

分子シミュレーション法を用いた蛋白質の溶解性予測		
黒田研究室	学籍番号：13251074	リムザン 万凜

### 【背景・目的】

タンパク質の活性を維持するためには凝集を抑制し溶解性を向上させる必要がある。先行研究において、溶解性向上タグ(Solubility Enhancing Tag：以下 SEP タグ)とよばれる電荷をもつアミノ酸を多く含む短いペプチドの配列 (GAGRRRRGRRRRGRRR(C9R)) をタンパク質の末端に付加することで、対象タンパク質の溶解性の向上が実験的に確認された。本研究では、凝集形成の過程を観察するために分子シミュレーションを行った。一般的に用いられている分子シミュレーション法である『分子動力学シミュレーション』は、水分子を明示的に含むため計算速度が遅い。シミュレーションには、水分子を明示的に扱わず、計算速度が速く、様々な条件で迅速にシミュレーションを行うことができる『ブラウン動力学シミュレーション (以下：BD シミュレーション)』を用いて、溶解性実験に用いられているタンパク質を対象にシミュレーションを行い、SEP タグのタンパク質の溶解性への影響を観察・解析し、実験結果との相関を調べることを目的とした。

### 【手法】

本研究では、組み換えタンパク質の精製にしばしば用いられる TEV(Tobacco Etch Virus)プロテアーゼの野生型(TEV-WT)と C9R タグを付加した変異体(TEV-C9R)を計算対象とした。各タンパク質のモデルを 110 個配置し、pH7.0、イオン強度 300mM、タンパク質濃度 20g/L に設定した系について 1 $\mu$ s のブラウン動力学シミュレーションを行い、0.5ns ごとのフレーム 2000 個を解析した。タンパク質同士の原子間距離が 3.6 Å 未満であるとき、それらのタンパク質がクラスターを形成していると定義した。BD シミュレーションではタンパク質が剛体として扱われるため、TEV-C9R 1 分子の分子動力学シミュレーションを 30ns 間行ったあと、タグ部分の構造の主成分分析を行い、異なる 10 構造 (図 1) をランダムに選び、それぞれについて BD シミュレーションを行い、すべての構造の平均の平均クラスターサイズ及びモノマー+ダイマー率を算出した。さらに、TEV-C9R について初期配置を 10 種類変えて BD シミュレーションを行い、オリゴマー比率を調べた。

### 【結果・考察】

まず、初期配置の違いによるオリゴマー比率はほぼ変わらないことから、初期配置の結果への影響はないことが示された(図 2)。次に、TEV-WT と TEV-C9R の平均クラスターサイズを比較した結果、200ns 以降で TEV-C9R の平均クラスターサイズは平衡に達した一方で、TEV-WT の平均クラスターサイズは 200ns 後も増加し続けてさらに両構造の平均クラスターサイズは 800ns-1000ns 間で TEV-WT では 5.62、TEV-C9R では 2.76 と算出され、TEV-WT の方が 2.04 倍大きいことが示された (図 3)。モノマー+ダイマー率については、800-1000ns 間では TEV-C9R の方が平均して 21.60%大きいことが示された (図 3)。BD シミュレーションにおいて、TEV-WT と TEV-C9R のタグ以外の構造は同じであるため、C9R タグは TEV プロテアーゼの溶解性を向上させ、凝集を抑制すると予測される。実際、TEV-C9R の方が TEV-WT よりも溶解性が高いことが実験的に検証され、本研究で計算したクラスターサイズ及びモノマー+ダイマー率との相関が認められる。以上より、BD の解析によってタンパク質の溶解性の評価が可能であることが示唆された。

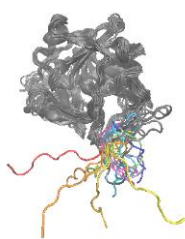


図 1. TEV-C9R の 10 種類の主成分構造

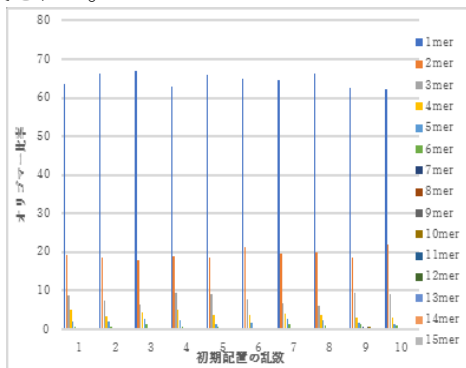


図 2. TEV-C9R の初期配置をランダムに振ったときの各オリゴマー率

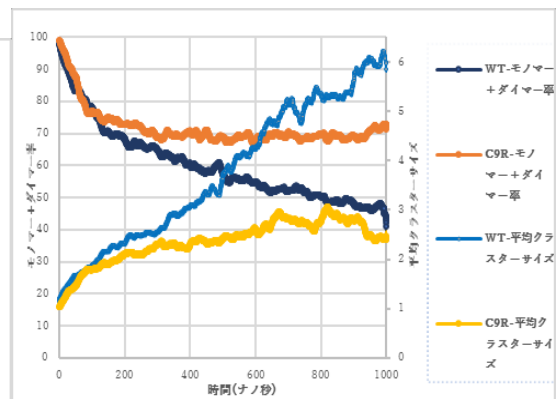


図 3. 1 $\mu$ s 間の各タンパク質の (モノマー+ダイマー)率 / 平均クラスターサイズ