

論文の内容の要旨

論文題目 真核生物由来タンパク質の分子動力学シミュレーション
(Molecular dynamics simulations of eukaryotic proteins)

氏名 光山 倫央

タンパク質の機能解明には、結晶構造だけでなく、ダイナミクス理解が重要である。本研究では、なかでもダイナミクスが機能に重要であると考えられる 2 つの真核生物由来タンパク質、脂質メディエーター産生酵素オートタキシンと光駆動性の陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシンを取り上げ、タンパク質のダイナミクスをシミュレーションする手法である分子動力学シミュレーションを用いてその機能解明を目指した。

オートタキシンの活性保持機構

オートタキシンは、生体内の脂質の一種であるリゾホスファチジルコリンを加水分解し、脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸を産生する分泌型のリゾホスホリパーゼ D である。リゾホスファチジン酸は特異的な G タンパク質共役型受容体に作用して、細胞の増殖、分化、遊走など様々な細胞応答を引き起こす。従って、オートタキシンは脳神経系の発達や分化、胎児の血管形成、リンパ球のトラフィッキング、創傷治癒など多岐にわたる生命現象に関与する。また、オートタキシンはがんの浸潤・転移にも関与すると考えられていることから、抗がん剤のターゲットとしても注目されている。

オートタキシンは 2 つのソマトメジン B 様ドメイン (SMB)、触媒ドメイン、およびヌクレアーゼ様ドメイン (NLD) からなり、さらには Asn53、Asn410 および Asn524 の 3 箇所において Asn 結合型糖鎖修飾を受けている。このうち、NLD と Asn524-結合型糖鎖は活性に必須であることが知られている。2010 年に当研究室の西増らによって得られたオートタキシンの結晶構造から、SMB と NLD は触媒ドメインを両側からはさみ込むように相互作用していることが明らかになった (図 1)。また、活性に必須の Asn524-結合型の糖鎖は触媒ドメインと NLD の間に位置していた。しかしながら、NLD も Asn524-結合型糖鎖も共に脂質結合ポケットや活性部位と直接の相互作用は無く、糖鎖修飾がどのように活性保持に寄与しているかは依然不明であった。

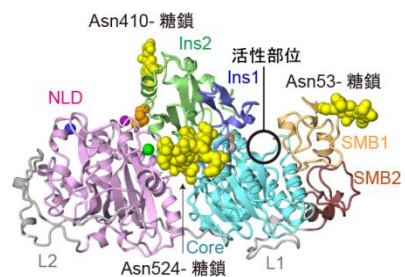


図 1: オートタキシンの結晶構造

そこで本研究では、NLD および Asn524-結合型糖鎖がオートタキシンの活性に与える影響を調べるために、オートタキシンに対して分子動力学シミュレーションを行った。具体的には、全長のオートタキシン (WT) および NLD や糖鎖を欠損させた構造 (Δ glycan、 Δ NLD、および、 Δ NLD Δ glycan) をそれぞれ初期構造として 300~400 ns の分子動力学シミュレーションを行い、そのダイナミクスを調べた。

最初に、各シミュレーションの root mean square deviation (RMSD) を調べると、WT では触媒ドメインと NLD の RMSD の値は共に小さく安定であったのに対し、 Δ NLD および Δ NLD Δ glycan シミュレーションにおいては触媒ドメインの RMSD が大きく変化していることが明らかになった。また Δ glycan では触媒ドメインと NLD 間の角度が WT と比較して大きくなっていることが明らかになった。

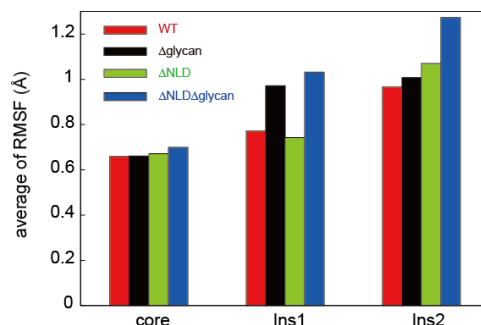


図 2: 触媒ドメインの各領域の RMSF の平均値

そこで次に、触媒ドメインについてより詳細な解析を行うために、触媒ドメインを、脂質結合ポケットを含む core と、2つの挿入領域 Ins1、Ins2 の 3 つの領域に分割し (図 1)、RMSD 解析等を行った。その結果、 Δ glycan、 Δ NLD、および Δ NLD Δ glycan シミュレーションで

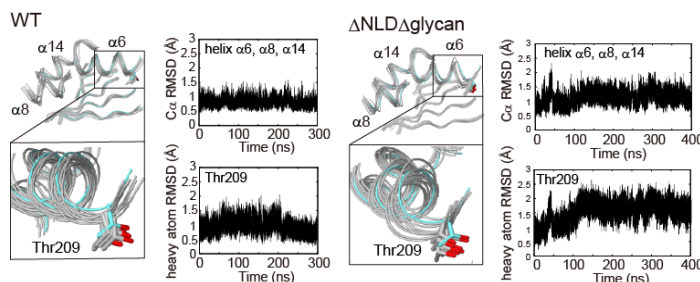


図 3: 脂質結合ポケットの解析結果

(左) 脂質結合ポケットの構造。結晶構造 (水色) と 30 ns ごとのスナップショット (灰色) を示した。
(右) $\alpha 6$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 14$ の RMSD、Thr209 の重原子の RMSD

は Ins1 および Ins2 が不安定化することが確認された (図 2)。加えて、それら変異体のシミュレーションでは、触媒残基である Thr209、および Thr209 を含む α ヘリックスも同様に不安定化していた (図 3)。さらに、シミュレーションのトラジェクトリに対して残基間の動きの相関係数解析を行った結果、オートタキシンには、NLD、Ins1、Ins2、糖鎖から活性残基に至るまで相互作用パスウェイが形成されており、このパスウェイが活性残基の安定化に寄与していること、また、変異体ではこのパスウェイが壊れるため、活性残基が不安定化し、活性の消失に繋がること示唆された (図 4)。

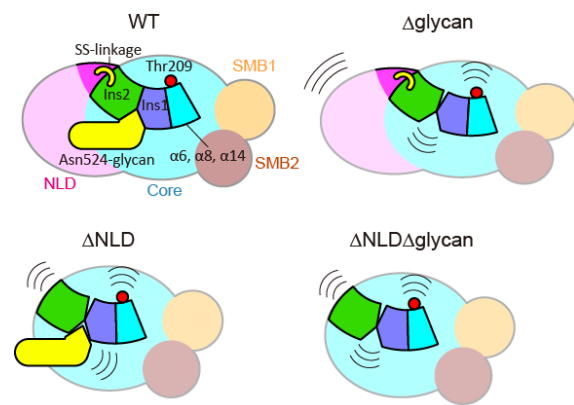


図 4: オートタキシンの活性残基安定化メカニズム

チャンネルロドプシンのゲート機構

チャンネルロドプシンは緑藻類から単離された光駆動性の陽イオンチャンネルであり、他のロドプシンファミリータンパク質と同様に、発色団としてレチナールを有する。光が照射されると全 *trans* 型レチナールは 13-*cis* 型レチナールへと異性化し、シッフ塩基からプロトンアクセプターである近傍の酸性アミノ酸残基へとプロトンが受け渡される。また、青色光を照射すると細胞内に陽イオンを取り込むという性質から、チャンネルロドプシンは神経科学の応用技術としても脚光を浴びている。

2012年に当研究室の加藤らによって解かれた暗状態のチャンネルロドプシンの結晶構造(図5)は、プロトンアクセプターやイオン透過経路についてなど、これまで不明な点が多かったチャンネルロドプシンの分子機構について非常に多くの知見を与えた。しかしながら、得られたチャンネルロドプシンの結晶構造には細胞内側とタンパク質中央付近にそれぞれ狭窄部位が存在し(狭窄部位A、B)、細胞質側が閉じた構造であった(図6)。

そのため光サイクルの各過程で、結晶構造で観測されたチャンネル孔に存在する2つの狭窄部位(図6)を含め各残基がいつどのようにして動くことでチャンネル孔が開くのかは依然不明である。

そこで本研究では、チャンネルロドプシンに対して分子動力学シミュレーションを適用し、チャンネルロドプシンの各残基がどのように動きチャンネル孔が開くのかを調べた。具体的には、レチナールの異性化状態やシッフ塩基のプロトン化状態、またチャンネル孔を塞いでいたグルタミン酸のプロトン化状態を変えた構造を使用してそれぞれ分子動力学シミュレーションを行い、状態ごとのチャンネル孔の動きなどを調べた。

最初に、レチナール近傍に存在していた2つの酸性残基である Glu162 と Asp292のうち、プロトン化状態が不明であった Glu162 について、プロト

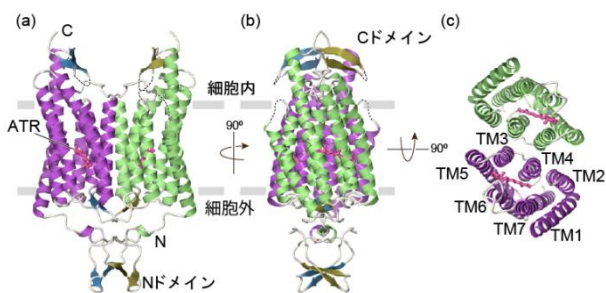


図5: チャンネルロドプシンの結晶構造

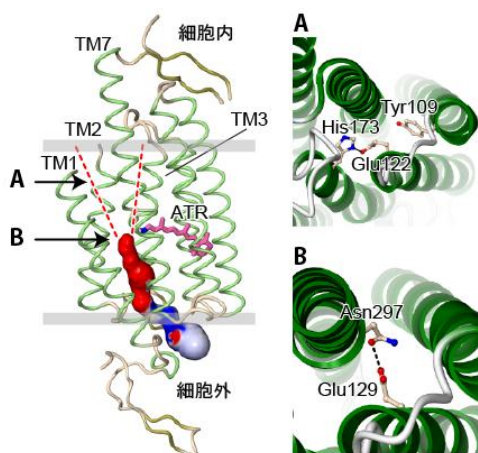


図6: 2箇所狭窄部位

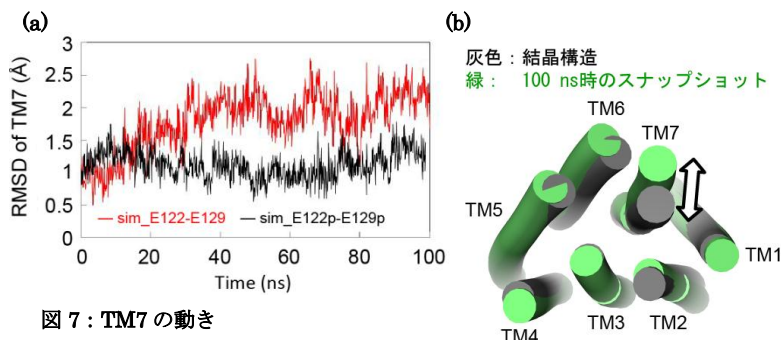


図7: TM7の動き

(a) TM7のRMSD (b) sim_E122-E129の100 ns時のスナップショット

ン化および脱プロトン化双方の状態に対して分子動力学シミュレーションを行った。その結果、レチナールが全 *trans* 型および 13-*cis* 型のどちらの場合も Glu162がプロトン化している状態の方が結晶構造におけるレチナール周辺の環境を再現することが明らかになった。従って、プロトン化状態がこれまで報告されていない Glu162 については、今回の結果からプロトン化していることが示唆された。

次に、レチナールの状態と、チャンネル孔に存在する Glu122 および Glu129 の

プロトン化状態を変えた構造を初期構造としてそれぞれ分子動力学シミュレーションを行った。その結果、Glu122 および Glu129 を脱プロトン化させたシミュレーション (sim_E122-E129) では、共にプロトン化させたシミュレーション (sim-E122p-E129p) と比較して TM7 の RMSD が大きくなっていることが明らかになった (図 7a)。実際に 100 ns 時点の構造のスナップショットを見ると、TM7 の細胞質側の領域が、チャンネル孔が広がる方向に傾くことが観測された (図 7b)。

さらに、狭窄部位 A に着目すると、Glu122 の脱プロトン化によって TM2 に属する Glu121 と TM7 に属する Arg307 の相互作用頻度が減少しており (図 8b)、このことが TM7 の不安定化に繋がっていることが示唆された。また、結晶構造の温度因子が高かった TM1 に属する Tyr109 はシミュレーション中では安定な挙動を示した一方で、Glu122 は高い RMSD 値を示した (図 8a)。この結果から、狭窄部位 A は Tyr109 ではなく Glu122 が動くことでチャンネル孔が開くことが示唆された。次に狭窄部位 B に着目すると Glu129 の脱プロトン化によって TM2 に属する Glu129 と TM7 に属する Asn297 の水素結合が切れており (図 9a)、この水素結合の消失も TM7 の不安定化に繋がることが示唆された。さらに、sim_E122-E129 では水分子が流入しており (図 9b)、水分子が透過し得る経路が形成されたことも確認された。これらの結果によりチャンネル孔の開閉モデルが提唱され、今後の変異体作製などの実験やシミュレーションについての示唆を与えた。

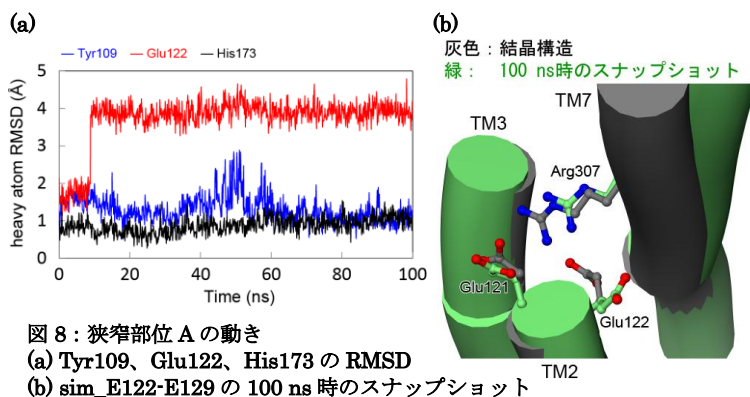


図 8 : 狭窄部位 A の動き
(a) Tyr109、Glu122、His173 の RMSD
(b) sim_E122-E129 の 100 ns 時のスナップショット

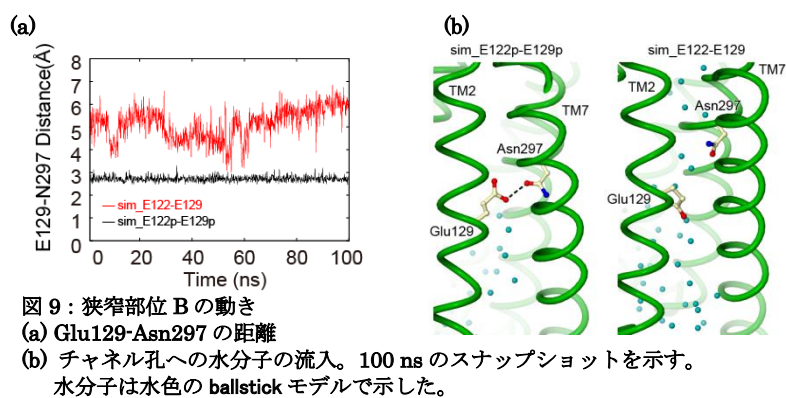


図 9 : 狭窄部位 B の動き
(a) Glu129-Asn297 の距離
(b) チャンネル孔への水分子の流入。100 ns のスナップショットを示す。水分子は水色の ballstick モデルで示した。