



Title	分子動力学計算によるタンパク質の立体構造予測およびタンパク質・リガンド間相互作用に関する研究
Author(s)	網崎, 孝志
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37688
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	あみ 綱	さき 崎	たか 孝	し 志
博士の専攻分野 の 名 称	博	士	(薬 学)	
学位記番号	第	9985	号	
学位授与年月日	平成 4 年 1 月 7 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
学位論文名	分子動力学計算によるタンパク質の立体構造予測および タンパク質・リガンド間相互作用に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教 授 富田 研一			
	(副査) 教 授 今西 武 教 授 岩田 宙造 教 授 北川 獻			

論 文 内 容 の 要 旨

最近、分子動力学計算が安定コンフォメーションの探索および相対的自由エネルギーの算出へ応用され、その利用価値が飛躍的に高まってきている。本研究では、分子動力学計算による安定コンフォメーション探索法を発展させ、類縁酵素間の相同性に基づく束縛分子動力学計算を開発し、これを用いてホスホリパーゼ A₂（以後 PLase A₂）およびエラスターーゼの立体構造予測を行なった。また、自由エネルギー摂動法と分子動力学計算を組み合わせて用い、リボヌクレアーゼ T₁（以後 RNase T₁）の変異による構造と機能の変化を推定した。

一般にタンパク質分子の内部自由度は非常に大きく、単に通常の分子動力学計算を行なっても、アミノ酸配列から立体構造を予測することはできない。この問題を克服する一つの方法として、類縁酵素との相同性に基づく束縛条件を導入した束縛分子動力学法を考案した。この手法の有用性を検討するため、既にX線構造解析されているウシ臍臓 PLase A₂ [S. Brunie *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260, 9742 (1985)] を参照酵素として、*C. atrox* ヘビ毒 PLase A₂の立体構造を予測することを試みた。計算は、(i) 出発構造の構築→(ii) 二次構造の発生→(iii) 立体構造の発生→(iv) 立体構造の精密化の順で行った。この特徴は、原子間距離束縛に対するポテンシャルエネルギーは独自の線形の表現のものを用いたこと；温度は一定で310Kとしてシミュレーションを行なったこと；出発構造のポリペプチド鎖は伸張型としたこと；左巻らせんなどの発生を防ぐためにねじれ角に関する束縛を設定し二次構造を発生させたこと；立体構造発生の初期の段階では穏やかな性質を持つ調和型のvan der Waals ポテンシャルで構造上の大きなひずみを解消したことである。Kollmanらが開発した分子動力学計算用プログラム AMBER3.0 [U. C. Singh *et al.*, *AMBER3.0* (1986)] に、これらの束縛エネルギーの取扱いに関する機能を追加し、以後の計算に用いた。

既に報告されている *C. atrox* PLase A₂ の結晶構造 [B. W. Dijkstra et al., *J. Mol. Biol.*, 147, 97 (1981)] を真の構造とし、その構造と前述の方法で予測した構造を比較した。その結果、両構造におけるペプチド骨格原子のずれの二乗平均の平方根 (rms偏差) は1.6 Åであり、両者はよく一致していた。水素を除く全原子の rms 偏差は触媒部位で0.5 Å, 界面認識部位で1.3 Åと良好な結果を得た。さらに本手法的一般性を示すため、ブタ臍臓エラスター [E. Meyer et al., *Acta Crystallogr.*, B44, 26 (1988)] を参照酵素としたウシ臍臓 β トリプシンの立体構造予測を行った。この酵素は PLase A₂ と比べて約 2 倍の分子量を持ち、アミノ酸配列の相同性は34%と PLase A₂ の場合 (42%) よりも低い。PLase A₂ の場合と同様の束縛分子動力学計算により得た構造と真の構造 (X線結晶構造 [H. D. Bartunik et al., *Mol. Biol.*, 210, 813(1989)]) の一致は良好で、ペプチド骨格原子の rms 偏差は2.1 Å であった。以上の結果より本研究で開発した束縛分子動力学計算によるタンパク質の立体構造予測法は、多くのタンパク質に有効であり、また推定精度も実用上十分であると考えることができる。

次に RNase T₁ の変異に関する分子動力学／自由エネルギー摂動計算について述べる。RNase T₁ - 2'GMP 複合体の結晶構造では RNase T₁ の45番目のアミノ酸残基のチロシン (Tyr) とグアニン塩基の間にスタッキング相互作用が観測され、Tyr45 にはグアニン塩基を保持する働きがあると考えられている。このTyrをより大きな芳香環をもつトリプトファン (Trp) に置換した変異体では、基質への結合能が増大し、その結果として活性が上昇していることが報告されている [S. Hishikawa et al., *Eur. J. Biochem.*, 173, 389(1988)]。本研究ではこの変異に関する分子動力学／自由エネルギー摂動計算を行なった。

野生型 RNase T₁ から変異型 RNase T₁ への変異に伴う自由エネルギー変化 ΔG_1 と、2'GMP が結合した状態での変異に伴う自由エネルギー変化 ΔG_2 を求めた。これには自由エネルギー摂動法 [S. Rao et al., *Nature*, 328, 551 (1987)] を用い、分子動力学計算で発生させた原子配置からアンサンブル平均を求めた。分子動力学計算はプログラム AMBER 3.0 を用い、温度310 K で水溶液中でのシミュレーションを行った。その結果、RNase T₁ 単独と RNase T₁ - 2'GMP 複合体の間での変異に伴う自由エネルギー変化の差の推定値 $\Delta \Delta G_{bing} = \Delta G_2 - \Delta G_1$ は -3.4 ± 1.9 kJ/mol となった。これに対して平衡ゲルろ過法による実測値は、 -2.5 ± 0.3 kJ/mol であり、両者はよく一致していた。

分子動力学計算により得た変異型 RNase T₁ の構造と野性型 RNase T₁ の結晶構造を比較すると、C^a 原子の rms 偏差は1.1 Å であった。変異に起因する構造変化は局所化され、また微少であった。ただし、Tyr45 をより大きな芳香環をもつ Trp に置換したため、グアニン塩基とのスタッキングの接触面積が増大し、2'GMP がより強力に RNase T₁ に結合していた。またグアニン塩基との水素結合に関与している残基にも若干の違いがみられた。ごく最近になって明らかにされた変異型 RNase T₁ - 2'GMP 複合体の結晶構造においても同様の事実が観測され、本計算結果の正当性を示している。

RNase T₁ 分子の表面に位置する Tyr45(Trp45) 側鎖の芳香環は、2'GMP への結合により露出表面積が $\frac{1}{2}$ に減少する。したがって、2'GMP に対する結合自由エネルギー変化の野性体と変異体での差は、Tyr と Trp の疎水的性質の差の $\frac{1}{2}$ 倍に相当すると思われる。アミノ酸側鎖の疎水的性質は、

水から非極性溶媒への移行に伴う自由エネルギー変化 ΔG_t で示すことができるが、文献値をもとに計算したTyrとTrpの間の $\frac{1}{2}\Delta\Delta G_t$ は $-2.3 \sim -3.7 \text{ k J/mol}$ ありこの仮説を支持している。すなわち、変異によりもたらされた変化は45番目のアミノ酸残基の側鎖の疎水的性質の違いでほぼ説明できることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究では、分子動力学計算による蛋白質の安定コンフォメーションを探索する目的で、類縁酵素との相同性に基づく束縛条件を導入した分子動力学法を考案し、ヘビ毒ホスホリパーゼA₂およびウシ臍臓βトリプシンの立体構造を予測したが、その結果この予測法が他の蛋白質にも十分適用可能であることが明らかになった。

また分子動力学によるリボヌクレアーゼT₁の自由エネルギー摂動計算を行ない、チロシン45をトリプトファンに置換した変異体と天然体との自由エネルギー変化の差（ $-3.4 \pm 1.9 \text{ K J/mol}$ ）が45番目のアミノ酸残基側鎖の疎水性の違いによることを明らかにした。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。