

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 15 年度博士課程 入学
氏名 佐藤 大介
指導教員 清水 謙多郎

論文題目

分子動力学シミュレーションを用いた
ミニタンパク質のフォールディング機構の解明

1. 序

1.1 タンパク質のフォールディング

生命現象の担い手であるタンパク質は、固有の立体構造（天然状態）に折り畳まれることで、その生化学的機能を発揮する。タンパク質の配列からの天然状態の立体構造の予測、また天然状態に至る経路を求める問題は、一般にフォールディング問題と呼ばれ、分子生物学の分野における未解決問題の一つである。このタンパク質のフォールディング問題を解決することは、タンパク質分子の機能発現の機構を解明すると同時に、創薬、特定の生化学的機能を持った人工タンパク質の設計開発、アルツハイマー病などのタンパク質の誤ったフォールディングに由来するとされる病理の解明へと直接つながると期待される。

1.2 フォールディングシミュレーション

Christian Anfinsen による Ribonuclease A の巻き戻し実験によって、タンパク質のフォールディングは配列情報のみによって決定されることが示唆された。一方で計算機技術・資源の充実にもかかわらず、配列情報のみを用いた計算機シミュレーションによる立体構造の予測は依然として困難な問題である。タンパク質のフォールディングシミュレーショ

ンを実現する上での困難は主に2点ある。第一は構造探索の問題である。熱力学的仮説によればタンパク質の天然構造は溶媒環境を含めた自由エネルギー最小状態に対応する。しかしながらタンパク質分子の内部自由度が膨大なため、構造探索を行う際、無数に存在するエネルギー極小状態にとどまり自由エネルギー最小状態に到達できないという問題がある。第二は溶媒効果の膨大な計算量である。タンパク質分子は生体内において溶液環境にある。シミュレーションの系において明示的に水分子を配置した際、その原子数の2乗に比例して計算量が増大することになる。よって、タンパク質のフォールディングシミュレーションを実現するためには、構造探索手法の改良と効率的な溶媒効果の計算手法の両立が要求される。本研究では、こうした困難に挑戦し、1) タンパク質分子の配列情報のみに基づいた立体構造予測に有効な全原子シミュレーション法を確立し、2) タンパク質のフォールディングに重要とされる配列上離れた残基同士による水素結合・疎水コア形成のメカニズムを原子レベルで解明することを目指した。

2. 方法

2.1 計算手法

従来型の定温分子動力学シミュレーションでは構造探索範囲が初期構造近傍に限定されてしまい自由エネルギー最小状態に到達することが困難であるという問題が知られている。この問題を解決するための構造探索手法の一つとして、拡張アンサンブル法が提案されている。拡張アンサンブル法ではエネルギー軸上をランダムウォークすることでエネルギー極小状態から効率良く抜け出し、自由エネルギー最小状態へ到達することを目指す。本研究では拡張アンサンブル法の一つであるマルチカノニカル分子動力学法を適用した。マルチカノニカル分子動力学法では、一度広域な構造探索を行った後、**reweighting** と呼ばれる操作を施すことで任意の温度でのカノニカル分布を得られるという特徴を持っている。この特徴により、最終的な立体構造予測だけにとどまらず、多様な変性状態やフォールディング中間体を含む自由エネルギー地形を得ることができる。

また、本研究では、溶媒効果として連続誘電体モデルの一種である GB/SA モデルを適用した。GB/SA モデルを適用することにより、溶媒効果の計算の際に生ずる膨大な計算コストを節約し、現実的な計算資源の範囲内で、溶媒効果の考慮と十分な構造探索を両立可能とした。

次に、分子動力学シミュレーションから得られた軌跡から「とりやすい構造」を抽出するために、クラスタリング解析を行った。クラスタリング解析は以下の手順で実行した。まず、存在確率の高い順番に構造を選択する。次に、全重原子 RMSD 値が 2.0 \AA 以内の構造を選択し、選択された構造から平均構造を算出しこれをクラスタ中心とする。算出されたクラスタ中心から全重原子 RMSD で 2.0 \AA 以内の構造を選択し、平均構造を算出しクラスタ中心を更新する。クラスタ中心位置が収束するまでこの手続きを繰り返す。

2.2 Chignolin

Chignolin(GYDPETGTWG)は、protein G の B1 ドメインの 45~52 残基のアミノ酸配列に基づいて人工的に設計・合成された 10 アミノ酸から構成されるポリペプチド鎖である。現在までに、水溶液中において β -hairpin を安定に形成することが、核磁気共鳴 (NMR) 法、円偏光二色性 (CD) 分散の実験によって確かめられている。また、温度変化に伴い可逆的かつ協同的な 2 状態構造転移を示すことから、現在までのところ「最小のタンパク質」と呼ばれている。本研究ではまず、chignolin に対するフォールディングシミュレーションを実行し、配列上離れた残基同士による水素結合・疎水コア形成のメカニズムを含むフォールディング過程を原子レベルで解明することを目指した。具体的には、chignolin に対して完全に伸展した構造を初期構造としてマルチカノニカル分子動力学計算を行い、フォールディング過程における構造分布の解析を行った。

2.3 GPM12

Chignolin の設計構造鋳型である protein G の B1 ドメインの 45~52 残基のアミノ酸配列に対応する GPM12 (GYDDATKTFG) と呼ばれる分子は、chignolin と同じ実験条件下において、水溶液中でランダム様構造をとっているとの報告がなされていた。本研究では chignolin と同様の計算プロトコルを用いたフォールディングシミュレーションを実行し、chignolin とのフォールディング自由エネルギー地形の比較を試みた。

2.4 WW domain

WW ドメインは、リガンド分子やジスフィルド結合の助けなしで、安定した 3 本の逆平行 β シート構造を形成することのできる約 40 残基のミニタンパク質である。両末端近傍に保存されたトリプトファンを持つのが特徴で、プロリンを多く含むリガンドと結合することで、シグナル伝達に関与している。現在までに構造決定されている WW ドメインのうち、peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (Pin1) 由来のもののフォールディング過程は 2 状態遷移であり、formin-binding protein (FBP) 由来のものは、30 番目のトリプトファンをアラニンに置換することによって、そのフォールディング過程を 3 状態転移から 2 状態転移へ調節可能であることが実験的に確かめられている。本研究では、WW ドメインを対象としたフォールディングシミュレーションを行い、より巨大なタンパク質に対するフォールディングシミュレーションの手順を確立すると同時に、逆平行 β シート構造の形成メカニズムを原子レベルで解明することを目的とした。

3. 結果と考察

3.1 Chignolin

180 ns のマルチカノニカル分子動力学シミュレーションを行った結果、290 K から 700 K のエネルギー領域を覆うマルチカノニカルアンサンブルを得た。得られた構造アンサンブル

ル中に、実験構造に対する主鎖 $C\alpha$ RMSD 値が 0.5 \AA 以下、また NMR 実験の際に用いられた拘束条件を 99 % を満たす構造群を見出すことに成功した。引き続き行ったクラスタリング解析からは、これらの構造群が高い存在確率を伴って構造空間中でクラスタを形成しており、天然構造安定化に重要な主鎖間水素結合、芳香環側鎖の配向を再現していることが確認された。シミュレーション中における変性状態 ($C\alpha$ RMSD $\geq 4.0 \text{ \AA}$) から天然状態 ($C\alpha$ RMSD $\leq 1.0 \text{ \AA}$) へ至るフォールディングイベントは 159 回に及んだ。

3.2 GPM12

Chignolin と同様の手法で 180 ns のマルチカノニカル分子動力学シミュレーションを実行し、300 K から 700 K のエネルギー領域を覆うマルチカノニカルアンサンブルを得た。得られた構造アンサンブル中に、protein G の実験構造に対する主鎖 $C\alpha$ RMSD 値が 0.33 \AA の構造を見出すことに成功した。引き続き行ったクラスタリング解析では、存在確率の高いクラスタに多様な 2 次構造傾向が観察され、GPM12 が水溶液中で特定の構造を保持しないという実験と一致する結果が得られた。また chignolin と比較して、GPM12 においては Asp4 と Lys7 間の相互作用によって β -hairpin 形成が不安定化されていることが明らかとなった。

3.3 WW domain

完全に伸展した構造を初期構造として、マルチカノニカル分子動力学シミュレーションを実行した。FBP の W30A 変異体、および Pin1 の系に対する 130 ns のシミュレーションから、700 K から 350 K のエネルギー領域を覆うマルチカノニカルアンサンブルを得た。得られた構造アンサンブル中に、FBP の W30A 変異体 Pin1 とともに、ループ部を除いた NMR 構造との RMSD で約 3.7 \AA の構造を見出すことに成功した。

4. 結論

水溶液中で安定な β -hairpin 構造を形成維持できるタンパク質である chignolin に対して完全に伸展した状態を初期構造としたフォールディングシミュレーションを実行し、NMR 実験構造に対する $C\alpha$ RMSD 値が 0.5 \AA 以下、また構造決定の際に用いられた拘束条件を 99 % を満たす構造群を見出すことに成功した。また、同じ計算手法を GPM12 に適用したところ、計算の軌跡に対するクラスタリング解析から、chignolin と同じ実験条件下で特定の構造を保持しないという配列依存性を再現する結果を得ることができた。さらに、水溶液中で安定した 3 本の逆平行 β シート構造を形成することのできるより配列の長い WW domain に対してこの計算手法を適用したところ、実験構造に対して RMSD 値が約 3.7 \AA の構造を見出すことに成功した。今後は、現在手がけている他の様々な配列種に対するフォールディングシミュレーションを通して、Anfinsen によって示唆されたタンパク質立体構造形成の配列依存性の解明が期待される。