

# 分子動力学計算で明らかにする

## 金属結合タンパク質のダイナミクス

森田 陸 離

筑波大学計算科学研究センター

### 1. 背景

生体内には多種の微量元素が存在しており、様々な生命現象に関与している。タンパク質に金属が配位されることでその活性や機能が制御されるためには、細胞内において局所的に金属イオン濃度が調整される必要がある。このような過程において**メタロチオネイン** (MT) は金属シグナルの伝達・調整を担う<sup>1,2</sup>。MTの主な機能としては(1)金属の貯蔵、(2)有害金属の解毒、(3)抗酸化作用である。(1)MTは金属イオンを結合あるいは放出することで、金属イオンの濃度を局所的に調整することができる<sup>3</sup>。通常MTは亜鉛イオンに結合している。(2)水銀やカドミウムなどの有害な重金属が臓器に蓄積すると中毒症状を起こしてしまう<sup>4,5</sup>。重金属への暴露は細胞においてMTの発現を誘導することが知られている。MTは親和性の違いに基づいて亜鉛イオンの代わりに重金属イオンと結合する。この時、放出された亜鉛イオンが転写因子を活性化し、MTの転写を誘導する。(3)活性酸素種のひとつであるヒドロキシラジカルに対して、MTはラジカルスカベンジャーとして機能する<sup>6</sup>。有害金属の解毒と同様に、ラジカルと反応したシステインは亜鉛イオンを放出し、MTの転写を誘導する。

MTの構造に着目すると、わずかに60アミノ酸程度からなるタンパク質であり、全体の3分の1を含硫アミノ酸であるシステインが占める<sup>7</sup>。酸化状態のシステインは4つ組になって四面体を形成し、主に亜鉛を配位する。その構造はフレキシブルであり、X線結晶解析による決定は困難であったが、NMRによる構造が報告されている<sup>8,9</sup>。しかし、典型的な構造のみならず、金属イオンの個数や配位によって多様な構造を取りうることが指摘されている。

そこで、本研究では**分子動力学計算** (MD) によって構造をサンプリングすることを目的とした。MDは、運動方程式に基づいて原子の運動をシミュレーションする。MDはタンパク質の構造変化について時空間的に高解像度の情報を得ることができる。さらに、周囲の環境を任意に変えることが可能であるため、実験では取得困難な条件でのシミュレーションを行える。本研究では、マウスMT-1のβドメインを使用して比較的長い時間(10 μs)のシミュレーションを行った。

### 2. 方法

マウスMT-1のβドメインの立体構造はProtein Data Bank(PDB)より入手した(PDB ID: 1DFT)<sup>9</sup>。すでに配位している金属や水分子は予め取り除いた。タンパク質側鎖の水素原子はGROMACS 2019<sup>10</sup>に実装されているgmx2pdbを使用して補完された。タンパク質についての力場はAmber ff14SB<sup>11</sup>を使用し、亜鉛については改良されたモデル<sup>12</sup>を使用した。MTは20Åのマージンを持ったボックスに配置され、TIP3Pモデル<sup>13</sup>で溶媒和された。亜鉛イオンを含む系(Holo-MT)については、40個の亜鉛イオンを追加した。また、系を中和するために水分子をランダムに選択し、Na<sup>+</sup>またはCl<sup>-</sup>に置換した。クーロン相互作用の計算にはParticle Mesh Ewald法<sup>14</sup>を使用した。

すべてのシミュレーションには GROMACS 2019 を使用した。系を平衡化するために以下の処理を行った。(1)10,000 ステップのエネルギー最小化、(2)V-rescale サーモスタット<sup>15</sup>を使用した NVT 条件下で 100 ps の平衡化、(3)Berendsen カップリング<sup>16</sup>を使用した NPT 条件下で 100 ps の平衡化。最後に NPT 条件下 (300 K、1 atm) で 10  $\mu$ s のプロダクションランを行った。

### 3. 結果と考察

まず、亜鉛イオンを含まない条件 (Holo-MT) において MT の構造をサンプリング、分類した (図 1)。ランダムコイル構造がいくつかみられた他は、全体の 92% が球状の構造をとった (図 3)。この代表構造は NMR でみられるものと類似しているが、複数の短い  $\alpha$  ヘリックスを持つという特徴がある。

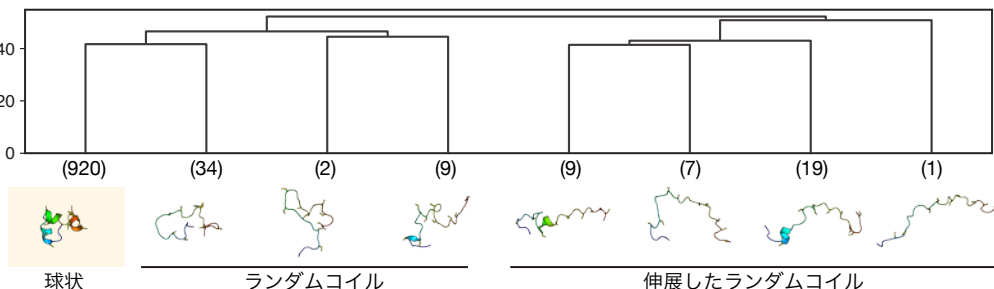


図 1 Holo-MT についての階層的クラスタリングと代表構造

距離地図を用いた階層的クラスタリングによって分類された Holo-MT の構造群とその代表構造を示す。カッコ書きの数字は 1000 構造中その構造群が占める数を表す。

一方で、亜鉛イオンを含まない条件 (Apo-MT) においても構造サンプリングおよび分類を行った (図 2)。Holo-MT と同様にランダムコイル構造が現れたが、全体の 91% を占めたのは伸展した  $\beta$  シート構造であった (図 3)。

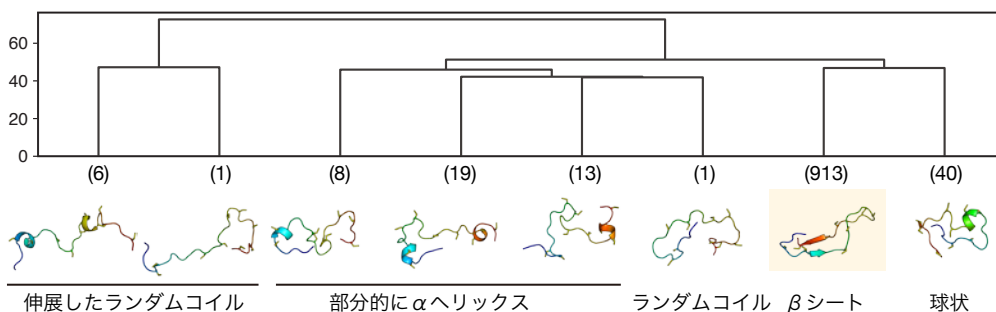


図 2 Apo-MT についての階層的クラスタリングと代表構造

Apo-MT のクラスタリング結果を図 1 と同様に示す。球状の構造は初期構造に由来すると考えられる。

構造の可逆性を調べるために、Apo-MT の構造を 5 つ抽出し、亜鉛イオンを加えて追加のシミュレーションを行った。この時、マイクロ秒のオーダーで  $\alpha$  ヘリックス構造が形成された。この結果は、Apo-MT と Holo-MT が局所的な亜鉛イオン濃度の変化に迅速に反応するのに十分な構造可逆性を持つことを示している。実験による二次構造の決定には円二色性スペクトルが使用され

てきた<sup>17-19</sup>。これまでの実験による研究では金属イオンの添加された条件においてMTの構造変化を抽出することに焦点が当てられていた。そのため、Apo-MT がどのような構造を取りうるかという情報はなかった。この点において、本研究で得られた Apo-MT の構造は興味深いものであり、今後の実験的な検証が期待される。

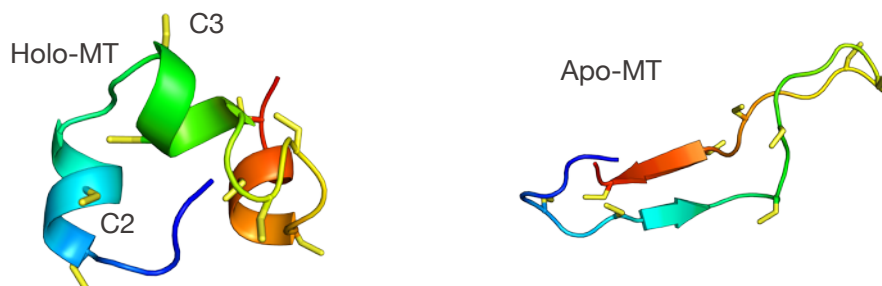


図3 (左) Holo-MT の代表構造。(右) Apo-MT の代表構造

Holo-MT、Apo-MT の代表構造を拡大して示す。9箇所のシステインはスティック表示で示されている。

Holo-MT の構造に着目すると、平均して 1.55 個の亜鉛イオンが結合していた。NMR 構造では 3 個の亜鉛イオンが観察される。この違いについては 2 つの原因が推測される。1 つ目は、亜鉛イオンのパラメータの問題である。本研究では亜鉛イオンを方向性を持たない 1 つの粒子として取り扱った。一般的に亜鉛イオンは 4 つの配位子と方向性を持った配位合をとる。これを改善するためにカチオン性ダミー原子モデル (CADA) が考案されている<sup>20</sup>。CADA では質量を持つ粒子の周りに電荷を分散して持つ 4 つの原子を配置することで、より精度良く配位結合を表現する事ができる。このようなモデルの使用で得られる結果に違いが生じる可能性は残されている。一方で、従来の単粒子モデルを使用してもよい結果が得られている結果は複数存在している。2 つ目の可能性は、時間スケールの問題である。亜鉛が配位するターンオーバーは  $10^{-8}$  秒程度で生じる<sup>21</sup>。これは、NMR の時間分解能 ( $10^{-4}$  秒) やタンパク質の構造変化にかかる時間スケール ( $10^{-6}$  秒) と比べて非常に高速であり、NMR では平均的な原子の存在のみが記録されている可能性に注意しなければならない。

次に、塩濃度についての懸念を検証した。Holo-MT において、多くの亜鉛イオンおよび中和のためのカウンターイオンが導入された。その結果として塩濃度が上昇しており、Holo-MT の構造変化が生じた可能性がある。そこで、亜鉛イオンの代わりにナトリウムイオンを加えて 3  $\mu$ s のシミュレーションを行った (Hightsalt-MT)。その結果、Apo-MT と同様に  $\beta$  シート構造が見られた (図 4、6)。このことから、単なる塩濃度の上昇ではなく、亜鉛イオンの存在が Holo-MT の構造形成に必要なことが示唆される。

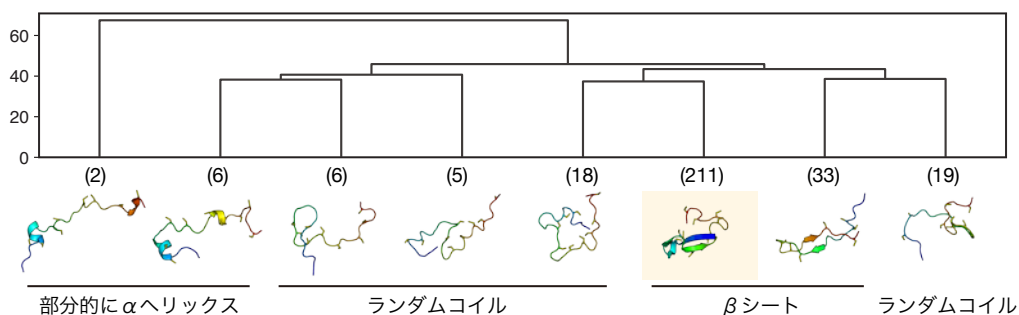


図4 Highsalt-MT についての階層的クラスタリングと代表構造

高塩濃度環境下でのMTの構造クラスタリング結果を図1と同様に示す。全体の構造数は300 スナップショットである。

また、Holo-MT では9つのシステインのうち2番目と3番目のシステイン (C2、C3) に亜鉛イオンが安定して結合した。この理由として、C2 および C3 が亜鉛イオンでキャップされることが構造形成に関わるのではないかと考えた。そこで、C2 および C3 のチオール基 (-S) をプロトンでキャップすることで、チオレート基 (-SH) として 3  $\mu$ s のシミュレーションを行った (SemiApo-MT)。その結果、Holo-MT で見られたような $\alpha$ ヘリックスを持つ球状の構造が多くみられた (図5、6)。このことから Holo-MT 構造は C2 および C3 のキャッピングによって誘導される事が示唆された。しかし、なぜ亜鉛イオンが C2 および C3 に安定して結合するのかは不明である。

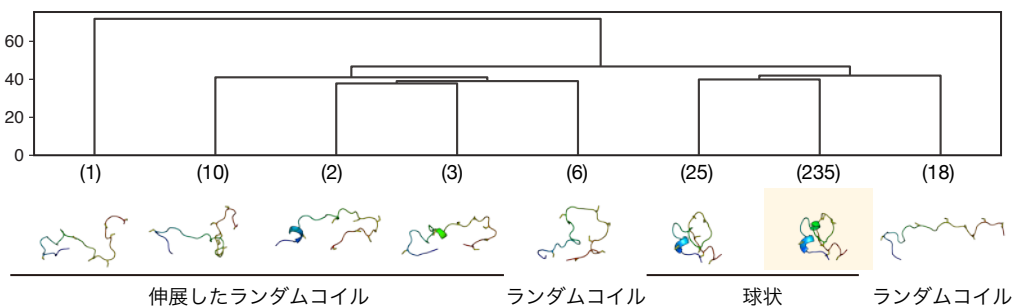


図5 SemiApo-MT についての階層的クラスタリングと代表構造

SemiApo-MT についてのクラスタリング結果を図4と同様に示す。

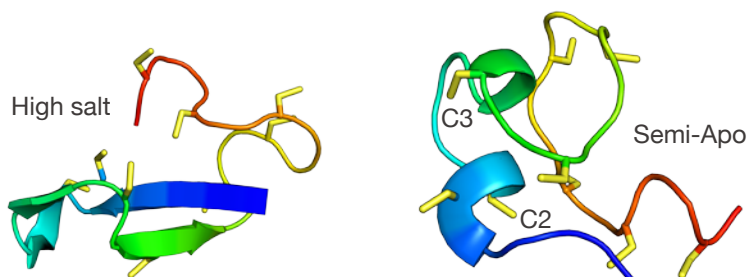


図6 (左) Highsalt-MT の代表構造。(右) SemiApo-MT の代表構造

Highsalt-MT および SemiApo-MT の代表構造を示す。

C2の周辺で金属に配位している残基を調べた。その結果、Asp2がC2と共に亜鉛イオンと結合していることが明らかになった。Asp2はMTのβドメイン唯一の酸性アミノ酸であり、哺乳類のMTにおいて進化的に保存されている。従来はシステインのみが亜鉛結合に関わるとされていたが、Asp2も重要な働きをしていることが明らかになった。EFハンドなどの一部の金属結合モチーフは主にアスパラギン酸を利用している。Asp2に対する点変異実験によって結合親和性への寄与を調べることが期待される。

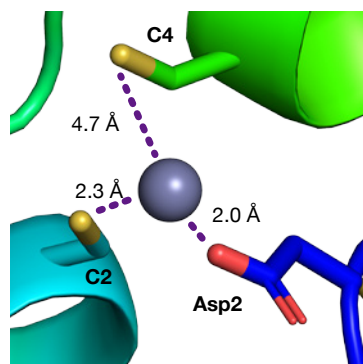


図7 Asp2の周辺構造

Asp2周囲の亜鉛配位構造を示す。紫の点線は金属配位に関与すると思われる結合を表し、その距離を示した。

#### 4. 結論

本研究では外部環境を変えたMDによって亜鉛イオンの有無によるMTの構造多様性を明らかにした。金属のある環境で形成されるαヘリックスは構造を安定させ、MTの金属配位を確実にする可能性がある。また、金属の無い環境で形成されるβシートは不安定であった。先行研究によると、Apo-MTはプロテアーゼによる処理でHolo-MTより早く分解されることがわかっている。このことから金属イオンが欠乏した環境では不必要となるMTが不安定なβシートを形成して速やかに分解されることが考えられる。また、MTは金属を保持したり放出したりすることで間接的に機能を発揮すると考えられている。しかし、MTが構造変化するという事実より、異なるタンパク質とMTが結合することが示唆される。このような相互作用の詳細な解明は金属シグナルの伝達の分子メカニズムを明らかにするだろう。無数のタンパク質からMTの結合パートナーを発見するには、更なる実験的あるいは情報科学的研究が必要になる。

#### 謝辞

本研究は2021年度東京大学情報基盤センター若手・女性利用（「分子動力学計算で明らかにする金属結合タンパク質のダイナミクス」）によって支援され、スーパーコンピューター Reedbushを用いて実施された。

#### 参考文献

- 1 Kagi, J. H. & Valee, B. L. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* **235**, 3460-3465, doi:10.1016/s0021-

- 9258(18)64490-4 (1960).
- 2 Margoshes, M. & Vallee, B. L. A Cadmium Protein from Equine Kidney Cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813-4814, doi:DOI 10.1021/ja01574a064 (1957).
  - 3 Suhy, D. A., Simon, K. D., Linzer, D. I. & O'Halloran, T. V. Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J. Biol. Chem.* **274**, 9183-9192, doi:10.1074/jbc.274.14.9183 (1999).
  - 4 Durnam, D. M. & Palmiter, R. D. Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.* **256**, 5712-5716, doi:10.1016/s0021-9258(19)69264-1 (1981).
  - 5 Heuchel, R. *et al.* The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *The EMBO Journal* **13**, 2870-2875, doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06581.x (1994).
  - 6 Dalton, T., Palmiter, R. D. & Andrews, G. K. Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5016-5023, doi:10.1093/nar/22.23.5016 (1994).
  - 7 Winge, D. R. & Miklossy, K. A. Domain nature of metallothionein. *J. Biol. Chem.* **257**, 3471-3476, doi:10.1016/s0021-9258(18)34802-6 (1982).
  - 8 Peterson, C. W., Narula, S. S. & Armitage, I. M. 3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. *FEBS Lett.* **379**, 85-93, doi:10.1016/0014-5793(95)01492-6 (1996).
  - 9 Zangger, K., Öz, G., Armitage, I. M. & Otvos, J. D. Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci.* **8**, 2630-2638, doi:10.1110/ps.8.12.2630 (2008).
  - 10 Abraham, M. J., van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B. & the GROMACS development team. GROMACS User Manual version 2019. (2019).
  - 11 Maier, J. A. *et al.* ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696-3713, doi:10.1021/acs.jctc.5b00255 (2015).
  - 12 Macchiagodena, M., Pagliai, M., Andreini, C., Rosato, A. & Procacci, P. Upgrading and Validation of the AMBER Force Field for Histidine and Cysteine Zinc(II)-Binding Residues in Sites with Four Protein Ligands. *J. Chem. Inf. Model.* **59**, 3803-3816, doi:10.1021/acs.jcim.9b00407 (2019).
  - 13 Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926-935, doi:Doi 10.1063/1.445869 (1983).
  - 14 Ewald, P. P. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann Phys* **369**, 253-287, doi:10.1002/andp.19213690304 (1921).
  - 15 Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling.

- J. Chem. Phys.* **126**, 014101, doi:10.1063/1.2408420 (2007).
- 16 Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Vangunsteren, W. F., Dinola, A. & Haak, J. R. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684-3690, doi:Doi 10.1063/1.448118 (1984).
- 17 Cai, W. & Stillman, M. J. (Mercury)18-metallothionein. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7872-7873, doi:10.1021/ja00231a045 (2002).
- 18 Rupp, H. & Weser, U. Circular dichroism of metallothioneins. A structural approach. *Biochim. Biophys. Acta* **533**, 209-226, doi:10.1016/0005-2795(78)90565-2 (1978).
- 19 Scheller, J. S., Irvine, G. W. & Stillman, M. J. Unravelling the mechanistic details of metal binding to mammalian metallothioneins from stoichiometric, kinetic, and binding affinity data. *Dalton Trans* **47**, 3613-3637, doi:10.1039/c7dt03319b (2018).
- 20 Pang, Y. P. Novel zinc protein molecular dynamics simulations: Steps toward antiangiogenesis for cancer treatment. *J. Mol. Model.* **5**, 196-202, doi:DOI 10.1007/s008940050119 (1999).
- 21 Gray, H. B. & Langford, C. H. Ligand Substitution Dynamics. *Chemical & Engineering News Archive* **46**, 68-76, doi:10.1021/cen-v046n015.p068 (1968).