

論文審査の結果の要旨

氏名 荳口友隆

本研究の目的は、蛋白質のアンフォールディング過程において蛋白質分子はどのような構造変化を経ていくか、またそれはどのような物理化学的機構によるものなのかを原子レベルで明らかにすることである。そのために論文提出者は、分子動力学法 (MD) を用いてヤギ α ラクトアルブミンを高温でアンフォールディングさせるシミュレーションを行い、得られたトラジェクトリーを新しく開発した方法で解析することで、ヤギ α ラクトアルブミンのアンフォールディング過程における構造変化及び、遷移状態の物理化学的特性を明らかにした。

蛋白質の機能は、生体内でアミノ酸残基が連なったランダム状高分子鎖 (一次元情報) から固有の天然三次構造 (三次元情報) に可逆的に折れ畳むこと (フォールディング) によって発揮される。そのため、このフォールディング反応の原理を明らかにすることは生物学的に非常に重要な課題である。蛋白質が取り得る構造の数は莫大であるにも関わらず、生物学的に有限な時間で早いフォールディング反応が可能となっているのはなぜなのか、というのが蛋白質フォールディング研究の重要な問いである。この問いに答えるためには、フォールディング反応の経路に沿って蛋白質分子はどのように構造変化をしていくかを明らかにする必要がある。そのため、これまでの実験を用いた研究では、フォールディング反応経路上において特徴的に存在する状態 (天然状態、遷移状態、中間状態、変性状態) の構造特徴を分光学的測定によって調べることが行われてきた。しかし実験では、反応経路上に存在する状態のアンサンブルの平均的性質をアミノ酸残基レベルでしか見ることしかできず、原子レベルの情報を反応経路上に存在する全ての分子種について提供してくれるわけではない。原子を質点として近似し、溶媒を含んだ蛋白質の系の時間発展を解いていく MD シミュレーションは、実験が提供できない情報を提供してくれる非常に有効な研究手段である。

しかし、MD シミュレーションを用いたフォールディング研究には幾つかの問題がある。それらには (1) 現在の CPU パワーで可能な計算時間内では蛋白質フォールディングは完了しない、(2) 計算結果の信頼性、(3) MD シミュレーションから得られるトラジェクトリーは非常に確率的で解析が困難であることなどが挙げられる。

そこで論文提出者は、フォールディング反応が可逆であることを利用し、その逆反応であるアンフォールディングを高温でシミュレーションした。モデル蛋白質にはフォールディング実験のデータが豊富にあるヤギ α ラクトアルブミンを用いた。シミュレーションの結果の妥当性は、実験結果との綿密な対応付けにより十分に検証した。また、複数のトラジェクトリーを計算し、それらを統計的に解析することができる新しい解析方法を開発することで、アンフォールディング過程における構造変化及び遷移状態の物理化学的特性を明らかにした。具体的な成果は以下の二つである。

- ① ヤギ α ラクトアルブミンの組み換え体は、真正体と比べて N 末にメチオニンが付加されただけで構造的差異が殆ど無いにも関わらず、組み換え体は真正体よりも不安定で 8 倍早くアンフォールディングする。そこで論文提出者は、N 末メチオニンによる不安定化の原理を明らかにするために、398 K でアンフォールディングさせる 5 ns のシミュレーションを、真正体と組み換え体のそれぞれについて各 10 本行った。398 K のシミュレーションでは蛋白質を完全にアンフォールディングさ

せることはできなかったが、組み換え体の方が真正体よりも早くアンフォールディングするという実験結果を再現することができた。得られたトラジェクトリーの原子レベルでの解析から、付加されたN末メチオニンはN末近傍構造内の相互作用を弱め、そのため組み換え体のN末近傍構造がすぐに崩壊することが分かった。さらに、N末近傍構造は常温における天然状態の揺らぎの過半を占めるヒンジ運動の支点にあたるため、N末近傍構造の崩壊はこの運動の大きさを増大させ、組み換え体の早いアンフォールディングを引き起こしていることが分かった。これらのシミュレーションの解析結果から真正体のアンフォールディング速度のみを変える変異型を予測し、その変異型の安定性と速度論的測定によりシミュレーションの結果が正しいことを実証した。

- ② 溶媒を含めた蛋白質の系は複雑な多体系であり、また MD シミュレーションのトラジェクトリーは非常に確率的であるため、その中から構造変化の特徴を抽出してくることは難しい。例えば今までの先行研究では、複数のアンフォールディング・トラジェクトリーからなる構造アンサンブルから遷移状態アンサンブルを抽出することに成功した研究例はなかった。そこで論文提出者は、ヤギ α ラクトアルブミンの真正体と組み換え体のそれぞれについて、498 K で完全にアンフォールディングさせる 5 ns のシミュレーションを各 10 本行った。得られた全トラジェクトリーに対して直交座標空間での主成分解析を行ったが、各トラジェクトリー間に共通したアンフォールディング・パスウェイを見出すことはできなかった。そこで、蛋白質の構造を特徴的な部分構造に分け粗視化し、それら部分構造間の構造形成率を新しい座標系に用いることでトラジェクトリーの記述を行った。この粗視化座標空間における主成分解析では、各トラジェクトリー間に共通したアンフォールディング・パスウェイを見出すことができた。さらに、各トラジェクトリーで観察されるアンフォールディング・パスウェイの間でどこが似ていて、どこが違っているかを系統的に分類する解析方法「マルチプル・トラジェクトリー・アライメント」を開発し、それによってアンフォールディング・パスウェイの解析を行った。その結果、真正体と組み換え体ではアンフォールディング・パスウェイが違うことを見つけ、さらにアンフォールディング・パスウェイのボトルネックにあたる遷移状態アンサンブルを抽出することができた。抽出された遷移状態の構造特徴は、実験値である ϕ 値解析と非常に良い相関を示した。得られた遷移状態アンサンブルの解析から、フォールディング過程の律速段階は、(i) エントロピックな障壁によって特徴づけられること、(ii) 脱溶媒和過程であることが分かった。

以上を要約すると、本研究において論文提出者は、高温アンフォールディングの MD シミュレーション、変異型の速度論的測定、マルチプル・トラジェクトリー・アライメントの開発などにより、アンフォールディング初期過程及び遷移状態を越えるまでの構造変化を詳細に特徴づけた。さらに遷移状態の物理化学的特性も明らかにした。本研究は、(1) 実験とシミュレーションを互いにフィードバックさせることでフォールディング研究における MD シミュレーションの有効性を実証した、(2) アンフォールディング初期過程における蛋白質のダイナミクスを明らかにした、(3) 斬新なトラジェクトリーの解析方法により、複数のトラジェクトリーからなる構造アンサンブルから遷移状態を抽出することに世界で初めて成功し、その物理化学的特性を明らかにした、という点において、生物物理学上有意義な貢献をしたものと認められる。よって審査員一同、博士(理学)にふさわしい研究と判断した。