

別紙 4

報告番号	※	乙	第	号
------	---	---	---	---

主 論 文 の 要 旨

論文題目 粗視化モデルを用いたバクテリオロドプシンの
力-距離曲線の計算機シミュレーション

氏 名 山田 達矢

論 文 内 容 の 要 旨

生物の全遺伝子の20～30%は細胞膜中に局在する膜タンパク質をコードしており、それらの機能は生命活動の維持に重要な寄与をしている。近年、膜タンパク質の立体構造形成機構や構造安定性を一分子レベルで実験的に調べられるようになった。例えば原子間力顕微鏡(AFM)を用いると、膜中に安定に存在する膜タンパク質の末端をカンチレバーで捕捉して、膜外に引き抜く過程を測定できる。その際、膜表面・カンチレバー間距離(D)と、カンチレバーに作用する力(F)の関係をグラフ化すると、多数のピークを持った特徴的なF-D曲線が得られ、そのパターンは膜タンパク質の種類に応じて異なっている。F-D曲線は立体構造形成機構に直接関連する重要な情報を含んでいるが、そのパターン決定要因は十分に明らかにされてこなかった。

そこで、本研究ではF-D曲線のピークの形成機構を、計算機シミュレーションを用いて調べた。具体的には、AFMを用いてバクテリオロドプシン(bR)を強制的に引抜く過程をシミュレーションで再現し、その際に得られるF-D曲線を解析した。bRは光駆動プロトンポンプの機能を有する膜タンパク質であり、238個のアミノ酸残基で構成されている。最も良く研究されている膜タンパク質の一つであり、AFMによるF-D曲線の実験データも蓄積している。

本研究のために、膜タンパク質の粗視化モデルを開発した。このモデルでは、個々のペプチド結合の上に配置したビーズ(ペプチド結合粒子)が、紐状に連なったペプチド鎖として膜タンパク質を表現しており、全原子モデルに比して全自由度の数が著しく削減された。その結果、長時間のシミュレーションが可能となった。ビーズ間には主鎖間の水素結合に相当する相互作用が働き、膜貫通ヘリックスが形成されるように設計した。また、個々のビーズには、該当するアミノ酸の親水性/疎水性に応じて水相および脂質相に親和力が作用する力場関数を導入した。この力場関数は、「膜タンパク質の二段階モデル」(Popot, et al., 1987)に立脚している。二段階モデルに従うと、膜タンパク質の折り畳みは(1)個々の膜貫通ヘリックスの形成、(2)膜貫通ヘリックス同士の相互作用による三次構造

の形成、の2つの段階を経て進行すると考えられる。本研究では、膜タンパク質の立体構造形成機構に関する先行研究を精査した結果、F-D曲線のピーク形成には一段階目に関与する相互作用が深く関わっているとする作業仮説に基づき力場関数を設計した。

bRの強制引抜きシミュレーションをC, N末端側から各々128回ずつ実行した。その結果、過去の実験的報告(Oesterhelt et al., 2000; Sapro et al., 2008)を良く再現するF-D曲線が得られた。例えば、Sapro等が実行したC末端側からのbRの強制引抜きにおいて、F-D曲線上に11箇所をピークを観測しているが、8箇所が実験誤差の範囲内でシミュレーションの結果と一致した。さらに、本研究ではシミュレーションの利点を生かして、bRの強制引抜きの過程で現れるアンフォールディング中間体の立体構造を解析した。その結果、顕著なピーク形成に関与するアンフォールディング中間体では、(A)カンチレバー側の脂質膜界面に位置する疎水性アミノ酸が膜から引き抜かれる事に対する抵抗力 (B)カンチレバーと反対側にある膜界面の下部に位置するループ部分の親水性側鎖が膜に引き込まれる事に対する抵抗力、の2つの特徴的な因子が見いだされた。そしてさらに、粗視化シミュレーションで観測されたすべてのアンフォールディング中間体を10個のタイプに分類した。また、膜タンパク質のエネルギーランドスケープ上のアンフォールディング経路に存在するエネルギー障壁の高さと幅を用いてF-D曲線のピークを理論的に解析し、実験による測定結果がシミュレーションによって再現されていることを定量的に裏付けた。

以上の結果より、本研究で前提とした「膜タンパク質の個々の膜貫通ヘリックスを形成する相互作用がF-D曲線のピーク形成の寄与にとって重要である」とする作業仮説が成立していることが強く示唆された。また、膜タンパク質の立体構造形成機構に関わる1分子レベルの実験的な測定データをより詳細に解釈することが出来る様になった。