

## 論文題目

# Prediction of Membrane Protein Structures by Replica-Exchange Method and Development of More Efficient Replica-Exchange Methods

## レプリカ交換法による膜タンパク質の立体構造予測と より効率的なレプリカ交換法の開発

名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻（物理系）  
理論生物化学物理研究室（TB）

浦野諒

### 博士論文要約

タンパク質のフォールディング問題は、DNA のアミノ酸配列情報だけから生理環境下でのタンパク質の立体構造(天然構造)を予測することができるのかを探求する。一方で、タンパク質の中で膜タンパク質と呼ばれる生体膜中に存在するタンパク質は、イオンや水分子の細胞内外の輸送に関係している重要なタンパク質を多く含み、また薬剤標的タンパク質の多くを占める重要なグループを構成する。創薬などにおいては、特に標的となる膜タンパク質の立体構造情報が存在するか否かは重要な点となっている。しかしながら、膜タンパク質の中で現在得られている立体構造情報は、Protein Data Bank における全タンパク質の約 2%程度であり、ゲノムにおける推定 30%に比べると小さな割合となっている。そのため、膜タンパク質の構造予測を行える手法が必要となってくる。その一つの候補が、原子レベルの分解能が得られるコンピュータシミュレーションによる構造予測である。天然構造は自由エネルギー最小状態と一致することが知られているが、現在のコンピュータ資源でも、膜タンパク質の天然構造の予測を膜環境の溶媒原子を含めて行うのは一般に困難である。よって、本研究の目的は、膜タンパク質の構造予測を可能にするための手法の開発とその有効性の確認である。

実際に計算効率の向上を行う手法としては、近似を取り入れてシミュレーションの原子数を減らし、必要な計算量を減らすことや、シミュレーションにおける構造探索の効率を上げるなどがある。それらの例として、高温でのエネルギー障壁の早い克服を利用するために温度の操作をいれるレプリカ交換法と呼ばれる構造探索法を用いる。2つには、溶媒分子を陰溶媒モデルとして取り扱うことで系の計算対象を減らす方法がある。この論文においては、まずレプリカ交換法の効率を上げる手法を提案し、その結果について調べたあと、過去の手法を拡張することで、より大きな膜タンパク質に適用できる構造予測法を考案し、その精度を調べた。

まず、初めに従来のレプリカ交換法では、主にメトロポリス判定を用いて、レプリカ交換の交換判定を行ってきた。しかし、この判定時に擬似乱数を使用するが、擬似乱数の使用により並列計算時の性能の低下を起こす例が報告されている。そのため、メトロポリス判定を用いる代わりに、レプリカ交換の判定をする内部状態を導入し、熱浴法に基づいて、熱平衡状態の確率分布を生み出すように内部状態に対する時間発展の微分方程式をつくって交換を行う手法を考案した。二次元イジング模型において、従来のレプリカ交換法の結果と比較し、比熱においては解析解も含めて、結果の一致が見られた。これにより、この微分方程式の振る舞いを調べることで、レプリカ交換法の振る舞いを調べることが可能にもなった。これにより、乱数よりも物理の分野では蓄積が多く、その方向の発展が期待できる。

次に、レプリカ交換法の効率を上げるための手法を提案した。従来のレプリカ交換法ではそれぞれのレプリカがどのような順番でそれぞれの温度を変えて行くかはランダムウォークにより決まっており、制御することができなかった。そのため、効率性の指標の一つである、最高温度と最低温度の間の往復回数であるトンネリング回数を上昇させるために、レプリカの温度の順番を指定することは、今までできなかった。よって、温度空間の効率のよい探索のためには、交換確率を上げるか、交換の試行ペアの増加が今までに行われていた。その中で、レプリカの経験する温度の順序を指定することで、シミュレーション中にある一定周期で必ずレプリカが温度を往復するようにした手法を提案した。ここで、重要であったのは、熱平衡状態を保つ詳細釣り合い条件を満たすには、経路の中で行きと戻りをペアにした交換順序とすることで対称性をつくることであった。理論的には、ランダムウォークでは移動距離が移動回数のルートに比例するのに対して、新手法では、移動回数に線形に比例するので、1乗のオーダーでトンネリング回数が上昇する。同時に、指定順序によって温度の交換を行うため、レプリカが温度を最低温度から最高温度まで往復するのにかかる時間を温度設定後の短いシミュレーションで予測することが可能になった。この手法が実際に熱平衡状態を保っており、熱平衡状態のエネルギー分布や比熱を精度よく再現できることを、二次元イジングモデルにより確かめた。トンネリング回数も交換頻度を変えることにより制御でき、従来から最大で約2倍程度の増加を得た。

また、膜タンパク質の構造予測について、過去の手法の拡張とその実験構造の再現性の確認を行った。先行研究である Kokubo and Okamoto (2004,2009)の用いた方法では、膜タンパク質の構造予測には天然構造でのヘリックスの曲がり方の実験情報が事前に必要であった。それはヘリックス構造を剛体として扱っていたためである。本研究においては、ヘリックス構造の取り扱いをフレキシブルモデルにして、彼らの提案した陰溶媒モデルもそれに合わせて拡張した。これにより、配列情報だけから、より大きな膜タンパク質の構造予測が可能になった。以上の新しい陰溶媒モデル、ヘリックス構造のゆがみの取り扱いを含めてレプリカ交換モンテカルロ法によるシミュレーションを一本の膜貫通ヘリックスの二量体であるグリコフォリン A と一本の膜貫通ヘリックスをもつフォスフォランバンにおいて行った。結果として、それぞれの天然構造は自由エネルギー極小構造の中に得られた。特にフォスフォランバンの天然構造は曲りを持っているが、その曲がりの程度を再現する構造は自由エネルギー最小構造でなく次の自由エネルギー極小構造であったのは、実験構造にお

ける周囲の分子との相互作用の重要性を反映しているとみられる。

最後に、七本の曲がりをもつ膜貫通ヘリックスをもつバクテリオロドプシン(bR)について、配列情報だけからの構造予測シミュレーションを行った。補欠分子であるレチナールはこの計算では含まれていない。結果として得られた構造は、天然構造を再現した。さらに、自由エネルギー極小構造より、以下の知見を得た。まず、シミュレーションを行った結果得られた自由エネルギーの最小構造と二番目に低い構造は、天然構造と天然構造ではレチナールの占める空間を他のヘリックスが埋めた構造を得た。過去の実験で提案された three stage model (2003) は bR におけるレチナール分子の自発的な bR の中への挿入という実験結果を、膜貫通ヘリックスの凝集による空白の形成で説明できた。本結果は、この説明と合致しており、three stage model の正しさを補完する結果となっている。よって、この結果は天然構造の再現を示すと同時に、挿入前の構造について予測構造を得たことを示している。次に、ヘリックス構造の柔軟性は、膜タンパク質において、チャネルやポンプの機能を果たすのに、重要な要素となっている。今回の新手法では、ヘリックス構造の取り扱いをフレキシブルにした結果、天然の再現構造はヘリックスの曲がりも含めて天然構造をよく再現した。フォスフォランバンの結果 bR の結果から、ヘリックス構造の屈曲位置はアミノ酸配列に、また、曲がる方向とその程度は周囲の分子との相互作用に、それぞれ支配されているという仮説を得た。

将来の展望として、bR において、レチナール分子を入れた計算を行った場合に、天然構造が自由エネルギー最小状態になるのかを確認することは、重要な課題である。また、構造予測の精度が確認されたため、新たに提案したレプリカ交換法を用いて、本来の目的である実際に構造未知の膜タンパク質に対して構造予測を行うことも次の課題である。