

氏 名 光 武 重代理

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第425号

学位授与の日付 平成11年9月30日

学位授与の要件 数物科学研究科 機能分子科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 THEORETICAL STUDIES OF CONFORMATIONS OF OLIGOPEPTIDES BY
EFFICIENT SIMULATION METHODS

論文審査委員 主 査 教 授 中村 宏樹
教 授 平田 文男
教 授 渡辺 芳人
助 教 授 岡本 祐幸
助 教 授 木寺 詔紀（京都大学）

論文内容の要旨

本研究では、初期構造や、経験的パラメータに依存しない第一原理からの計算機シミュレーションを行い、タンパク質の立体構造予測をすることを目的としている。この計算を行う際、最小エネルギー状態を求めたいが、タンパク質の系にはエネルギー極小状態が無数に存在するため、エネルギー最小に対応する構造を得ることが至難の技である。徐冷法 (Simulated annealing) やマルチカノニカル法 (multicanonical algorithm) は、計算物理学の分野で開発された強力なシミュレーション法である。前者は、物質の結晶を作る時の焼きなましプロセスからきており、徐々に温度を下げることによりエネルギー極小状態に留まるのを避ける。後者は、エネルギー空間上で1次元ランダムウォークを実現することにより、どんなエネルギー障壁も乗り越えられ、極小値に留まることを避けることができる。また、1回のシミュレーションから最小エネルギー状態ばかりでなく、任意の温度における熱力学量も得ることができる。本研究では、この2つの強力な手法を適用し、アミノ酸配列の情報のみを用いた第一原理からのペプチドの計算機実験を行った。

具体的には、まず、アミノ酸数5のペプチドである Met-enkephalin (アミノ酸配列: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) において、気相中及び疎水効果のみを取り入れたモデル溶媒中の徐冷モンテカルロシミュレーションを実行した。そして、各シミュレーションで得られた最小エネルギー構造を分類した (発表論文1)。ペプチド自身のエネルギー関数は、静電相互作用項、12-6レナード・ジョーンズ項、水素結合項の分子内の全ての原子対についての和に、全てのボンドの周りの回転角についての和であるねじれエネルギー項を足したもので与えられる。各エネルギー項のパラメータと分子の座標は ECCEP/2 のものを用いた。モデル溶媒に関しては、空孔形成自由エネルギー (疎水効果) を取り入れるために、スケール粒子理論を用いた。徐冷法とスケール粒子理論を結合したのは本研究が初めてである。温度は 1000K から 250K まで指数関数的に下げた。このシミュレーションを両環境下 (気相中及びモデル溶媒中) でそれぞれ 20 回行った。そして、得られた 20 個 (両環境下で 40 個) のエネルギー極小構造をその座標の根平均自乗距離により類似構造のグループに分類し、各グループの特徴的構造を詳細に調べた。気相中では、最低エネルギー構造を含むグループ (グループ A) は Gly2 の主鎖の酸素 (窒素) と Met5 の主鎖の窒素 (酸素) がそれぞれ水素結合をつくり、Gly2-Gly3-Phe4-Met5 による TypeII' β -turn を形成する構造を特徴としていた。また、次にエネルギーの低い極小状態を含むグループ (グループ B) は Gly1 の主鎖の酸素 (窒素) と Phe4 の主鎖の窒素 (酸素) がそれぞれ水素結合をつくり、Tyr1-Gly2-Gly3-Phe4 による typeII β -turn を形成する構造を特徴としていた。モデル溶媒中で得られた構造についても同様にグループ分けを行った。まず、最低エネルギー構造を含むグループの特徴的構造は、気相中の 2 番目にエネルギーが低いグループ (グループ B) と同じであることが分かった。また、気相中での最小エネルギー状態を含むグループ (グループ A) は存在しなかった。更に、主鎖は伸びているが、側鎖も考慮すると全体的に円形をした構造のエネルギーが低いことも判明した。最後に、Met-enkephalin のような小ペプチドでは、溶媒接触表面積と空孔形成自由エネルギーが必ずしも比例しないことも示された。

徐冷法によるシミュレーションの後には、マルチカノニカル法を用いて、気相中での

Met-enkephalin の解析を行った (発表論文 2)。ペプチド自身のエネルギーに関しては、前回と同じものを用いた。今回は、得られた構造を、主鎖内の水素結合のパターンから類似構造に分類した。4 種類の特徴的なグループが得られ、上の根平均自乗距離を用いた分類結果と一致することが示された。また、任意の温度におけるそれらのグループの存在確率を計算して、低温では、1 つの特徴的な構造 (グループ A) が存在し、常温では主に 2 つの特徴的な構造 (グループ A 及び B) が存在することを見出した。更には、種々の熱力学量を温度の関数として求めた。徐冷法では、複数のシミュレーションを繰り返して、結果の妥当性を確認する必要がある。また、幅広い温度における熱力学量を求めることが不可能である。これに対し、マルチカノニカル法では、幅広いエネルギー空間をサンプルできるので、唯 1 回のシミュレーションで、エネルギー最小状態が得られたことを確認できるばかりでなく、任意の温度の熱力学量を計算することができる。本研究の手法は、初めて温度の関数として、ペプチドの立体構造の特徴を詳細に研究することを可能にした。

彼女は更に、マルチカノニカルシミュレーションによって、気相中と水溶液中の homo-oligomers のヘリックス・コイル転移の研究を行った (発表論文 3)。タンパク質の 2 次構造 (α ヘリックス及び β シート等) の予測は 1970 年代にタンパク質立体構造のデータベースに基づく研究が試みられた。また、たくさんの CD 実験等から、小ペプチド系におけるヘリックス形成傾向性が調べられた。これらの結果から、アラニンはヘリックスになりやすいアミノ酸であり、グリシンはヘリックスを壊すアミノ酸であることがわかった。本研究では、10 残基からなるホモアラニンとホモグリシンを用いて、水溶液中のマルチカノニカルシミュレーションを実行し、これらのアミノ酸残基のヘリックス形成傾向性を調べた。溶媒の効果に関しては、溶媒和自由エネルギーが原子団の接触表面積に比例する項を取り入れた。そのパラメータとしては、大井・大島のものを用いた。そして幅広い温度での平均エネルギー、比熱、ヘリックス含有量、Zimm-Bragg 理論のアミノ酸の s 値 (ヘリックス伝搬パラメータ) 等を求めた。

気相中では、ホモアラニンは低温ではほとんどの残基がヘリックス状態にあるが、高温になるとランダム・コイル状態になり、ヘリックス・コイル転移が見られた。一方、ホモグリシンはヘリックスを形成しにくいことがわかった。しかし、ホモアラニンのヘリックス・コイル転移温度は 400K であり非現実的に高いという結果が得られた。

水溶液中のシミュレーションでは、各残基のヘリックス形成傾向性は気相中とそれほど違いがなく、ホモアラニンでは再びヘリックス・コイル転移現象も見られた。また、転移温度は、340K であった。水溶液中では、真空中よりも転移温度が下がり、より現実的な値となった。ホモグリシンはほとんどの残基がヘリックス状態になく、ヘリックスを壊す傾向があることも確認された。また、Zimm-Bragg 理論の s パラメータを計算し、実験との比較を行った。実験からは、これらの s 値が、アラニンは 1.5~2.19、グリシンは 0.05~0.57 であることが示されている。本研究の水溶液中のシミュレーションで得られた s パラメータは、実験と比較できる温度 (約 270K) で、アラニンでは 1.60、グリシンでは 0.27 という値であり、上の実験値と良い一致を示した。

論文の審査結果の要旨

本博士論文は、小ペプチド系の折り畳みと立体構造予測問題を計算機シミュレーションによって調べたものであり、英文100ページ余り、計6章で構成されたものである。研究内容としては、アミノ酸数5個のペプチドであるエンケファリンの立体構造の分類に関するものと、アミノ酸数10個のアラニン、ヴァリン、及びグリシンのアミノ酸ホモオリゴマーのヘリックス・コイル転移に関するものの2つである。溶媒環境としては、気相、疎水効果のみを取り入れたモデル溶媒、及び水溶液の3つの環境が考慮されている。シミュレーション手法としては、徐冷モンテカルロ法 (Monte Carlo simulated annealing) とマルチカノニカル法 (multicanonical algorithm) が使われている。

第1章では、この分野の研究進展状況を把握した概観が述べられ、計算機シミュレーションのような長時間の計算を要する研究では、溶媒効果を効率良く見積もること及びエネルギー極小状態に留まらない強力なシミュレーション法を用いることの重要性が強調されている。

第2章では、本研究で用いられたエネルギー関数及びシミュレーション手法の簡単な説明が述べられている。第3～5章が本研究の主要な成果であり、第6章が結論となっている。

第3章では、気相中及び疎水効果のみを取り入れたモデル溶媒中のエンケファリンの安定なエネルギー極小構造を徐冷モンテカルロ法によって分類した結果が詳しく述べられている。モデル溶媒の寄与はスケール粒子理論に基づくものであるが、スケール粒子理論に基づく計算をモンテカルロシミュレーションに用いることができることを示した初めての例であり、蛋白質のシミュレーションの溶媒効果の取り入れ法に対して新しい可能性を示唆している。

第4章は、気相中のエンケファリンの立体構造の分類をマルチカノニカル法によって、温度の関数として調べたものであり、従来の低温の安定構造の分類に留まらず、高温におけるペプチドの立体構造空間を幅広く探索する事に成功している。また、水素結合パターンによる分類法と立体構造の座標の根自乗平均距離による分類法が一致することを見いだすとともに、一連の小ペプチドの立体構造分類法の集大成とも言うべき結果を得ている。

第5章では、アミノ酸のホモオリゴマーのヘリックス・コイル転移をマルチカノニカル法によって詳しく調べた結果が述べられている。特に、水溶液の寄与として、溶質の露出表面積に比例する項をマルチカノニカルシミュレーションに初めて導入し、水溶液がヘリックスの形成を疎外することを示した。また、アミノ酸のヘリックス形成傾向性が実験の結果と良く一致することが示された。

これらの成果は既に3報の論文として、国際誌に掲載されているが、3報とも難易度の大変高い計算を成功裏に実行したものであり、溶媒効果を含めたより現実に近い系のシミュレーションを実際に実行していく為の指針を与えたものとして極めて独創性に富む研究であると評価され、博士(理学)の学位論文として十分であると、審査員全員の意見が一致した。

申請者が研究内容を説明し、審査員の質疑に随時応答する形式で約3時間の口述試験を

実施した。研究内容は分かりやすくまとめられ、質疑応答は審査員にもプラスになるレベルの高いものであった。計算の難易度の高さ及び研究内容の高い独創性についての説明が控えめに過ぎ質問に対する答も少し遠回り過ぎるとの指摘もあったが、全般的には大変適切な受け答えをした。この質疑応答を通じて、申請者が数々の困難を独力で克服して信頼度の高い計算結果を導き得たこと、そしてブレイクスルーとも言えるシミュレーション手法の確立をなし得た事がより明らかとなった。以上より、学位取得に必要な学力は十分に備わっていると判断された。

また、博士論文は簡明な英語で書かれており、英語力も十分であると判断された。公開発表会においても研究内容を分かりやすく説明し、質問に対して適切な返答をした。

以上を総合的に判断して、2年半の期間ではあるが学位を得るに十分な業績と実力を備えており、最終試験に合格であるということで全審査員の意見が一致した。