

氏 名 宮澤 和久

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2296 号

学位授与の日付 2022 年 3 月 24 日

学位授与の要件 物理科学研究科 構造分子科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 クマムシ特有の分泌型熱安定性タンパク質の分子動力学シミュレーション

論文審査委員 主 査 加藤 晃一
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
西村 勝之
機能分子科学専攻 准教授
岡崎 圭一
機能分子科学専攻 准教授
光武 亜代理
明治大学 理工学部 准教授

博士論文の要旨

氏 名 宮澤 和久

論文題目 クマムシ特有の分泌型熱安定性タンパク質の分子動力学シミュレーション

クマムシは、体長が最大 1mm 程度の水棲動物であり、宇宙空間や強力な放射線照射をはじめ極端な環境における耐性があることで広く知られている。一方で、それらの環境下でクマムシの細胞を保護する分子メカニズムには不明な部分が多い。先行研究では、クマムシ特有の生体分子が、クマムシの環境耐性に必要不可欠であることが示唆された。それらの生体分子に、分泌型熱安定性 (SAHS) タンパク質がある。SAHS タンパク質の構造は β バレル構造であり、哺乳類の生体内で脂肪酸を運搬する脂肪酸結合タンパク質 (FABP) に類似する。一方で、SAHS タンパク質と FABP のアミノ酸配列の相同性が低いことから、SAHS タンパク質の性質は、FABP と異なることが期待される。一般にタンパク質の性質は、生体内における機能と強く関係している。したがって、SAHS タンパク質の機能を考察するためには、その性質を明らかにすることが重要である。そこで本研究では、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いて、SAHS タンパク質の性質を調べた。

本博士論文は、序章・終章を含め全四章で構成される。序章では本研究の位置付けと、分子動力学法の基礎事項を収録している。

第一章前半では、環境耐性が特に強いクマムシ *Ramazzottius varieornatus* (Rv) がもつ SAHS タンパク質のひとつ RvSAHS1 と、ヒトの肝臓に豊富に見つかる FABP (LFABP) の、水溶液中における MD シミュレーションの結果を報告する。両タンパク質のシミュレーションの結果を比較することで、RvSAHS1 について以下二点の性質を明らかにした。(1) RvSAHS1 のリガンド取り込み口は、LFABP の取り込み口よりも柔軟であり、かつより広く開くことができる。この原因は、LFABP の β D ストランドと β E ストランドの間に塩橋が生じている一方で、RvSAHS1 にはこの塩橋が生じていないことが考えられる。(2) RvSAHS1 の N 末端にある天然変性領域は揺らぎが大きく、両親媒性の α ヘリックスを形成することができる。

第一章後半では、SAHS タンパク質の乾燥過程におけるシミュレーションの結果を報告する。水溶液中だけでなく乾燥過程の性質をも調べたのは、SAHS タンパク質が、クマムシが乾燥に伴って移行する「乾眠状態」において機能している可能性があるためである。乾燥過程のシミュレーションの結果から、RvSAHS1 について以下二点の性質を明らかにした。(3) RvSAHS1 のリガンド取り込み口は乾燥に伴って次第に閉じていく。(4) 完全に乾燥し水分子が存在しない状況であっても RvSAHS1 は β バレル構造を維持する。

水溶液中および乾燥過程のシミュレーションで明らかになった (1)-(4) の性質をもとに、乾眠における RvSAHS1 の機能を考察した。生体内における RvSAHS1 の機能について、先行研究では、RvSAHS1 の結晶構造が FABP と類似すること、そして FABP のひとつ LFABP がヘムと結合することから、ヘム結合タンパク質としての機能が提案された。ヘムはミオグロビンなどに結合して生体内で酸素を運搬する一方で、遊離したヘムは細胞毒性

のある活性酸素種の発生源になることが知られている。RvSAHS1 は、クマムシの体内が湿潤の間にヘムを β バレル内側に取り込み、乾眠状態の間は入口を閉じてヘムが溶媒に露出させないことで、活性酸素種の発生を抑制している可能性がある。

第二章では、RvSAHS1 の I113F 変異体と D146T 変異体の MD シミュレーションの結果を報告する。乾眠能力のある生物の多くでは、乾眠能力は特定の発達段階に特異的に生じる。一方で Rv は、成虫段階だけではなく、全ての発達段階で乾眠状態に移行することができる。先行研究によって、Rv の産卵後 3 日目の胚に顕著に発現する SAHS 遺伝子が同定された。I113F と D146T は、この遺伝子によって合成される SAHS タンパク質のアミノ酸配列を RvSAHS1 と比較したときの、特徴的な差異である。

シミュレーションの結果、I113F 変異と D146T 変異によって、RvSAHS1 のリガンド取り込み口の性質が変化することが明らかになった。これらの変化はそれぞれ対照的であり、I113F 変異体はリガンド取り込み口が閉まる傾向があるのに対し、D146T 変異体は開く傾向があった。I113F 変異体のリガンド取り込み口が閉まる性質の原因は、I113F 変異によって β バレル内側で疎水性ネットワークが強化されることであると考えられる。一方で D146T 変異体のリガンド取り込み口が開くメカニズムを以下の通りに考察した。(i) D146T 変異により、T146 が、隣り合う K164 から離れる (ii) T146 が、隣り合う V143 を押す (iii) さらに V143 が、隣り合う G122 を押す (iv) G122 を中心に、 β F- β G ループの水素結合が安定化する (v) β F ストランドが外側に反れた形状をしているため、 β E- β F ループが β バレルの外側に解離する。

野生型からの変異箇所は一箇所のみで、さらに変異がリガンド取り込み口から離れた場所にあるのにもかかわらず、リガンド取り込み口の開閉傾向には明白な違いを確認できた。これは、SAHS タンパク質のリガンド取り込み口の性質が、アミノ酸配列に敏感であることを示している。現在、Rv には 13 個の SAHS 遺伝子が報告されている。本研究結果を踏まえると、それぞれ入り口の開閉の傾向が異なる可能性がある。

終章では、本研究で明らかになった RvSAHS1 の性質を総括する。SAHS タンパク質はクマムシ特有のタンパク質であり、クマムシの乾眠に関係している可能性が示唆されているにもかかわらず、その原子レベルの構造の性質はほとんど調べられてこなかった。本研究は、SAHS タンパク質の構造の原子レベルの性質を、MD シミュレーションで明らかにした世界で初めての報告である。

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 宮澤 和久

Title
論文題目 クマムシ特有の分泌型熱安定性タンパク質の分子動力学シミュレーション

クマムシは体長が最大 1mm 程度の水棲動物であり、宇宙空間や強力な放射線照射をはじめ極端な環境における耐性があることで広く知られている。一方で、それらの環境下でクマムシの細胞を保護する分子メカニズムには不明な部分が多い。先行研究では、クマムシ特有の生体分子がクマムシの環境耐性に必要不可欠であることが示唆された。それらの生体分子に分泌型熱安定性 (SAHS) タンパク質がある。SAHS タンパク質の構造は β バレル構造であり、哺乳類の生体内で脂肪酸を運搬する脂肪酸結合タンパク質 (FABP) に類似する。一方で、SAHS タンパク質と FABP のアミノ酸配列の相同性が低いことから、SAHS タンパク質の性質は FABP と異なることが期待される。一般にタンパク質の性質は、生体内における機能と強く関係している。したがって、SAHS タンパク質の機能を考察するためには、その性質を明らかにすることが重要である。そこで本研究では、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いて SAHS タンパク質の性質を調べた。

本博士論文は、序章・終章を含め全四章で構成される。序章では本研究の位置付けと、分子動力学法の基礎事項を収録している。

第一章前半では、環境耐性が特に強いクマムシ *Ramazzottius varieornatus* がもつ SAHS タンパク質のひとつ RvSAHS1 と、ヒトの肝臓に豊富に見つかる FABP (LFABP) の水溶液中における MD シミュレーションの結果を報告している。両タンパク質のシミュレーションの結果を比較することで、RvSAHS1 について以下の二点の性質を明らかにした。(1) RvSAHS1 のリガンド取り込み口は、LFABP の取り込み口よりも柔軟であり、かつより広く開くことができる。この原因は、LFABP の β D ストランドと β E ストランドの間に塩橋が形成される一方で、RvSAHS1 にはこの塩橋が形成されていないことにより説明される。(2) RvSAHS1 の N 末端にある天然変性領域は揺らぎが大きく、両親媒性の α ヘリックスを形成することができる。

第一章後半では、SAHS タンパク質の乾燥過程におけるシミュレーションの結果を報告している。水溶液中だけでなく乾燥過程の性質も調べたのは、クマムシが乾燥に伴って移行する「乾眠状態」において SAHS タンパク質が機能している可能性があるためである。乾燥過程のシミュレーションの結果から、RvSAHS1 について以下の二点の性質を明らかにした。(3) RvSAHS1 のリガンド取り込み口は乾燥に伴って次第に閉じていく。(4) 完全に乾燥し水分子が存在しない状況であっても RvSAHS1 は β バレル構造を維持する。

さらに、水溶液中および乾燥過程のシミュレーションで明らかになった (1)–(4) の性質をもとに、乾眠における RvSAHS1 の機能を考察している。生体内における RvSAHS1 の機能について、先行研究では、RvSAHS1 の結晶構造が FABP と類似すること、また FABP のひとつ LFABP がヘムと結合することから、ヘム結合タンパク質としての機能が提案さ

れた。ヘムはミオグロビンなどに結合して生体内で酸素を運搬する一方で、遊離したヘムは細胞毒性のある活性酸素種の発生源になることが知られている。RvSAHS1は、クマムシの体内が湿潤の間にヘムを β バレル内側に取り込み、乾眠状態の間は入口を閉じてヘムを溶媒に露出させないことで、活性酸素種の発生を抑制している可能性を指摘している。

第二章では、RvSAHS1のI113F変異体とD146T変異体のMDシミュレーションの結果を報告している。乾眠能力のある生物の多くで、乾眠能力は特定の発達段階に特異的に生じる。一方、クマムシは成虫段階だけではなく、全ての発達段階で乾眠状態に移行することができる。先行研究によって、クマムシの産卵後3日目の胚に顕著に発現するSAHS遺伝子が同定された。I113F変異とD146T変異はこの遺伝子によって合成されるSAHSタンパク質のアミノ酸配列をRvSAHS1と比較したときの特徴である。

シミュレーションの結果、I113F変異とD146T変異によって、RvSAHS1のリガンド取り込み口の性質が変化することが明らかになった。これらの変化はそれぞれ対照的であり、I113F変異体はリガンド取り込み口が閉まる傾向があるのに対し、D146T変異体は開く傾向があった。I113F変異体のリガンド取り込み口が閉まる性質の原因は、I113F変異によって β バレル内側で疎水性ネットワークが強化されることであると考察されている。また、D146T変異体のリガンド取り込み口が開くメカニズムは以下のように考察されている。(i) D146T変異により、T146が隣り合うK164から離れる。(ii) T146が隣り合うV143を押す。(iii) さらにV143が隣り合うG122を押す。(iv) G122を中心に β F- β Gループの水素結合が安定化する。(v) β Fストランドが外側に反り返った形状をしているため、 β E- β Fループが β バレルの外側に解離する。

野生型からの変異箇所は一箇所のみで、さらに変異がリガンド取り込み口から離れた場所にあるのにもかかわらず、リガンド取り込み口の開閉傾向には明白な違いが確認されている。これは、SAHSタンパク質のリガンド取り込み口の性質が、アミノ酸配列に敏感であることを示している。現在、*Ramazzottius varieornatus*には13個のSAHS遺伝子が報告されている。この研究結果を踏まえると、それぞれ入り口の開閉の傾向が異なる可能性がある。

終章では、本研究で明らかになったRvSAHS1の性質を総括している。SAHSタンパク質はクマムシ特有のタンパク質であり、クマムシの乾眠に関係している可能性が示唆されているにもかかわらず、その原子レベルの構造の性質はほとんど調べられてこなかった。本研究は、SAHSタンパク質の構造の原子レベルの性質を、MDシミュレーションで明らかにした世界で初めての報告である。

以上の研究は、理論生物物理学の手法を用いてクマムシ特有のタンパク質の性質を解明し、その乾眠機構の理解に大きく貢献するものである。本学位論文の大半は既に1報の査読付き国際学術誌に発表されており、残りの部分も査読付き国際学術誌に現在投稿中である。その内容は国際的にも高い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。