

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西 謙一郎

タンパク質は、生体内のあらゆる生命活動を支える生化学的過程に関わっている。生体中で合成されたアミノ酸の鎖状構造が、生化学的過程に関わる機能を発揮するためには、特異的な天然立体構造へ折れ畳むことが必要である。折れ畳み、即ちフォールディングの機構を解明し、その物理化学的知見を得ることができれば、構造未知タンパク質の構造決定や人工機能タンパク質の設計への貢献が期待できる。

MD シミュレーションは分子を構成する全原子の位置の時間発展を計算で求めることにより、実験では観測することが困難な原子レベルの分子運動の情報を得ることができる。よって MD シミュレーションを使って配列から立体構造の再現を成功させることができれば、フォールディングの詳細な物理化学的知見を得ることに繋がる。ところが、MD シミュレーションによるフォールディングの再現には、サンプリング問題、ポテンシャルエネルギー関数の精度の問題、膨大な構造空間の探索に長時間のシミュレーションを必要とする問題がある。

本論文では、これらの問題を解決するため、二次構造拘束を導入した MD シミュレーションの新たな手法を開発し、staphylococcal protein A の B ドメイン野生型、実験的に野生型の天然状態をとらないことが確かめられている B ドメイン変異体、B ドメインと同じ helix bundle 構造をとる Engrailed homeodomain の 3 つに適用して実験結果と比較することで、本手法の有効性を確認し、またこれらの分子のフォールディング過程を原子レベルで詳細に解析した。

第一章序論に続き、第二章では、staphylococcal protein A の B ドメイン野生型を対象に二次構造拘束シミュレーションを行い、天然状態(天然構造に対する $C\alpha\text{RMSD} \leq 2.0 \text{ \AA}$)への到達に成功した。天然構造に対する $C\alpha\text{RMSD}$ が 8.0 \AA 以上を変性状態と定義すると、合計 $1 \mu\text{s}$ のシミュレーション中にフォールディングイベント/アンフォールディングイベントを合計 121 回観測した。構造分布を調べたところ、最小自由エネルギー構造は天然状態の構造であった。またフォールディング過程の解析から、Helix1 と Helix2 が接近する過程、全ての Helix が天然状態と同じ位置に移動する過程、Helix2 と Helix3 が接近する過程、全ての Helix が噛み合う過程を経て B ドメインが構築されていくことが示唆された。

第三章・第四章では、実験的に野生型の天然状態をとらないことが確かめられている B ドメインの L23G 変異体と L20G/L23G 二重変異体を対象に、野生型と同様の手法を適用した場合に実験結果を再現するかどうかを試みると同時に、変異がフォールディングにもた

らす影響を明らかにすることを目的にシミュレーションを実行した。天然状態(野生型の天然構造に対する $C\alpha$ RMSD ≤ 2.0 Å)をとる期間が、野生型に比べ大幅に減少し、溶液中で変性状態であるという実験結果を再現する結果を得た。Leu23 側鎖が立体障害となって妨げていた非天然水素結合(Asn22OD1-Leu23N)が、turn を形成するために必要な天然水素結合(Leu20O-Leu23N)の形成を阻害していることが、溶液中で野生型天然状態を安定してとることができない原因であることが示唆された。

第五章では、B ドメインと同じ helix bundle 構造をとるタンパク質である Engrailed homeodomain を対象に、B ドメインと同様の手法で、天然構造の再現を試みた。天然構造に対する最小 $C\alpha$ RMSD は 1.5 Å で、天然状態への到達に成功した。B ドメインと同様の helix bundle 構造をとるタンパク質への適用が可能であることが示唆された。

本研究では、B ドメインや Engrailed homeodomain のような helix bundle 構造をとるタンパク質のフォールディング観測に、二次構造拘束を導入した MD シミュレーションは有効な手法であることが確認できた。この手法をさらに他の helix bundle 構造あるいはそれ以外のタンパク質に適用することで、普遍的なタンパク質立体構造構築原理の解明につながる知見が得られることが期待される。

以上、本研究は、タンパク質のフォールディング観測に二次構造拘束を導入した MD シミュレーションは有効な手法であることを示すとともに、天然タンパク質ドメインのフォールディングに新たな知見を提供するものであり、生物物理学研究の学術的・応用的意義は大きい。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。