

氏 名 Mahroof KALATHINGAL

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2260 号

学位授与の日付 2021年9月 28日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Theoretical Studies on Structure, Dynamics, and Membrane  
Insertion of Polytheonamide B

論文審査委員 主 査 石崎 章仁  
構造分子科学専攻 教授  
齊藤 真司  
機能分子科学専攻 教授  
奥村 久士  
構造分子科学専攻 准教授  
岡崎 圭一  
機能分子科学専攻 准教授  
長岡 正隆  
名古屋大学 大学院情報学研究科 教授

(様式3)

## 博士論文の要旨

氏名 Mahroof KALATHINGAL

論文題目 Theoretical Studies on Structure, Dynamics, and Membrane Insertion of Polytheonamide B

Almost all biological processes ultimately rely on conformational fluctuations and changes in proteins. These protein dynamics are complex and fascinating, occurring on a wide range of timescales from subpicoseconds to seconds and longer. Despite the limited accessible timescales of most all-atom molecular dynamics (MD) simulations, with timescales of a few hundred microseconds, the MD simulations can reveal the protein structure and dynamics in atomic detail, which are difficult to be obtained from experiments. Herein, the structure and dynamics in model transmembrane peptide, polytheonamide B (pTB), are investigated theoretically using all-atom MD simulations.

The pTB is a potent cytotoxic peptide obtained from the marine sponge *Theonella swinhoei*. The potent cytotoxicity of pTB is related to its channel-forming activity across the target cell membranes. The pTB consists of 48-residues and is the most heavily posttranslationally modified biomolecule known at present. The pTB has several unique structural features. First, pTB has alternate D- and L-amino acids throughout the sequence, allowing the peptide to take a right-handed  $\beta^{6,3}$ -helical conformation. Second, there are eight types of unnatural amino acids in pTB:  $\beta$ -hydroxyvaline, *tert*-leucine,  $\gamma$ -N-methylasparagine,  $\gamma$ -N-methyl-*threo*- $\beta$ -hydroxyasparagine,  $\beta$ -methylglutamine,  $\beta$ -methylisoleucine,  $\beta,\beta$ -dimethylmethionine sulphoxide, and allo-threonine. As a result, 23 residues in pTB are unnatural amino acids. Third, the N-terminal of pTB is capped by a highly hydrophobic 5,5-dimethyl-2-oxo-hexanoyl group. In addition, the hydrophobicity of the residues decreases gradually from the N-terminal to the C-terminal. Furthermore, the pTB channel has unique tertiary

structural features. The pTB has a long side chain - side chain hydrogen bond strand outside the pore, starting from the middle of the N-terminal half up to the C-terminal. The 40 Å long pTB can spontaneously insert into the target cell membrane and works as a monomeric channel. It has been reported in experiments that the pTB channel allows permeation of monovalent cations with the ionic current in the order of  $H^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$ . However, the ion permeation mechanism of the pTB channel has not been well understood both experimentally and theoretically. In the present Ph.D. thesis, the structure, fluctuations, and dynamics of pTB channel and solvent molecules inside the channel in different environments; and the energetics and dynamics of membrane insertion of pTB are investigated theoretically at the molecular level.

It has been suggested that the collective dynamics of water molecules inside ionic channels have a significant role in permeating ions through the channels. So, in Chapter 1, as a first step toward understanding the ion permeation mechanism of the pTB channel, the structure, fluctuation, and dynamics of pTB itself and solvent molecules inside pTB in three different environments, water, POPC bilayer, and 1:1 chloroform/methanol mixture, are investigated. Since there are eight non-standard residues in pTB, the molecular parameters for these residues are developed prior to the MD simulations. The newly determined parameters are validated by comparing the average structure of pTB calculated in the mixed solvent with the NMR-derived structure in the mixed solvent. The current study reveals that the water molecules inside the pTB channel show collective motions, both translationally and orientationally, due to the strong hydrogen bonds between neighboring water molecules. It is found that the motions of methanol molecules inside the channel are not correlated because of the absence of strong hydrogen bonds between adjacent methanol molecules.

In Chapter 2, the spontaneous membrane insertion of pTB, which is important for understanding its cytotoxicity, is investigated. The process of spontaneous membrane insertion of transmembrane peptides is crucial for toxin actions, viral infections, and

antimicrobial defense. The understanding of the mechanism of membrane insertion is essential for the development of novel therapeutic drugs against bacterial and viral infections. However, the mechanism of this process is not clearly understood yet. The pTB is one such potent cytotoxic peptide that spontaneously inserts into the target cell membranes, and is an ideal model transmembrane peptide to explore the underlying molecular mechanism of the insertion process. The free energy calculations using the replica-exchange umbrella sampling simulations present an energy cost of 4.3 kcal/mol located at the membrane surface for the membrane uptake of pTB from bulk water. The simulation results support the experimental observation of the spontaneous membrane insertion of pTB led by the hydrophobic N-terminal. It is found that the insertion of pTB proceeds with only the local lateral compression of the membrane, in three successive phases: "landing," "penetration," and "equilibration" phases. Depending on whether or not pTB is trapped in the upper leaflet of the membrane during the penetration phase, the insertion process can occur in two possible pathways, namely "trapped" and "untrapped" insertions. The mechanism of the spontaneous "vectorial insertion" of pTB can be exploited to design new peptides and therapeutic drugs of similar features.

The cytotoxicity of pTB is related to its channel activity, e.g., motions of ions and water molecules, across the target cell membrane after spontaneously inserting into the membrane. Therefore, the above studies summarized in the present Ph.D. thesis contribute to the molecular understanding of the cytotoxicity of pTB.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏 名 Mahroof KALATHINGALTitle  
論文題目 Theoretical Studies on Structure, Dynamics, and Membrane Insertion of Polytheonamide B

生物学的プロセスは、タンパク質の構造ゆらぎや変化に依存している。このようなタンパク質の構造揺らぎ・変化ダイナミクスは、サブピコ秒から数秒以上に至る幅広い時間スケールで起こる複雑なものであり、計算化学では様々な分子動力学 (MD) シミュレーションを用いた研究が行われている。全原子モデルにもとづく MD シミュレーションは、到達可能な時間スケールが数百マイクロ秒と限定されてはいるが、実験で得ることの困難なタンパク質の構造やダイナミクスの原始解像度の描像を明らかにすることができ、さらに、実験と理論を補完することが可能な強力な研究手法である。

polytheonamide B (pTB) は海綿 *Theonella swinhoei* から得られる細胞傷害性ペプチドであり、その強力な細胞毒性は標的となる細胞膜にチャンネルを形成する活性に関連している。48 残基からなり 40Å の長さ及び幾つかの特徴的な構造を有する pTB は、標的細胞の膜に自発的に挿入することができ、単量体のチャンネルとして機能する。これまでの実験から、pTB チャンネルは一価のカチオンを透過し、 $H^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$  の順にイオンが透過されやすいことが報告されている。しかし、pTB の自発的膜挿入およびイオン透過の詳細な分子メカニズムは解明されていない。出願者は本博士論文において、異なる環境下における pTB チャンネルとチャンネル内の溶媒分子の構造、揺らぎ、ダイナミクスを全原子 MD シミュレーションに基づいて明らかにし、さらに、pTB の膜挿入のエネルギーとダイナミクスを明らかにしている。

第一章では、全原子モデルにもとづく MD シミュレーションの意義、pTB に関する研究の背景と本研究の位置づけについて記述している。

第二章では、pTB チャンネルのイオン透過機構を理解するための第一歩として、水、1:1 クロロホルム/メタノール混合液、PO ホスファチジルコリン (POPC) 二重膜の 3 種類の異なる環境下における pTB 自身および pTB 内の溶媒分子の構造、およびその揺らぎ・ダイナミクスを解析している。pTB には 8 種類の非天然アミノ酸残基が存在する。そこで、これら残基の分子パラメータを新たに開発し、計算により得られた構造と混合溶媒中の実験構造を比較することにより開発されたパラメータの検証を行っている。また、pTB チャンネル内の水分子が隣接する水分子間の強い水素結合により並進および配向の集団的な運動をすることを明らかにしている。さらに、隣接するメタノール分子間の水素結合は弱いいため、チャンネル内部のメタノール分子の運動には相関がないことを明らかにしている。

第三章では、pTB の細胞毒性を理解する上で重要となる pTB の自発的な膜挿入について調べている。レプリカ交換アンブレラサンプリングシミュレーションを用いた自由エネルギー計算により、水中から pTB が膜に取り込まれる際の自由エネルギーコストは約

4kcal/molであることを明らかにしている。この結果は、疎水性の N 末端に導かれて pTB が自発的に膜に挿入されるという実験結果を支持するものである。自由エネルギー解析および MD シミュレーションの結果から、pTB の挿入は「着地」「侵入」「平衡」の 3 つの連続した段階で進行することを明らかにしている。また、侵入段階で pTB が二重膜の上の層に捕捉されるかどうかにより、挿入が捕捉される場合と捕捉されずに円滑に挿入される場合の 2 つの膜挿入が起こることを明らかにしている。さらに、POPC 二重膜が pTB の長さと同様の膜厚をもつため膜に挿入した後の pTB の傾斜角は比較的小さく、膜挿入において pTB は局所的影響しか与えないことも明らかにされている。

第四章では、本研究の総括を行い、pTB の細胞毒性の分子的理解に向けた今後の展望を述べている。

膜貫通型ペプチドの自発的膜挿入過程は、毒素の作用、ウイルス感染、抗菌防御などに重要であり、膜挿入機構の理解は細菌やウイルス感染症に対する新しい治療薬の開発に不可欠である。したがって、本博士論文にまとめられた研究成果は、細胞毒性の分子的理解に大きく貢献するものである。本学位論文の第二章は既に査読付き国際学術誌に発表されており、第三章も査読付き国際学術誌に投稿中である。その内容は国際的水準を満たしていると評価された。

以上により、本論文は博士（理学）の学位授与に値すると審査員全員一致で判断した。