

論文の内容の要旨

蛋白質は生命活動をになう非常に重要な物質であり、細胞の中で蛋白質の関与無しに進む反応は殆どないと言って良いほどである。本論文ではこの蛋白質機能の解析を、蛋白質と基質の相互作用に着目して、分子動力学法の先端的な技術を用いて行っている。

第 I 部は序論である。ここでは、まず蛋白質のもつ多様な機能の源になる基質との動的な相互作用は X 線結晶法などによる静的な情報からだけでは理解できないことを指摘している。そして溶液中の蛋白質と基質の熱振動まで含めた相互作用の様子を明らかにすることができる分子動力学法による蛋白質機能解析の重要性が述べられているが、同時に扱えるタイムスケールや、分子力場などの問題も挙げられている。これらの問題を克服するために拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換法と、分子力場の改良が紹介されており、以上の簡単なイントロダクションの後、さらに後に続く第 II 部から第 V 部までの概要が述べられている。

第 II 部では、分子動力計算に用いられる分子内ポテンシャル関数、分子間ポテンシャル関数、運動方程式の数値計算法、定圧定温アンサンブルの生成方法などがまず述べられている。次に自由エネルギー計算の意義と、多谷型の自由エネルギー地形をもつ蛋白質の自由エネルギー計算のためには効率的なサンプリング法が必要なことが述べられ、アンブレラサンプリング法、拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換法、非平衡統計力学の応用などについて言及している。最後には分子動力学計算の結果の解析法が述べられており、全体として必要十分な本研究の手法の説明となっている。

第 III 部は、本研究の二つの主題のうちの一つであるミトコンドリア外膜受容体 Tom20 とシグナル配列の複合体の分子動力学計算である。真核細胞は多数の細胞内小器官をもち、それらの多くの蛋白質は細胞質で合成された後に各細胞内小器官に特異的に分配される。Tom20 はエネルギー代謝を司る細胞内小器官であるミトコンドリアの外膜に存在する蛋白質で、ミトコンドリアに運ばれる蛋白質と他の細胞内小器官に運ばれる蛋白質を仕分けする。この場合、Tom20 が蛋白質、輸送される蛋白質がもつシグナル配列が基質となる。これまでに人為的に Tom20 とシグナル配列を共有結合を作るなどして 3 種類の Tom20-シグナル配列複合体の結晶構造が得られていたが、それらの結合の相対的な安定性などは不明であった。本研究では、この相互作用についてレプリカ交換法により広範囲のアンサンブルを得、その結果からシグナル配列の自由エネルギー地形の算出と結合様式のクラスター分析を行った。以上より、結晶構造で得られた複合体の構造がほぼ再現され、さらに塩橋により複合体が安定化されている新規な結合様式が発見された。そして、それらの間で結合の安定性の違いなどについての知見が得られた。

第 IV 部は、本研究の二つめの主題である筋小胞体のカルシウムポンプの分子動力学計算である。筋小胞体のカルシウムポンプは Ca^{2+} イオンを ATP の加水分解による自由エネルギー差を利用して輸送し、筋肉細胞中の Ca^{2+} 濃度を調節することによって筋肉の収縮の制御の一端をになう重要な蛋白質で、これまでに様々な中間状態の結晶が得られてきた。しかし結晶で得られた構造は真の基質である ATP との複合体ではなく、非水解性アナログとの複合体であったため、これを ATP に置き換えて、本来の基質が結合した状態の動的構造について研究している。その際に、従来の ATP の分子力場パラメーターの三リン酸部分が、メチル2リン酸についての量子化学計算に基づいて導出されたもので、明らかに不自然な結果を与えたため、これをメチル3リン酸についての最新の量子化学計算にもとづく力場に改良し、その妥当性について検討した。そして ATP あるいは ADP が結合状態のカルシウムポンプの分子動力学計算を 200 ns 実行してヌクレオチド結合部位に配位する Mg^{2+} の個数の影響や結合の安定性について検証している。

第 V 部は第 III 部、第 IV 部の研究を総括した後、さらなる発展のための課題として、istring法と QM/MM 法についての言及がなされている。

論文審査の結果の要旨

1. 論文の主題

本博士論文は、分子動力学法を用いて蛋白質と基質の動的な相互作用を解析することを主題として、具体的には、ミトコンドリア外膜受容体 Tom20-シグナル配列複合体の相互作用と、筋小胞体カルシウムポンプと ATP, ADP, Mg²⁺などの相互作用を取り扱い、新しい知見を得ている。

2. 当該研究分野における位置づけ

蛋白質は生命活動をにやう非常に重要な物質であり、細胞の中で蛋白質の関与無しに進む反応は殆どないと言って良いほどである。この蛋白質を理解する上での一つの究極的な目標は、その構造に基づいて、蛋白質と基質の動きを原子レベルで逐一追跡することであろう。原子レベルの構造は X 線結晶解析によって得られるが、その構造はあくまで結晶中の静的な構造であり、それだけでは不十分である。一方、通常の実験手段は原子レベルの動きを逐一追跡する分解能を持たない。これらの問題に対して分子動力学計算法は唯一、有力な手段となりうるが、現実的に実行可能な計算時間が制限され、十分な構造のサンプリングができない、近似計算のための力場が不完全な場合がある、といった問題を抱えている。本研究では構造サンプリングの問題に対し、他の方法と比較の上、拡張アンサンブル法を適用し、必要な力場パラメーターを最新の量子化学計算に基づいて改良するなどして、ミトコンドリア外膜受容体 Tom20-シグナル配列複合体の相互作用と、筋小胞体カルシウムポンプと ATP, Mg²⁺の相互作用を解き明かしている。得られている描像は、これらの蛋白質の働きの一部に関するものではあるが、現在なし得る最も徹底的な研究とも言え、学術的に非常に高いレベルに達していると言える。

3. 論文の構成 目次と各章の概要

本論文は、分子動力学法を用いたミトコンドリア外膜受容体 Tom20-シグナル配列複合体の相互作用と、筋小胞体カルシウムポンプと ATP, ADP, Mg²⁺の相互作用について述べたものであり、そのための方法なども含めた全5部と Appendix. A, B, C, D からなっている。

第 I 部 総合序論

第 II 部 分子動力学計算の方法と解析方法

第 III 部 ミトコンドリア外膜受容体 Tom20-シグナル配列複合体の分子動力学計算

第 IV 部 筋小胞体カルシウムポンプの分子動力学計算

第 V 部 総合結論

Appendix. A Tom20-シグナル配列複合体のその他の結果

Appendix. B 筋小胞体カルシウムポンプのその他の結果

Appendix. C 記号・略号一覧

Appendix. D 研究業績

4. 論文の独自性・成果

本論文は、ミトコンドリア外膜受容体 Tom20-シグナル配列複合体の相互作用と、筋小胞体カルシウムポンプと ATP, ADP, Mg²⁺などの相互作用についての研究結果が述べられている。

ミトコンドリアは真核細胞に於いてエネルギー代謝を司る重要な細胞内小器官であるが、そのタンパク質の大部分は細胞質で合成された後にミトコンドリアに輸送される。Tom20はミトコンドリアの外膜に存在する蛋白質で、ミトコンドリアに運ばれる蛋白質と他の細胞内小器官に運ばれる蛋白質を仕分けする。この場合、Tom20が蛋白質、輸送される蛋白質がもつシグナル配列が基質となる。この相互作用は多様なシグナル配列を見分けるために正確な認識をするものでなければならないと同時に、一旦認識した後はミトコンドリアの膜を通過させるために弱い相互作用でなければならない。これまでに人為的に Tom20とシグナル配列を共有結合を作るなどして3種類の Tom20-シグナル配列複合体の結晶構造が得られており、上記の条件を満たす相互作用モデルも提案されていたが、実際にこれらの構造を水溶液中で取り得るのか、これらの結合の相対的な安定性の順位、などは不明であった。本研究では、アンブレラサンプリング法、Targeted MD 法、レプリカ交換法などの方法を比較した上で、最も信頼性の高いと判断されたレプリカ交換法を用い、十分な構造アンサンブルを得て、結合様式のクラスター分析をおこなった。その結果、結晶構造に見られた3種類の構造に類似する構造が存在することを示し、さらに塩橋により複合体が安定化されている新規な結合様式が発見された。そしてこれらの構造の間の安定性

などを比較することが出来た。これらの結果から、基質の構造変化が重要となる独自の新しい認識機構を提唱するに至っている。

筋小胞体のカルシウムポンプは Ca^{2+} イオンを ATP の加水分解による自由エネルギー差を利用して輸送し、筋肉細胞中の Ca^{2+} 濃度を調節することによって筋肉の収縮の制御の一端をになう重要な蛋白質で、これまでに様々な中間状態の結晶が得られてきた。しかし結晶で得られた構造は真の基質である ATP との複合体ではなく、非水解性のアナログとの複合体であったため、これを ATP に置き換えて、本来の基質が結合した状態の動的構造について研究している。その際に、従来の ATP の分子力場パラメーターの三リン酸部分が、メチル2リン酸についての量子化学計算に基づいて導出されたもので、明らかに不自然な結果を与えたため、これをメチル3リン酸についての最新の量子化学計算にもとづく力場に改良し、その妥当性について検討した。その結果、新しい ATP の力場はカルシウムポンプ以外の ATP 結合蛋白質に対しても結晶構造を良く再現する結果を与え、また、水溶液中でも従来の力場より広い範囲の構造を柔軟にとることが示され、信頼性の高さが実証された。

そして ATP あるいは ADP が結合したカルシウムポンプの分子動力学計算を200 ns 実行してヌクレオチド結合部位に配位する Mg^{2+} の個数の影響や結合の安定性について検証し、これらのヌクレオチド結合状態では、AMPPCP が結合した結晶構造とは異なり、2個の Mg^{2+} が結合することを明らかにした。そして 2 個の Mg^{2+} によって安定化されるヌクレオチド結合部位の反応機能を提唱している。

5. 論文の課題

本論文で得られた結果は、蛋白質の働きの一部に関するものであり、Tom20-シグナル配列複合体の拡張アンサンブル計算で得られた複数の準安定状態や、筋小胞体カルシウムポンプの複数の中間体の間を結ぶには至っていない。これらの間の遷移を目に見える形にするには、ストリング法などの適用、さらに化学反応を扱うには QM/MM 法の適用といった、未だ発展途上の方法を実用的に適用できるようにしなければならない。小室氏の今後の研究に期待したい。

6. 論文の評価

本研究では構造サンプリングの問題に対し、他の方法と比較の上で拡張アンサンブル法を適用し、必要な力場パラメーターを最新の量子化学計算に基づいて改良するなどしてミトコンドリア外膜受容体 Tom20-シグナル配列複合体の相互作用と、筋小胞体カルシウムポンプと ATP、 Mg^{2+} の相互作用を解き明かしている。得られている描像は、これらの蛋白質の働きの一部に関するものではあるが、現在なし得る最も徹底的な研究になっており、学術的に非常に高いレベルに達していると言える。

したがって、本論文が博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年1月7日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。