

報告番号

※甲

第

号

主論文の要旨

論文題目

Theoretical Study on Relaxation Processes of
Biopolymers in Aqueous Solution

(水溶液中における生体高分子の緩和過程の理論的研究)

氏名

高柳 昌芳

論文内容の要旨

本学位論文では、タンパク質に代表される生体高分子が示す生体機能に非常に重要な役割を果たしている緩和過程を、原子レベルから計算科学的手法により解明することを目指して、分子動力学 (MD) 法による理論的解析を行った。具体的には二つの緩和過程を解析対象とした。第一の緩和過程は、リボソーム上で合成途上にあるミオグロビン部分鎖が、その立体構造を鎖の伸長に合わせて徐々に変化させる共翻訳的フォールディング過程であり、第二章で議論した。第二の緩和過程は、一酸化炭素結合型ミオグロビンが可視光を吸収することによって生じるリガンド光解離過程であり、第三章で議論した。

第一の緩和過程である共翻訳的フォールディング過程は、タンパク質が機能を発現する際の基盤となる正しい立体構造、つまり天然構造の形成において、重要な役割を果たしていると考えられている現象である。実際、ある種のタンパク質においては、新規に合成されるタンパク質が正しい天然構造に折りたたまれる過程で、共翻訳的フォールディングが重要な役割を果たしているという報告がある。また、非平衡現象としての観点から見ると、共翻訳的フォールディング過程は、部分鎖に新しく残基が付与される毎に構造が徐々に変化する非平衡過程だと考えることができる。リボソームによるタンパク質合成速度は1残基あたり数十ミリ秒であることから、その時間スケールはミリ秒以上の比較的長時間なものである。

第二の緩和過程である一酸化炭素結合型ミオグロビンのリガンド光解離過程は、ヘム鉄に結合している一酸化炭素リガンドが可視光吸収によって解離する現象である。リガンドの解離によって、最初にヘムの構造が平面型からドーム型へと変化し、次にヘムの変形に誘発されて、ミオグロビン全体の構造が微小に変化する構造緩和が起こる。この構造緩和と並行して、吸収された光エネルギーの一部が熱エネルギーに変換されることで、ヘムに大きな熱エネルギーが蓄積されるため、ヘムから周囲のグロビン部や水溶媒へのエネルギー緩和過程も同時に生じる。これらのリガンド光解離によって引き起こされる緩和現象は、励起直後から励起後数百ナノ秒の間に進行する比較的早い時間スケールの非平衡現象であり、生体高分子が示す非平衡ダイナミクスの典型例として、非常に多くの実験的および理論的研究が蓄積されている。

このようなミオグロビンのリガンド光解離過程は、外部からの入力に対して、タンパク質がどのように応答することで機能を発現しているのかを調査するモデル系として考えることができる。具体例として、ミオグロビンと非常によく似たサブユニットから構成されているヘモグロビンのアロステリック効果がある。ヘモグロビンは、リガンド結合あるいは解離に誘起されて四次構造変化を起こすことで酸素分子親和性を調節しており、この四次構造変化の起こる過程を原子レベルから理解する上で、ミオグロビンのリガンド光解離過程で得られる知見が大いに役立つことが期待される。

本論文の第二章では、共翻訳的フォールディング現象の解明を目指して、ミオグロビン部分鎖の安定性を MD 法により理論的に解析した。4 種類の長さの異なる N 末端部分鎖 (36, 77, 92, 119 残基) と完全長 (153 残基) のミオグロビンについて、 α ヘリックスによって構成される結晶構造を初期構造として 10 ナノ秒間の MD 計算を実行し、その構造安定性を調査した。その結果、回転半径、平均自乗変位 (RMSD)、二次構造の解析から、長い部分鎖ほど α ヘリックスからなる初期構造がより安定であるという結論が得られた。また、得られた MD トラジェクトリから部分鎖の立体構造変化を追跡したところ、36 残基の部分鎖では特定の構造を取ることなく構造が大きくゆらぎ続けているのに対して、77 残基以上の部分鎖では初期構造が比較的安定に保たれていることがわかった。これは、B から E ヘリックスの領域 (20~76 残基の領域) にわたって主に疎水性の残基同士が接触しているため、初期構造の構造安定性が高いためと考えられる。この結果より、ミオグロビンのヘリックス構造で構成される結晶構造は、少なくとも 77 残基の長さまで部分鎖が合成されると安定に存在可能になることがわかり、共翻訳的フォールディングが起きていることが示唆された。

さらに、天然構造においてみられる残基間の接触が、部分鎖の伸長によりどのように形成されるのかを算出することで、共翻訳的フォールディングにおけるフォールディング経路の推定を行った。完全長ミオグロビンのフォールディング経路では、最初に AGH 疎水性コア領域が形成され、次に BCDE 複合領域が形成されるのに対して、今回推定した部分鎖ミオグロビンの経路では、逆に BCDE 複合領域が先に形成され、次に AGH 疎水性コア領域が形成される結果が得られた。このように部分鎖のフォールディング経路が完全長タンパク質の経路とは異なっている可能性が示されたことは、生体内でのフォールディング過程の特徴を理解する上で、共翻訳的フォールディングの寄与が重要であることを意味している。

本論文の第三章では、一酸化炭素結合型ミオグロビンがリガンド光解離後に起こす構造緩和過程を、MD 法により理論的に解析した。ここで着目したリガンド解離によって生じる構造変化は、常温における熱ゆらぎよりも微小なものであるため、従来のような単一の MD 計算を実行して解析を行っても、熱ゆらぎが大きなノイズとなり、意味のある情報を得ることは不可能である。そこで、多数の MD 計算を実行し平均を取ることで、熱ゆらぎの影響を取り除くアプローチを採用した。さらに、MD 計算の初期配置が偏っているために生じる計算結果への影響を取り除くために、全く同一の初期配置から、摂動としてリガンド光解離を与えて行う摂動 MD 計算と、摂動を与えずに行う非摂動 MD 計算の組を実行し、その差を取ることにした。このように多数の摂動および非摂動 MD 計算の組を実行し、それらの差の平均を算出する手法を摂動アンサンブル法と名付け、ミオグロビンのリガンド光解離過程の解析に適用した。

ミオグロビン全体の構造変化を調査するための指標として、回転半径およびその x, y, z 成分を算出した。600 組の摂動および非摂動 MD 計算結果から回転半径の平均値を算出したところ、熱ゆらぎを十分に相殺できており、ヘム平面に対して垂直な方向への非等方的膨

張が励起直後に生じていることを統計的に有意な精度で明らかにできた。この結果は、実験で得られている非等方的膨張と時間スケールも含めて一致しており、摂動アンサンブル法による解析結果が信頼できることを示している。また、このミオグロビンの非等方的膨張が、励起後 1 ピコ秒の間に水溶媒を圧縮することで水溶媒に行う力学的仕事が、熱力学的関係式より約 4.8 kcal/mol であることが推算された。これは、光励起直後のエネルギー緩和過程において、ミオグロビンの非等方的膨張がする力学的仕事は無視できない大きさであることを示している。

以上のように、本論文ではミオグロビンを計算対象として、共翻訳的フォールディングとリガンド光解離過程という二つの時間スケールの異なる非平衡過程を MD 法によって理論的に解析した。その結果、ミオグロビンでは 77 残基まで部分鎖が伸長すると、ヘリックス構造から構成される結晶構造が安定となることから、共翻訳的フォールディングが起きていることが示唆された。また、共翻訳的フォールディングにおけるフォールディング経路は、完全長ミオグロビンのフォールディング経路とは異なっていることが推定された。一方、リガンド光解離過程によって生じる構造緩和過程は、アンサンブル摂動法の適用によって、初めて統計的に有意な精度で計算科学的に解析可能となり、非等方的膨張が生じていることを明らかにできた。さらに、この非等方的膨張が行う力学的仕事は、エネルギー緩和の初期過程に少なくない寄与を果たしていることが示された。これらの結果は、MD 法による計算科学的解析が、タンパク質の機能に重要な役割を果たしている非平衡ダイナミクスを解明する上で、有力な手法であることを示している。

本論文で用いた MD 法による解析手順は、ミオグロビンに限らず他のタンパク質における非平衡ダイナミクスを解明する上でも適用可能なものである。直接的には、ミオグロビンと同様にリガンド脱着に伴う構造変化が重要な役割を果たしているヘモグロビンアロステリック効果の解明への適応が期待できる。他にも、ATP 分解により放出される化学エネルギーを、巨視的な運動エネルギーへと変換するモータータンパク質の機能発現機構の解析への応用が考えられる。これらの手法をさらに拡張させ、将来得られるであろう膨大な計算機資源を組み合わせることで、まさに機能を発現している最中のタンパク質に、どのような非平衡ダイナミクスが生じているのかを知ることが可能となり、生命活動を司る生体高分子の機能発現機構を原子レベルからより深く理解することが可能となるであろう。