

## ブラゼインとその変異体の電子状態計算による 甘味タンパク質の機能解析

○矢城陽一朗, 直島好伸

岡山理科大学自然科学研究所、岡山理科大学大学院総合情報研究科

(〒700-0005 岡山県岡山市北区理大町 1-1)

### 【緒言】

我々は数年前より、甘味を呈するタンパク質の甘味の変化やその発現機構の解明を目指して、大規模密度汎関数計算プログラム Protein DF による甘味タンパク質の全電子量子化学計算を行っている。<sup>1-3)</sup> 今回は、甘味タンパク質 *des-pGlu* ブラゼイン (ブラゼインの N-末端のピログルタミン酸が欠落したもので、アミノ酸残基 53 個) と 2 つの変異体、Glu41Lys (甘味増加)、Arg43Ala (無味)<sup>2)</sup>、に加え、さらに 3 つの変異体、Asp29Lys (甘味増加)、His31Ala (甘味減少)、Arg33Ala (無味)、に対してこれまでと同様な電子状態計算を行い、甘味タンパク質の甘味の発現や増減に関与すると思われるアミノ酸残基を調べた。<sup>3)</sup>

### 【方法と結果】

まず、Protein Data Bank からダウンロードしたブラゼインの立体構造 (PDB code : 2BRZ) から N-末端のピログルタミン酸を除去して *des-pGlu* ブラゼイン (以下、これをブラゼインと記す) の構造を得た。(Fig.1) ついで、生体分子計算ソフト AMBER を用いて、ブラゼインの周囲 8.0Å に水分子を配置し、分子動力学計算およびエネルギー極小化計算により構造を調整した。さらに、周囲の水分子を除去した後、ProteinDF に導入されている GUI ソフトウェア ProteinEditor でカウンターイオンを配置した。引き続き、ブラゼインの座標を固定した分子力学計算でカウンターイオンの位置を調整し、得られた構造に対して ProteinDF による SVWN 汎関数での全電子量子化学計算を実行した。5 つの変異体に関しては、ProteinEditor を用いてブラゼインの立体構造における Asp29、Glu41 を Lys に、His31、Arg33、Arg43 を Ala に変異させてそれぞれの構造 (Fig.1) を構築した後、ブラゼインと同様な方法で各構造の調整と全電子量子化学計算を行った。

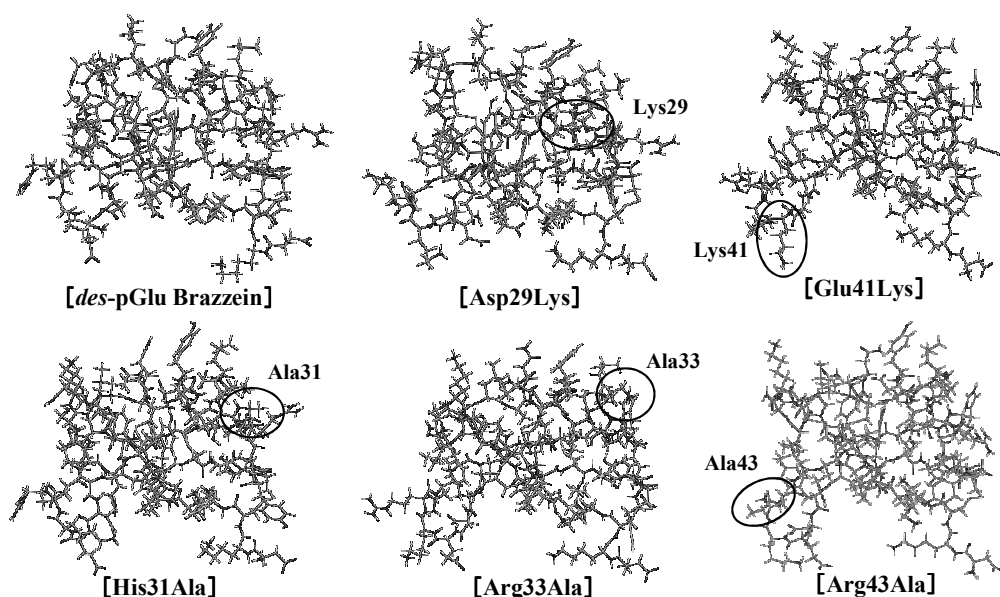


Fig.1 Structures of *des-pGlu* Brazzein and Five Different Mutants.

上述の電子状態計算により算出したブラゼインと 5 つの変異体の静電ポテンシャルマップから、ブラゼインでは、His31、Arg33、Arg43 などの塩基性アミノ酸は強く正に帯電し、酸性アミノ酸の Glu9 はほとんど電氣的に中性であることが認められ、さらに興味深いことに、中性アミノ酸の Tyr8 と Tyr51 が正に帯電していることが判明した。また、甘味が増加する変異体 Asp29Lys と Glu41Lys では、ブラゼインにおいて正に帯電していたアミノ酸残基に加えて、酸性アミノ酸の Glu9 や中性アミノ酸の Val7、Ser14、Gln17、Gln21、Asn44 などが正に帯電していることがわかった。すなわち、正に帯電したアミノ酸残基の数が増加し、正電荷がタンパク質全体に広がっていることが明らかとなった。一方、His31Ala、Arg33Ala、Arg43Ala では、何れも中性アミノ酸の Tyr8 や Tyr51 が電氣的に中性となり、特に無味の変異体 Arg43Ala では、塩基性アミノ酸の Arg33 が電氣的に中性となることがわかった。このことから、甘味が減少もしくは無味になる変異体では、正に帯電したアミノ酸残基の数が減少することが明らかとなった。(Table 1) さらに、フロンティア分子軌道の解析から、ブラゼインや甘味が増加する変異体の HOMO もしくは LUMO には、Val7、Glu9、His31、Arg33、Arg43 など正に帯電しているアミノ酸残基が存在していることが認められた。

**Table 1 Electric Charge of the Selected Amino Acid Residues in *des*-pGlu Brazzein and Five Different Mutants.**

	<i>des</i> -pGlu Brazzein	Asp29Lys	Glu41Lys	His31Ala	Arg33Ala	Arg43Ala
Val7	0	+	+	0	0	0
Tyr8	+	+	+	0	0	0
Glu9	0*	+	+	0	-	0
Asp29	-	++ (Lys29)	-	-	-	-
His31	+	++	+	0 (Ala31)	+	+
Arg33	+	++	++	+	0 (Ala33)	0
Glu41	-	-	++ (Lys41)	-	-	-
Arg43	+	++	++	+	+	0 (Ala43)
Tyr51	+	++	++	0	0	0

++ : Strongly Positive    + : Positive    0 : Neutral    - : Negative    \* almost Neutral

### 【まとめ】

ProteinDF による電子状態計算から得られた静電ポテンシャルマップおよびフロンティア軌道から、甘味を示すブラゼインとその変異体においては、中性アミノ酸残基の Tyr8 や Tyr51、そして塩基性アミノ酸残基の His31、Arg33、Arg43 が共に正に帯電しており、また、これらの塩基性アミノ酸残基が HOMO や LUMO に存在していることが判明した。さらに、正に帯電したアミノ酸残基の数が増加すると、甘味が増加することがわかった。一方、甘味が減少もしくは無味になる変異体では、正に帯電したアミノ酸残基の数は減少することが明らかとなった。これらの計算結果は、正に帯電したアミノ酸残基が甘味度の増減に関連していることを、また、正に帯電している Tyr8、Tyr51 などの中性アミノ酸や His31、Arg33、Arg43 などの塩基性アミノ酸残基が、甘味の発現に重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

### 【参考文献】

- 1) 矢城陽一朗, 直島好伸, 日本コンピュータ化学会 2011 春季年会 & 10 周年記念シンポジウム講演予稿集, 102-103 (2011).
- 2) 矢城陽一朗, 直島好伸, 日本コンピュータ化学会 2012 春季年会講演予稿集, 24-25 (2012).
- 3) Y. Yagi and Y. Naoshima, *Trans. Japan Society for Simulation Tech.*, 4(4), 127-135 (2012).