

第 I 部 総合序論

はじめに

第 I 部では、本研究の主題を述べる。第 1 章では分子動力学 (molecular dynamics, MD) 計算によるタンパク質機能解析の目的を提示し、全体像の概要を述べる。第 2 章では MD 計算の方法と解析方法の概要を示す。第 3 章ではミトコンドリア外膜

受容体 Tom20-シグナル配列複合体の MD 計算の概要を示し、第 4 章では筋小胞体カルシウムポンプの MD 計算の概要を示す。第 5 章では本研究の総括の概要を示す。

1. 分子動力学計算によるタンパク質機能の解析

タンパク質はアミノ酸がペプチド結合により繋がった鎖状の生体高分子であり、アミノ酸配列に特異的な立体構造を形成する。生体内に存在するタンパク質は、化学反応の触媒や、細胞情報のシグナル伝達、物質の輸送、筋肉の運動を担うモーターなど、多様な機能を有している。これら生体機能の素過程は、タンパク質と基質、あるいはタンパク質間の相互作用によって決定されている。

基質とはタンパク質が作用する相手の分子であり、生体内ではアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP) が機能発現に必要な自由エネルギーの運搬体となっている¹。

タンパク質と基質の相互作用の代表的な解析方法には X 線結晶構造解析がある。この方法は分子の結晶に X 線を照射し、通過した X 線の回折パターンに基づいてその分子中の原子の 3 次元的配置

を求める手法である。これにより基質が結合したタンパク質の立体構造をオングストロームの分解能で得ることができ、両者の構造的な相互作用を解析できる。しかし得られた構造は固体結晶中の packing の影響を受けた静的な状態であり、結晶化条件は生理的環境ではない。近年、タンパク質の機能発現は、基質の結合によって誘起される立体構造変化と強く相関していることが明らかになってきた。生体内で実現している基質が結合したタンパク質の立体構造は、結晶で得られた構造と異なっているはずである。従って、生体環境中で熱雑音を受けた基質とタンパク質の構造変化を観測する必要がある。

本研究で用いた分子動力学 (molecular dynamics, MD) 法²は、系を構成する全ての原子について Newton の運動方程式を逐一解き、各原子の運動の軌跡を得る方法である。本手法によって、生理的環境を再現した系におけるタンパク質と基質の熱運動が観測でき、相互作用の時間変化を原子分解能で解析できる。一般に生体高分子の MD 計算では、平衡揺らぎの解析や、構造変化に伴う自由エネルギー変化の見積もり、また機能を実現する分子機構の解明などが主な目的である。しかし、MD 計算にも大きく 2 つの問題がある。1 つ目は現在の計算機資源の下で通常の MD 計算によって到達可能なタイムスケールは、現状では 100 ナノ秒から 1 マイクロ秒が限界である。それに対し、タンパク質の機能に関わる構造変化はミリ秒に渡るため、このギャップを埋める必要がある。2 つ目は MD 計算で対象とする系は古典力学に基づいてモデル化され、分子の力場 (ポテンシャルエネルギー) が定義されている。本来、系を構成する全ての原子は電子状態を露わに考慮した量子化学計算による

記述が理想的であるが、通常 MD 計算が取り扱う原子数は数万原子以上であり、計算量が膨大になるため古典力場による記述に限定されている。この力場によって計算結果が大きく変わるため、常に分子力場の精度に留意しなければならない。

以上のことから本研究では、MD 計算のタイムスケールと分子力場の改良によって、より信頼性の高いタンパク質と基質の相互作用解析を主題とした。対象とする系は、ミトコンドリア外膜 Tom20-シグナル配列複合体と筋小胞体カルシウムポンプとし、生体環境における MD 計算を実行してタンパク質と基質の熱運動の下での相互作用を解析した。Tom20-シグナル配列複合体では、拡張アンサンブル法の 1 つであるレプリカ交換分子動力学 (replica-exchange molecular dynamics, REMD) 法を用いてマイクロ秒相当のタイムスケールを実現し解析を行った³。筋小胞体カルシウムポンプでは、重要な基質である ATP の分子力場を従来から高精度に改良し、生化学実験と整合性のある MD 計算を実現した⁴。これらの結果から、タンパク質と基質が織りなす相互作用の解析には X 線結晶構造だけでは不十分であり、MD 計算によって生理的環境下での熱雑音を考慮した基質とタンパク質の構造変化を観測する必要があることを示した。これによって相互作用の物理化学起源に言及でき、生命現象を担うタンパク質の機能や基質との反応を論じることが可能となる。

最後に MD 計算によるタンパク質機能解析のさらなる発展として、タンパク質構造変化過程における遷移経路を探索し、遷移状態を安定に同定するパスサンプリング (path sampling) 法を挙げ、その方法の 1 つであるストリング (string) 法⁵を詳述した。さらにタンパク質の活性中心については分

子の電子状態を露わに取り扱い、その他の部分については、分子力学に基づいて計算を行う QM (quantum mechanics) /MM (molecular mechanics) 法

⁶⁻⁷ を詳述した。これらの適用可能性について論じた。

2. 第 II 部の概要：分子動力学計算の方法と解析方法

第 II 部では、MD 計算や分子力場をはじめ、カノニカルアンサンブルや定圧定温アンサンブルの実現方法を詳述した。系のハミルトニアンをどのように決めるのか、分子のダイナミクス（時間発展）はどのようにして得られるのかを記した。一般にタンパク質の立体構造は高次元空間で定義される多谷型の自由エネルギー地形に従って変化する。よってタンパク質の機能を理解するには、構造変化に対する自由エネルギー地形を解析することが本質的に重要である。しかし生体分子を対象とした場合には系の自由度が大きくなり、複雑な自由エネルギー地形を持つことから、MD 計算中の生体分子は無数の局所的な自由エネルギー極小状態に陥ってしまう。このことから通常の MD 計算におけるダイナミクスの緩和は非常に遅くなり、物理量を正確に見積もることが難しくなる。無限時間の MD 計算を実行すれば自由エネルギー障壁を乗

り越えるイベントが出現し、状態を限なく経巡ることは可能だが、非現実的である。そこでこの困難を克服するため、効率的にサンプリングする方法が数多く提案されてきた。本論文では、アンブレラサンプリング法²や拡張アンサンブル法、REMD 法⁸⁻⁹、非平衡統計力学からのアプローチである Targeted MD 法¹⁰、これらの手法から自由エネルギー差を得る方法も説明した。最後に MD 計算によって得られたトラジェクトリから、タンパク質の構造変化や類似性の指標となる平均二乗偏差 (root-mean-square deviation, RMSD) や、揺らぎの大きさと方向を記述する主成分分析 (principal component analysis, PCA)¹¹⁻¹²、またタンパク質の構造変化を記述する平均力ポテンシャル (potential of mean force, PMF) の計算や、MD 計算で出現した多数の構造を分類するクラスター分析法について詳述した。

3. 第 III 部の概要：ミトコンドリア外膜受容体 Tom20 とシグナル配列複合体の分子動力学計算

はじめに

多様な生命現象の素過程となるタンパク質と基質の相互作用は、これまでさまざまな実験・理論的手法により活発に研究されてきた。特に、基質の結合に伴うタンパク質の構造変化には数多くの報告があり、基質の認識過程を説明するモデルが複数提唱されている¹³⁻¹⁵。このように従来は、タン

パク質に焦点が当てられてきた一方で、基質分子の構造変化や結合過程についての知見は、実験・理論の両面とも未だ十分に得られていなく発展途上にある。

概要

第 III 部では、ミトコンドリアへの輸送タンパク質に付加されたシグナル配列（タンパク質の輸送

先を示す数十残基のアミノ酸配列)とその受容体タンパク質 Tom20 の複合体を対象とした。Tom20 は、さまざまなタンパク質の中からミトコンドリア内部で機能するタンパク質を選択的に識別して透過する重要な受容体膜タンパク質である¹⁶⁻²²。この識別には、選別されるタンパク質に付加されたシグナル配列と Tom20 の結合、及びそれに伴う相互作用変化が重要な役割を果たす。はじめに細胞内でのタンパク質輸送を概観し、特にミトコンドリアに輸送されるタンパク質と、これに付加され輸送過程で重要な役割を担うシグナル配列について詳述した。次に、Tom20-シグナル配列複合体に関する X 線結晶構造解析や NMR 緩和時間解析によるこれまでの報告を示した。Tom20 にシグナル配列が結合した 3 種類の複合体の X 線結晶構造 (A-pose, M-pose, Y-pose) は、Tom20 に対するシグナル配列の結合様式が異なっていた²³⁻²⁴。構造解析

では 3 種類の結合様式は全て同じ確率で存在し、等しく安定な複合体構造であると考えられていた。しかし結晶構造解析では動的な情報は得られず、溶液中での複合体の安定性や各結合様式の存在割合は不明である。本研究では、REMD 計算を用いてマイクロ秒相当のタイムスケールを実現した。得られた結果から、シグナル配列の自由エネルギー地形と結合様式のクラスター分析を行い、シグナル配列のダイナミクスが主役となる認識過程を示した。Appendix. A には、アンブレラサンプリング計算と Targeted MD 計算の結果も示し、REMD 計算で得られた自由エネルギー地形と比較し各手法について議論した。最後にタンパク質による基質の認識・結合に関するこれまでの研究報告と比較し、MD 計算によって明らかになった Tom20 によるシグナル配列の認識機構を提唱した。

4. 第 IV 部の概要：筋小胞体カルシウムポンプの分子動力学計算

はじめに

細胞中のタンパク質は、環境から絶えず熱雑音を受けながら分子機械としての機能を果たしている。そのような環境下で、モータータンパク質や膜輸送タンパク質は自身の機能を発現させる基質として ATP を利用している。これらのタンパク質は、ATP 加水分解によって得られた自由エネルギーを力学的な力に変換し特異的な機能発現のため自身の構造を大規模に変化させる。エネルギー変換を実現する分子機構はこれまで精力的に調べられてきた。特に、原子分解能におけるタンパク質構造の理解においては X 線結晶構造解析が有用であり、現在 1300 個以上の ATP 結合タンパク質の X

線結晶構造が Protein Data Bank (PDB) に収容されている。筋小胞体カルシウムポンプは P 型の ATP 加水分解酵素であり、筋小胞体膜中に存在する膜タンパク質である¹。1 個の ATP を加水分解し、2 個の Ca^{2+} を細胞質から小胞体内腔へ 1 万倍の濃度勾配に逆らって能動輸送する²⁵。これまで X 線結晶構造解析によって輸送サイクルに含まれる反応中間体の立体構造が決定され、カルシウムポンプは大規模な構造変化によってイオン輸送を実現していることが示唆された²⁶。しかし X 線結晶構造解析で得られた立体構造は、リガンドを模倣した阻害剤によって状態が固定されているため全てを信頼できない。例えば、カルシウムポンプの ATP

結合状態²⁷⁻²⁸は、ATPではなくアナログである AMPPCP (adenylyl 5'-(beta,gamma-methylene) diphosphonate) で結晶化された。また生理的環境下で ATP に配位するイオンは Mg^{2+} であるが、ATP 結合状態は Ca^{2+} 高濃度下で結晶化されたため、 Mg^{2+} が Ca^{2+} に置き換わり配位していた²⁷⁻²⁸。カルシウムポンプが自己リン酸化したアデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate, ADP) 結合状態²⁸⁻²⁹はリン酸基が ATP の γ リン酸基でなくアナログである AlF_4 を用いて結晶化された。従って、生体環境中のカルシウムポンプの熱運動を解析するためには、MD 計算によって本来の基質が結合した状態のカルシウムポンプの熱運動を観測する必要がある。

概要

筋小胞体カルシウムポンプの機能を詳述し、ATP/ADP 結合状態の X 線結晶構造について述べた。カルシウムポンプの MD 計算の先行研究を概観した後、CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) の ATP 力場³⁰をについて言及し、多リン酸分子の力場パラメタの改良の

必要性を示した。力場パラメタの作成手順と改良した力場をカルシウムポンプや他の 4 種類の ATP 結合タンパク質の MD 計算に適用した結果を示した。溶液中 ATP の REMD 計算も実行し、オリジナルの力場との比較による検証も詳述した。改良された多リン酸分子力場は、ATP を含む多くのタンパク質の MD 計算において有用であることを示した。改良された多リン酸力場を用いて、ATP/ADP 結合状態のカルシウムポンプの MD 計算を 200 ns 実行した。その結果、ヌクレオチド結合部位に配位する Mg^{2+} の個数が ATP や ADP の結合状態安定性に影響を与えることを示した。さらに量子化学計算を行って ATP と Mg^{2+} 、ATP のアナログである AMPPCP と Mg^{2+} の相互作用エネルギーを比較した。ATP 結合状態のヌクレオチド結合部位への 2 個の Mg^{2+} の結合可能性を示唆し、他の加水分解酵素 (ATPase) も含めた先行研究と比較した。最後にヌクレオチド結合部位への 2 個の Mg^{2+} の配位によって実現するリン酸化反応の反応機構を提唱した。

5. 第 V 部の概要：総合結論

第 V 部では Tom20-シグナル配列複合体の MD 計算とカルシウムポンプの MD 計算について総括した。最後に、MD 計算によるタンパク質機能解析のさらなる発展として、パスサンプリング法の 1 つであるストリング法と QM/MM 法への応用を言及した。

6. 引用文献

1. Boyle, J., Molecular biology of the cell, 5th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2008**, *36*, 317-318.
2. M. P. Allen; Tildesley, D. J., *Computer Simulation of Liquids*. Oxford university press: Clarendon Press, 1989; p 408.
3. Komuro, Y.; Miyashita, N.; Mori, T.; Muneyuki, E.; Saitoh, T.; Kohda, D.; Sugita, Y., Energetics of the presequence-binding poses in mitochondrial protein import through Tom20. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 2864-2871.
4. Komuro, Y.; Re, S.; Kobayashi, C.; Muneyuki, E.; Sugita, Y., CHARMM Force-Fields with Modified Polyphosphate Parameters Allow Stable Simulation of the ATP-Bound Structure of Ca²⁺-ATPase. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 4133-4142.
5. E, W.; Ren, W.; Vanden-Eijnden, E., String method for the study of rare events. *Phys. Rev. B* **2002**, *66*.
6. Gogonea, V.; Suárez, D.; Vaart, A. v. d.; Merz Jr, K. M., New developments in applying quantum mechanics to proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 217-223.
7. Garcia-Viloca, M.; Gao, J.; Karplus, M.; Truhlar, D. G., How Enzymes Work: Analysis by Modern Rate Theory and Computer Simulations. *Science* **2004**, *303*, 186-195.
8. Hukushima, K.; Nemoto, K., Exchange Monte Carlo Method and Application to Spin Glass Simulations. *Journal of the Physics Society Japan* **1996**, *65*, 1604-1608.
9. Sugita, Y.; Okamoto, Y., Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *314*, 141-151.
10. Schlitter, J.; Engels, M.; Krüger, P., Targeted molecular dynamics: A new approach for searching pathways of conformational transitions. *J. Mol. Graph.* **1994**, *12*, 84-89.
11. Kitao, A.; Hirata, F.; Gō, N., The effects of solvent on the conformation and the collective motions of protein: Normal mode analysis and molecular dynamics simulations of melittin in water and in vacuum. *Chem. Phys.* **1991**, *158*, 447-472.
12. Amadei, A.; Linssen, A. B. M.; Berendsen, H. J. C., Essential dynamics of proteins. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **1993**, *17*, 412-425.
13. Fischer, E., Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27*, 2985-2993.
14. Koshland, D. E.; Nemethy, G.; Filmer, D., Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry* **1966**, *5*, 365-385.
15. Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J.-P., On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* **1965**, *12*, 88-118.
16. Söllner, T.; Griffiths, G.; Pfanner, N.; Pfanner, N.; Neupert, W., MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* **1989**, *59*, 1061-1070.
17. Ramage, L.; Junne, T.; Hahne, K.; Lithgow, T.; Schatz, G., Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J.* **1993**, *12*, 4115.
18. Pfanner, N., Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, R412-R415.
19. Pfanner, N.; Geissler, A., Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 339-349.
20. Endo, T.; Kohda, D., Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1592*, 3-14.
21. Obita, T.; Muto, T.; Endo, T.; Kohda, D., Peptide Library Approach with a Disulfide Tether to Refine the Tom20 Recognition Motif in Mitochondrial Presequences. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 495-504.
22. Rapaport, D., Finding the right organelle. *EMBO reports* **2003**, *4*, 948-952.
23. Saitoh, T.; Igura, M.; Obita, T.; Ose, T.; Kojima, R.; Maenaka, K.; Endo, T.; Kohda, D., Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* **2007**, *26*, 4777-4787.
24. Saitoh, T.; Igura, M.; Miyazaki, Y.; Ose, T.; Maita, N.; Kohda, D., Crystallographic Snapshots of Tom20-Mitochondrial Presequence Interactions with Disulfide-Stabilized Peptides. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5487-5496.
25. Inesi, G.; Kurzmack, M.; Coan, C.; Lewis, D. E., Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3025-3031.
26. Toyoshima, C., Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *476*, 3-11.
27. Toyoshima, C.; Mizutani, T., Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **2004**, *430*, 529-535.
28. Sørensen, T. L.-M.; Møller, J. V.; Nissen, P., Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* **2004**, *304*, 1672-1675.
29. Toyoshima, C.; Nomura, H.; Tsuda, T., Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* **2004**, *432*, 361-368.
30. Pavelites, J. J.; Gao, J.; Bash, P. A.; Mackerell, A. D., A molecular mechanics force field for NAD⁺ NADH, and the pyrophosphate groups of nucleotides. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 221-239.