

氏 名 小久保 裕功

学 位 記 番 号 総研大乙第 133 号

学位授与の日付 平成16年9月30日

学位授与の要件 学位規則第6条第2項該当

学 位 論 文 題 目 Structure Predictions of Membrane Proteins by Molecular  
Simulations

論 文 審 査 委 員	主 査	教 授	平 田	文 男
		助 教 授	岡 本	祐 幸
		助 教 授	森 田	明 弘
		助 教 授	藤 井	浩
		教 授	美 宅	成 樹 (名古屋大学)

タンパク質の立体構造の解明はポストゲノム時代における最重要テーマの一つである。立体構造はその生化学的機能と深く関係しており、創薬や人工タンパク質の開発などへの応用に直接つながる問題であると同時に、基礎研究の興味としてはタンパク質がどのような物理的原理に基づいて自然の構造に折り畳まれるかはフォールディング問題としてよく知られている問題である。

タンパク質の立体構造は現在までに2万以上知られているが、特に膜タンパク質は遺伝子の約4分の1の数を占めると言われているにもかかわらず、水溶性タンパク質に比べて立体構造が解明されている例が極めて少なく（数十程度）データベースによる構造予測は困難である。一方、アミノ酸配列情報から膜タンパク質かどうかの判別や二次構造予測をするプログラムはSOSUIをはじめ複数あるが、配置配向を含めた三次構造の予測はほとんど手つかずの状態である。

水溶性タンパク質については、アンフィンゼンにより最初に明らかにされたように、その天然構造はアミノ酸配列と周りの溶媒との相互作用により決定される自由エネルギー最小状態にあることが分かっている。よってタンパク質フォールディングは物理化学的原理により決定されるものであり、構造予測は本質的に物理化学の問題として解決可能と考えられる。膜タンパク質においても同じことが期待され、実際現在までのすべての利用可能な実験データは膜タンパク質の構造が熱力学的な平衡構造であることを支持するものである。

既知の膜タンパク質立体構造では、膜貫通部分は $\alpha$ ヘリックスのみか $\beta$ シートのみから構成されている。このことは水溶性タンパク質と違い極めて疎水的な環境にある膜貫通領域では、 $\alpha$ ヘリックスか $\beta$ シートをタンパク質内部で作るほうが水素結合によりエネルギー的に有利であり、脂質二重膜の用意する疎水環境の主要な役割は2次構造形成の促進であることを示唆している。特に、現在までに実験的に明らかになっている膜貫通部分の構造はヘリックスからなるものが大部分である。

ヘリックス系膜タンパク質では two-stage モデルが提案されており、それは Stage 1: 個々の膜貫通領域のペプチド鎖は $\alpha$ ヘリックスを作り、それぞれドメインとして脂質二重膜内で安定である Stage 2: ヘリックス会合により天然構造が形成される、というものである。

本博士論文では、膜貫通ヘリックス系タンパク質を対象とし、アミノ酸配列から計算機シミュレーションを用いて立体構造予測を実現することを目指して研究が行なわれている。

彼らは two-stage モデルをふまえ、レプリカ交換法によりアミノ酸配列からヘリックス系膜タンパク質の天然構造を予測する方法を提案した。その方法は2つのステップから成り、ステップ1: Web 上に公開されている予測ツールを使いアミノ酸配列から膜貫通部分のアミノ酸配列を得る、ステップ2: 1で得たアミノ酸配列から理想ヘリックスを作りシミュレーションにより最小エネルギー構造を探索し、それを予測構造とする、というものである。

ステップ1のツールは今のところまだ残基レベルの精度はないため彼らは実験構造から膜貫通部分に相当するアミノ酸配列情報を取り出し、それをステップ2で使う。ステップ2においてアミノ酸配列から理想ヘリックスを作った後、主鎖は固定し側鎖の二面角と一本一本の $\alpha$ ヘリックスの剛体並進・剛体回転の自由度のみを持つレプリカ交換モンテカルロシミュレーションを行い最小エネルギー構造から構造予測をする。レプリカ交換法は

シミュレーションがエネルギー極小状態に留まるのを避けることができる方法である。タンパク質などの多自由度系ではエネルギー極小状態が無数に存在するため、従来の手法によるシミュレーションではそれらのエネルギー極小状態の一つに留まってしまうという困難があるが、レプリカ交換法では大域的なエネルギー空間を探索することができる。

彼らはこの方法の初めの適用対象として glycophorin A の膜貫通 2 量体の構造予測シミュレーションを行った。その結果、シミュレーションから予測された構造は実験構造と良く一致していた。このことは、この系は脂質二重膜や水などの非等方的で一様でない環境にあるにもかかわらずその立体構造はヘリックス間相互作用により主に決定されることが示された。さらに彼らは極小エネルギー構造を明らかにし天然構造と比較してその特徴を明らかにするために、得られたシミュレーションのトラジェクトリから主成分解析を使い構造分類と自由エネルギー解析を行った。その結果、1. 最小自由エネルギー構造は最小ポテンシャルエネルギー構造と同じである、2. 多自由度の系であるにもかかわらず自由エネルギー面は比較的単純でありわずか 2 成分により記述可能（エネルギーランドスケープ理論の描像と合致）、3. 極小自由エネルギー構造と最小自由エネルギー構造の自由エネルギー差は小さく、各エネルギー項の微妙なバランスで決まる（膜貫通領域のアミノ酸はほとんど疎水性残基から成るが vdW 相互作用だけでなく静電相互作用もまた天然構造の安定性に寄与する）、ことなどが明らかされた。また、最小および極小自由エネルギー構造を複数の可能な予測構造として提案し、実験構造により予測構造を一つに絞るように予測方法が修正された。これらのことはレプリカ交換法により大域的な立体構造空間をサンプルすることが可能になるため初めて議論できるものである。

次に彼らは、同じ方法を使いバクテリオロドプシンの膜貫通ヘリックスがそれのみで自らの相互作用により天然構造へ自己組織化できるかどうかを調べた（ただし主鎖構造については理想ヘリックスではなく実験構造を使った）。ランダムな 7 本の膜貫通ヘリックスの初期配置からレプリカ交換シミュレーションを始めて、実験構造と同じヘリックス配置構造が得られた。このことはヘリックス間相互作用がバクテリオロドプシンの天然構造形成にとって主要な要因であることを示している。言い換えれば、ペプチド鎖間の相互作用が構造形成に最も重要であり、脂質二重膜のハイドロカーボンコア・脂質二重膜の界面・水との複雑な相互作用は構造形成においては 2 次的な効果であることを示唆している。

## 論文審査結果の要旨

タンパク質の立体構造の解明はポストゲノム時代における最重要テーマの一つである。実験的に得られたタンパク質の立体構造は現在までに2万個以上知られているが、特に膜タンパク質は遺伝子の約4分の1の数を占めることがゲノム解析から分かっているにもかかわらず、水溶性タンパク質に比べて立体構造が解明されている例が極めて少ない(数十程度)。本博士論文は実験によらずに、計算機シミュレーションによって、膜タンパク質の立体構造を予測しようというものであり、新手法を提案していることは意義深い。本論文は序章(第1章)及び結論(第6章)を含む6章からなる。

第2章では、本研究の方法が詳しく説明されている。まず、膜タンパク質の膜貫通ヘリックスの部分のみを考慮し、ループ領域を無視するが、脂質2重膜や更にその外側の水溶液の寄与は間接的に拘束条件として取り入れるという大胆な近似について述べる。また、従来のシミュレーション手法より、はるかに広い構造空間をサンプルできるレプリカ交換法や、主成分解析法などの重要な手法が丁寧に説明されている。

第3章では、この新しい立体構造予測法を2本の膜貫通ヘリックスからなるglycophorin Aに適用した結果を報告している。そして、NMR実験の結果と良く似た構造が最小ポテンシャルエネルギー状態として予測されることを示した。

第4章では、このglycophorin Aのシミュレーション結果を主成分解析によって、更に詳しく調べた結果を述べる。特に、第一主成分軸と第2主成分軸についての自由エネルギー地形を求めることによって、シミュレーションで得られた結果を効率良く分類することを可能にし、前章で最小ポテンシャルエネルギー状態が最小自由エネルギー状態でもあることを示した。

第5章では、本手法を7本の膜貫通ヘリックスからなるbacteriorhodopsinに適用した結果を報告している。特に、自由エネルギー極小状態の一つが実験で得られた構造と極めて似ている構造を持っていることを示し、この手法の有効性が裏付けられている。

以上の2つの例から、本論文では、膜タンパク質の立体構造形成の最終段階には、膜貫通ヘリックスの側鎖間のパッキングが重要であることを示しており、高く評価される。

本論文の内容は明快なものであり、独創性も高いものと判断された。また、申請論文は分かり易い英語で書かれており、語学力も十分と判断される。また、本研究の内容は、国際学術雑誌に3報の論文(*Chem. Phys. Lett.*, 2報; *J. Chem. Phys.*, 1報)として、既に発表され、更にもう1報(*J. Phys. Soc. Jpn.*)が印刷中である。

以上のことから、本申請論文は博士(理学)の学位論文として十分であると判断する。

口述試験においては、出願者がその学位論文の内容に基づいて質疑応答の時間も含め約2時間の研究発表を行い、その後、約30分程度の質疑応答を行った。研究発表は研究の背景も含めて要領よくまとめられ、質問に対しても的確な回答を行った。一方、過去における仕事との関係を十分に示せば、研究の困難さやその意義をより強くアピールできたのではないかという指摘もなされた。公開発表会においては、出願者が所定時間の研究発表を行った後、質疑応答を行った。この中で出願者はよく準備された発表を行うとともに大部分の質問に対して的確な回答を行ったと判断する。以上により、審査委員全員の一致した評価として、出願者が本学の理学博士として適格であると判定した。