

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐藤 大介

---

生命現象の主な担い手であるタンパク質は、固有の立体構造に折り畳まれることではじめて、その生化学的機能を発揮することができる。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。本研究は、第一に、ミニタンパク質のフォールディングを計算機シミュレーションによって再現することで手法の妥当性を示し、第二に、点変異体に対するシミュレーションを通してフォールディング機構の配列依存性を原子レベルで解明することを試みている。本文は5章より構成されている。

第1章では本研究の背景と意義について述べたうえで、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現状の問題点を具体的に示している。第2章では、第1章で述べられた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を解決するために用いられた研究手法が述べられている。具体的には、構造探索手法として拡張アンサンブル法的一种であるマルチカノニカル分子動力学法を適用し、溶媒効果を連続誘電体モデルの一种であるGB/SAモデルによって考慮した。また、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」を抽出するためのクラスタリング解析について述べられている。

第3章では研究対象となった分子と具体的な計算手順について述べられている。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 $\beta$ -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。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、フォールディング機構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。次に、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るGPM12(GYDDATKTFG)に対して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。最後に、より長い配列に対するフォールディングシミュレーションの手法の確立と、逆平行シート構造の形成メカニズ

ムの解明を目的として、機能ドメインである WW domain を対象としたフォールディングシミュレーションを行った。

第4章では、結果と考察が述べられている。まず、chignolin の計算からは、得られた構造アンサンブル中に、NMR 実験構造に対する主鎖 C RMSD 値が 0.5 Å 以下、また NMR 実験の際に用いられた拘束条件の 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 RMSD  $\geq$  4.0 Å) から天然状態 (C RMSD  $\leq$  1.0 Å) へ至るフォールディングイベントは 159 回に及んだ。次に、GPM12 のフォールディングシミュレーションと引き続き行ったクラスタリング解析から、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、追加的に行った点変異体に対するシミュレーションから、chignolin と比較して GPM12 においては Asp4 と Lys7 間の塩橋によって  $\beta$ -hairpin 形成が不安定化されていることが実証された。最後に、WW domain の計算からは、得られた構造アンサンブル中に、ループ部を除いた NMR 構造との RMSD で約 3.7 Å の構造を見出すことに成功した。

第5章では、本研究の結論が述べられている。本研究では、水溶液中で安定な  $\beta$ -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現し、NMR 実験構造に対する C RMSD 値が 0.5 Å 以下、また構造決定の際に用いられた拘束条件の 99 % を満たす構造群を見出し、フォールディングの鍵となる相互作用を同定することに成功した。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、NMR 構造に対して RMSD 値が約 3.7 Å の構造を見出すことに成功した。

以上、本論文では、タンパク質のフォールディングを計算機実験により再現し、タンパク質の折りたたみ機構とその配列依存性を原子レベルで明らかにすることに成功した。その研究の成果は学術上・応用上の価値がきわめて高く、今後、同様の研究アプローチによって、誤ったフォールディングによって引き起こされるとされる疾患の分子機構解明、特定の機能を持った新規タンパク質のデザインに大きく貢献するものと期待される。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。