重ね合わせで表現される。酸性状態及び O 中間体の共通の特徴である細胞質外側のヘリックスの開きをみることができる。

この 2 つのベクトルの成分を軸にし，シミュレーションで得られた構造の分布を射影したものが図 4 である。酸性になると構造の分布が図右上に広がっている。これは図 3 であらわされた

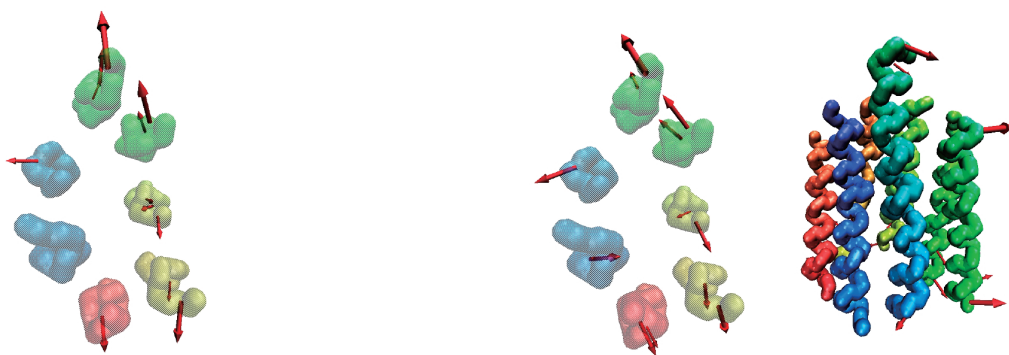


図3 細胞質側及び3量体中心からみた酸性構造をあらわす主成分ベクトル  
(左2図) 第1成分, (右2図) 第2成分

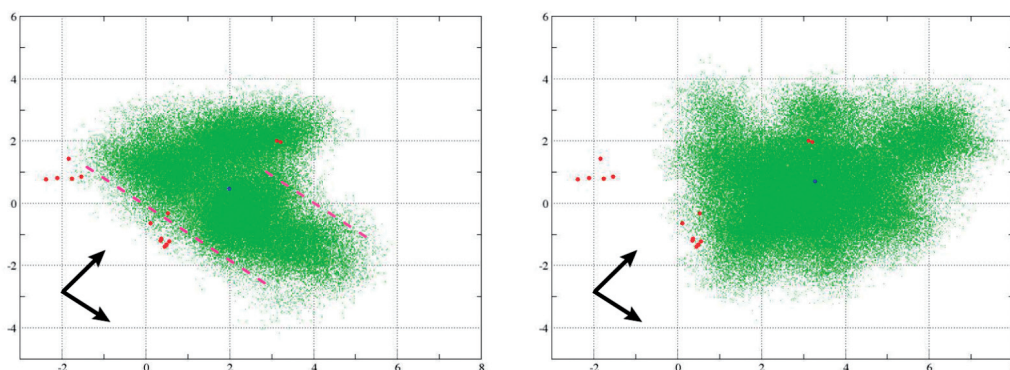


図4 構造の分布図 中性シミュレーション (左) 酸性シミュレーション (右)  
横軸：主成分解析による第1成分 縦軸：第2成分 青点：分布の平均値

矢印の方へ構造が遷移したことをあらわす。つまり、前述のプロトン化手法により構造が再現されていることを示している。このモデリング手法がO中間体の再現に有効であることが期待される。

#### IV. 水の水素結合ネットワーク

前章において、酸性状態のタンパク質全体に及ぶ大きな構造変化は再現することに成功したが、酸性状態はO中間体と類似性が指摘されるために、1アミノ酸残基レベルでの詳細な構造も注目される。我々は以下の点において、O中間体の特性とも関係する興味深い現象を見出した。O中間体から基底状態に戻る過程において、Asp85からGlu194へプロトンが輸送されることは、すでに述べた。しかし、この2つのサイトはArg82残基によって空間的に隔てられており(図5)、プロトンがどのように輸送されるかは分かっていない。

本研究の酸性状態のシミュレーションにおいて、このArg82の配向が変化することが分かった。それに伴い生じた空間に水分子が入り込み、図5のようにAsp85からGlu194へ水の水素結合ネットワークを形成することを確認した。O中間体と酸性状態の類似性を考えると、おそらくO中

間体でも同様の水素結合ネットワークを形成している可能性が高い。一般にプロトン輸送は水素結合ネットワークを用いて行われることが多いといわれる。つまり O 中間体でのプロトン輸送はこの水素結合ネットワークを用いて行われているのではないだろうか。これが事実であれば, bR の光反応サイクル後半におけるプロトン輸送の解明につながるだろう。

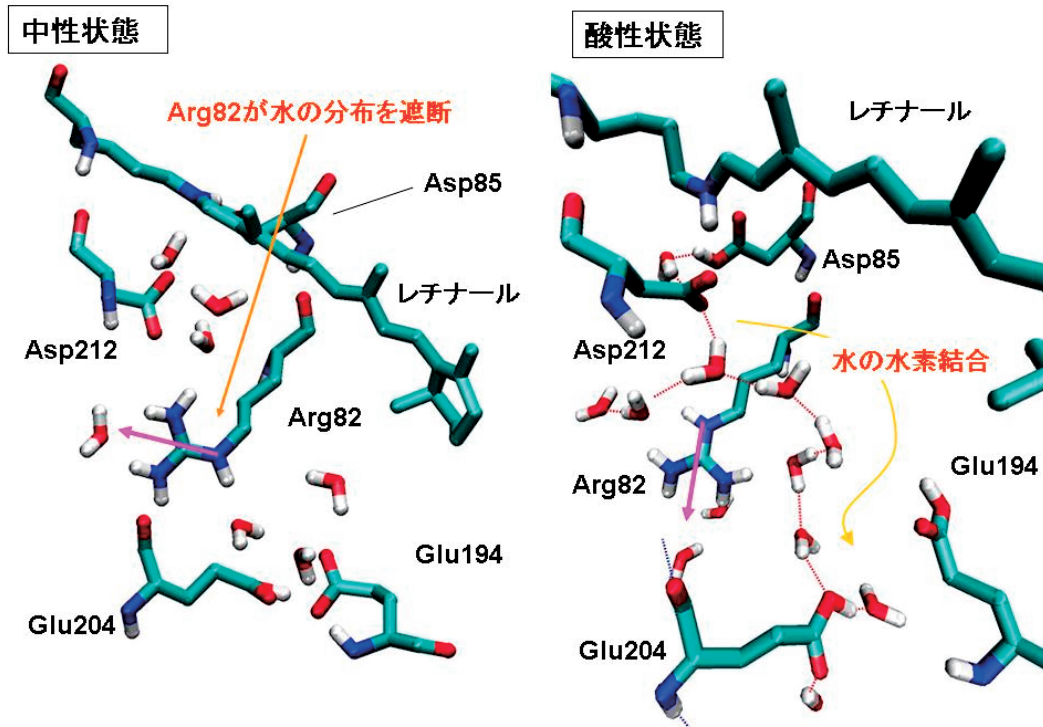


図5 Arg82の配向と水の水素結合ネットワーク  
右図：中性シミュレーション 左図：酸性シミュレーション

一般にタンパク質は数千原子、あるいはそれ以上からなる巨大な分子であり、そのシミュレーションには膨大な計算が必要となる。これを解消すべく粗視化モデルやサンプリング手法の開発などさまざまな試みがなされている。しかし本研究では bR の三量体及びその周辺環境をあらわに含んだ巨大な系を厳密に扱う必要があった。そこで、高性能の CPU を密に積んだスーパーコンピュータを用い、計算を並列化することにより限られた時間の中で、有益な情報を得ることに成功した。

今後我々は、実際に O 中間体を同手法によってモデリングし、世界初の理論的な O 中間体モデルを求め、さらに量子力学計算等を組み合わせながら上記の仮説を実証していく予定である。そのためのシミュレーションも多く実行することになるであろう。したがって今回のような最先端のコンピュータは欠かせない。この研究がバクテリオロドプシンのプロトン輸送のメカニズムの解明、さらにはタンパク質の機能研究の発展をもたらすものなることを期待したい。

## 謝辞

ここで紹介した研究は、情報連携基盤センターの大型計算機を使用し、名古屋大学 COE プログラム「計算科学フロンティア」[6]の援助を受けて進行中である。また、本原稿の作成にあたって、理学研究科物質理学専攻の倭剛久准教授のご協力をいただいた。ここに記して謝意を表します。

## 参考文献

- [1] Kates, M., Kushwaha, S. C. & Sprott G. D. "Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophiles and of Methanogenic Bacteria", *Methods Enzymol.* **88**, 98-111 (1982)
- [2] Mukhopadhyay, A. N., Dracheva, S., Bose, S. & Hendler R. W. "Control of the Integral Membrane Proton Pump, Bacteriorhodopsin, by Purple Membrane Lipids of *Halobacterium halobium*", *Biochemistry* **35**, 9245-9252 (1996)
- [3] Rouhani, S., Cartailier, J., Facciotti, M. T., Walian, P., Needleman, R., Lanyi, J. K., Glaeser, R. M. & Luecke, H. "Crystal structure of the D85S Mutant of Bacteriorhodopsin: Model of an O-like Photocycle Intermediate", *J. Mol. Biol.* **313**, 615-628 (2001)
- [4] Okumura, H., Murakami, M. & Kouyama, T. "Crystal Structures of Acid Blue and Alkaline Purple Forms of Bacteriorhodopsin", *J. Mol. Biol.* **351**, 675-685 (2006)
- [5] Chen, D., Wang, J. M. & Lanyi, K. "Electron Paramagnetic Resonance Study of Structural changes in the O Photointermediate of Bacteriorhodopsin", *J. Mol. Biol.* **366**, 790-805 (2007)
- [6] 名古屋大学 COE プログラム「計算科学フロンティア」, <http://fcs.coe.nagoya-u.ac.jp/>

(わたなべ ひろし： 名古屋大学大学院理学研究科 物質理学専攻 博士後期課程)