ニールマン・ピック C2 蛋白の表面電荷計算の検討

伊藤康友

医学系技術支援室　分析・物質技術系

概要

遺伝病のニールマンピック病のうち C 型はコレステロールが蓄積する病気である。異常を表す分解酵素ウシの Niemann-Pick C2 protein（NPC2）の構造は明らかになっている（1NEP.pdb）。一方真核生物の Saccharomyces cerevisiae でも配列が非常に類似した蛋白の存在が明らかになっており、計算により予測構造が示されている。今回、ウシと出芽酵母の NPC2 の表面電荷を比較したいとの依頼があり、下記のような計算を行い、参照論文について疑問点があったので検討した。

方法

1.　ビジュアライザーのインストール

依頼もとの研究者が簡便に構造を表示できるよう Windows または Mac OS で動作する PyMOL を選んだ。インストールする際、大阪大学蛋白研究所のサイトを参照した。32 ビット OS のパソコンしか手元になかったことと、依頼時にサイトの情報が古かったため（後の 2016.10.16 にアップデート）、いくつかのインストールパッケージを適切にしてインストールを完了した。続いて静電ポテンシャルを表示するため PyMOL のプラグインとして準備されている APBS tools をインストールして研究者への環境を完了した。

2.　表面電荷計算サイトの検討

結合部位を解析する際に表面電荷を計算することは重要である。PyMOL で表面電荷を表示するためには APBS tools で使用できる PWR 形式のファイルが必要になるため、PDB2PQR server で計算して作成する。

3.　ヒト NPC2 予測構造

上記 PDB2PQR server で取り扱うことができる力場が AMBER、CHARMM、その他 4 種類に限られるため、共通する力場をサポートしているホモロジーモデルソフトウェアを探すのが簡便である。そこで CHARMM を共通に使用できる Modeller（version9.17、Andrej Sali laboratory）で予測構造を作成することにした。テンプレートにする構造はウシの決定済み構造（1NEP.pdb）とし、構造ファイルのチェックと訂正を PROCHECK（UCLA DOE LABで行い（図 1）、アミノ酸配列のアライメントは CLUSTAL OMEGA（version1.2.2）で行った（図 2）。

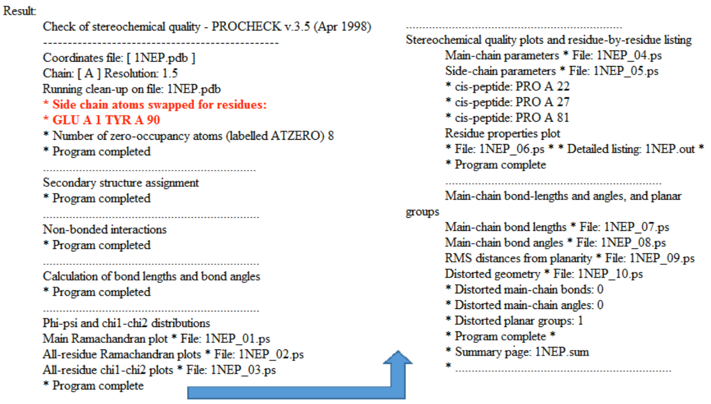

図1.PROCHECKの結果　赤字が訂正された箇所

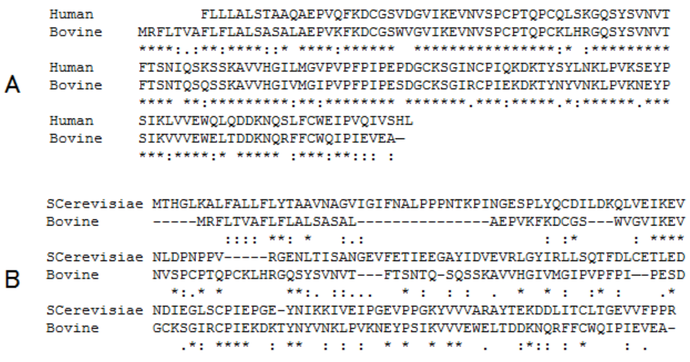

図2（続）.NPC2の配列アライメント

A：ヒトとウシ、B：出芽酵母とウシ

結果と考察

結果：

CHARMM 力場のホモロジーモデルで変異体と wild type を作成し、表面電荷の力場を CHARMM と PARSE（PDB2PQR 推奨）で作成し、図 3 のような予測表面電荷が得られた。

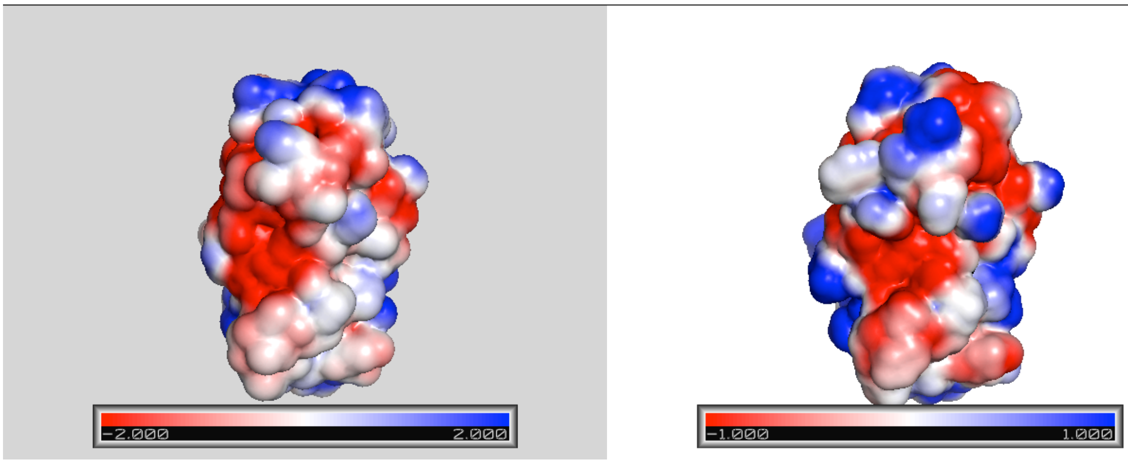

図 3.NPC2 の表面電荷の比較　左が CHARMM で、右が mutant model

考察：

参照論文との予測表面電荷に明らかな違いがあり、信憑性は今回の計算の方が高いと考えられる。なぜならば参照論文は 2015 年の論文でありながら、InsightII（MSI 社、BIOSYM 社製）という 1998 年ごろまでのソフトウェアを使用している。また、力場は現在 CHARMM、Amber、MMFF95s といった蛋白解析に使用される力場としては未熟なものであり、現在の物に比べて最適化されていない。しかし、その後、決定された人の NPC2 構造は backbone の 1NEP との RMSD は０であったので変異構造によるモデルの作成には問題がなかった（図４.）。

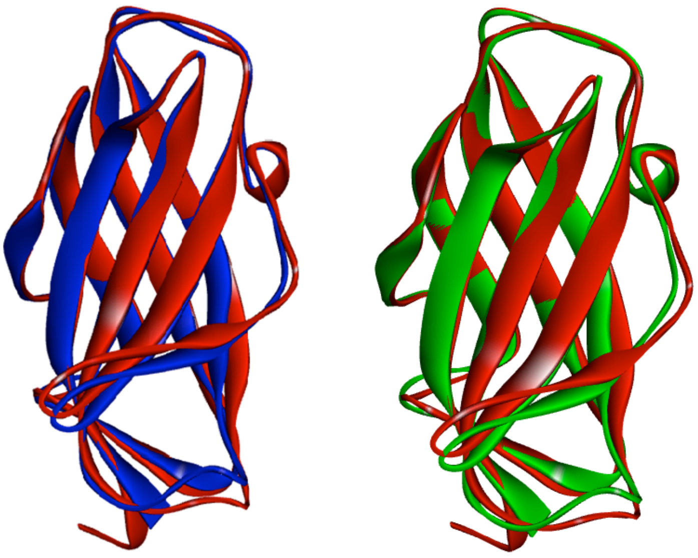

図4. ウシと人の決定された構造（左）と人の予測構造（右）のスーパーインポーズ
ウシ：青、ヒト（決定済）：赤、ヒト予測構造：緑

参考文献

[1] Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research* **32** W665-W667 (2004).

[2] M.A. Marti-Renom, A. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, A. Sali. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 291-325, 2000