



Theoretical model and simulation of protein conformational change coupled with ligand binding

Okazaki, Kei-ichi

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Date of Publication)

2011-11-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4512

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004512>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 岡崎 圭一
博士の専攻分野の名称 博士（理学）
学 位 記 番 号 博い第 4512 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Theoretical model and simulation of protein conformational change coupled with ligand binding
(リガンド結合と共役したタンパク質の構造変化の理論モデル構築とシミュレーション)

審 査 委 員

主 査 教 授 鏑木 基成
教 授 富永 圭介
教 授 田中 成典
京都大学准教授 高田 彰二

(氏名： 岡崎 圭一 NO. 1)

本論文は、3つの章から構成されている。

タンパク質は、しばしば allostery によって機能を調節されている。allostery とは、あるサイトへのリガンド結合が離れた場所の結合サイトの親和性や酵素活性に影響を与える効果である。この allostery は、構造変化によって引き起こされていることが多い。そこで、Chapter 1 では特に大規模な構造変化をうまく記述することができる粗視化モデルを構築した。構造変化をするタンパク質のエネルギー地形は、フォールディング・ファネルの底にそれぞれの構造に対応する2つ(以上)の安定な谷(basin)があると考えられる。そこで、それぞれの構造にファネル型エネルギー地形を実現する郷モデルを適用して、それらをつないだ2(多)状態のファネル型ポテンシャルを考えた、“multiple-basin energy landscape model”を構築した。(Okazaki *et al. PNAS*,103(no.32),11844-11849,2006)このようなポテンシャルを用いて、アミノ酸を1つの球で粗視化したモデルで、温度一定のシミュレーションを行った。大きな構造変化を示す、Glutamine binding protein や S100A6 などに適用した結果、局所的な unfolding によりエントロピーを獲得することで大きなエネルギー障壁を打ち消して自由エネルギー障壁を下げていること、構造変化の仕方の違い (hinge 動きや shear 動きなど)や温度によって構造変化の経路が変わることなどを示した。

Chapter 2 では、allostery の本質である構造変化とリガンド結合の共役の仕方に注目をした。リガンド結合に伴ってタンパク質の構造変化が起こる allostery の主要なメカニズムとして、「induced-fit モデル」と「population-shift モデル」がある。induced-fit モデルでは、まずリガンドが弱く結合してから構造変化を誘起する。population-shift モデルでは、リガンドなしでタンパク質は apo 構造と holo 構造の間で平衡状態にあり、リガンドが holo 構造に選択的に結合することで平衡が holo 構造にシフトする。どちらのモデルになるかは、個々のタンパク質・リガンド相互作用によって決まっていることが、数少ない実験から分かってきた。そこで、構造変化は Chapter 1 で導入した multiple-basin model による分子動力学法(MD)で計算をし、新たにリガンド結合/解離をモンテカルロ法(MC)で確率的に表現する implicit ligand model を構築して、MD-MC 共役シミュレーションを行った。(K. Okazaki and S. Takada, *PNAS*,105(no.32),11182-11187, 2008)すると、リガンド結合の相互作用の強さと相互作用距離に応じて、2つのモデルの取りやすさが変わることが分かった。つまり、相互作用が強くなるにつれて population-shift より induced-fit が主要な経路となる。また、相互作用距離が長距離になるにつれて population-shift より induced-fit が主要な経路となる。このシミュレーション結果を受けて、実際に実験的に population-shift と示されている抗体 SPE7 とそのリガンドについて結合サイトを調べた結果、接触面は小さく(つまり相互作用が弱い)疎水性残基などが多く見られる(つまり短距離力)ことが分かった。一方で、実験的に induced-fit と示されている DNA 結合タンパク質 M.Hhal とその結合パートナーである DNA を調べると、接触面は大きく(相互作用強い)結合サイトは正、DNA は負の電荷を帯びて静電相互作用(長距離力)が主要であると思われることが

(氏名： 岡崎 圭一 NO. 2)

分かった。これは、ここでのシミュレーション結果と一致していることが分かる。

最後に、Chapter 3 では、Chapter 1 で開発した multiple-basin model と Chapter 2 で開発した implicit ligand model を分子モーター F₁-ATPase の動作機構における allostery に応用をした。F₁-ATPase は、リングサブユニットにある3つの触媒部位で ATP を加水分解して、それによって得られた自由エネルギーから回転子 γ -サブユニットの回転運動を生み出している。どのようなメカニズムで、化学エネルギーから力学エネルギーに変換されているのか、最近の実験またはシミュレーションにより明らかになりつつある。一つの考え方として、 γ -dictator mechanism がある。これは、 γ の回転角度によって、ヌクレオチド状態が制御されているという考え方である。この考えを検証するために、まず、 γ の回転角と ADP 解離の間の allostery についてシミュレーションを行った結果、 γ を正方向に回してやることで ADP サイトが open 構造へ構造変化する速度が速くなることを示し、 γ と ADP site の β の間の相互作用が重要であることを示した。また、80°回転を生み出す ATP 結合、ADP 解離の間の allostery についても解析をして、2つのプロセスのタイトなカップリングに γ -サブユニットの存在が必要不可欠であることを示した。これらの結果はともに、 γ -dictator mechanism を示唆している。

氏名	岡崎 圭一		
論文題目	Theoretical model and simulation of protein conformational change coupled with ligand binding (リガンド結合と共役したタンパク質の構造変化の理論モデル構築とシミュレーション)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	鏑木 基成
	副査	教授	富永 圭介
	副査	教授	田中 成典
	副査	准教授	高田 彰二

要 旨

概要

本論文は3章より構成されている。

タンパク質は、しばしば allostery によってその機能が調節されている。allostery とは、あるサイトへのリガンド結合が同じ分子の離れた場所にある結合サイトの親和性や酵素活性に影響を与える効果である。この allostery は、構造変化によって引き起こされていることが多い。そこで、Chapter 1 では特に大規模な構造変化をうまく記述することができる粗視化モデルを構築した。構造変化をするタンパク質のエネルギー地形は、フォールディング・ファネルの底にそれぞれの構造に対応する2つ(以上)の安定な谷(basin)があると考えることができる。そこで、それぞれの構造にファネル型エネルギー地形を実現する郷モデルを適用して、それらをつないだ2(多)状態のファネル型ポテンシャルを考えた、“multiple-basin energy landscape model”を構築した。(Okazaki et al. PNAS, 103 (no.32), 11844-11849, 2006)このようなポテンシャルを用いて、アミノ酸を1つの球で粗視化したモデルで、温度一定のシミュレーションを行った。大きな構造変化を示すことが知られている Glutamine binding protein や S100A6 などに適用した結果、局所的な unfolding によりエントロピーを獲得することで大きなエネルギー障壁を打ち消して自由エネルギー障壁を下げていること、構造変化の仕方の違い (hinge 動きや shear 動きなど) や温度によって構造変化の経路が変わることなどを示せた。

Chapter 2 では、allostery の本質である構造変化とリガンド結合の共役の仕方に注目をした。リガンド結合に伴ってタンパク質の構造変化が起こる allostery の主要なメカニズムとして、「induced-fit モデル」と「population-shift モデル」がある。induced-fit モデルでは、まずリガンドが弱く結合してから構造変化を誘起する。それに対して、population-shift モデルでは、リガンドなしでタンパク質は apo 構造と holo 構造の間で平衡状態にあり、リガンドが holo 構造に選択的に結合することで平衡が holo 構造にシフトする。どちらのモデルをとることになるかは、個々のタンパク質・リガンド相互作用によって決まっていることが、数少ない実験から分かってきた。そこで、構造変化については Chapter 1 で導入した multiple-basin model による分子動力学法(MD)で計算をし、リガンド結合/解離については、新たにモンテカルロ法(MC)で確率的に表現する implicit ligand model を構築して、MD・MC 共役シミュレーションを行った (K. Okazaki and S. Takada, PNAS, 105 (no.32), 11182-11187, 2008)。すると、リガンド結合の相互作用の強さと相互作用距離に応じて、2つのモデルの取りやすさが変わることが分かった。つまり、相互作用が強くなるにつれて population-shift よりも induced-fit が主要な経路となる傾向が見られた。また、相互作用距離が長距離になるにつれて population-shift より induced-fit が主要な経路となる傾向が見られた。このシミュレーションによる結果を受けて、実際に実験的に population-shift 経路を

氏名	岡崎 圭一		
論文題目	Theoretical model and simulation of protein conformational change coupled with ligand binding (リガンド結合と共役したタンパク質の構造変化の理論モデル構築とシミュレーション)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	鏑木 基成
	副査	教授	富永 圭介
	副査	教授	田中 成典
	副査	准教授	高田 彰二

とることが示されている抗体 SPE7 とそのリガンドについて結合サイトを調べた結果、接触面は小さく(つまり相互作用が弱い)、疎水性残基などが多く見られる(つまり短距離力)ことが分かった。一方で実験的に induced-fit をとることが示されている DNA 結合タンパク質 M.HhaI とその結合パートナーである DNA との間の結合を調べると、接触面は大きく(相互作用が強い)、結合サイトは正、DNA は負の電荷を帯びて静電相互作用(長距離力)が主要な力であることが分かった。これは、本研究でのシミュレーション結果と一致していることが分かる。

最後に、Chapter 3 では、Chapter 1 で開発した multiple-basin model と Chapter 2 で開発した implicit ligand model を分子モーター F₁-ATPase の動作機構における allostery に応用をした。F₁-ATPase は、リングサブユニットにある3つの触媒部位で ATP を加水分解して、それによって得られた自由エネルギーから回転子 γ -サブユニットの回転運動を生み出している。どのようなメカニズムで、化学エネルギーから力学エネルギーに変換されているのか、最近の実験またはシミュレーションにより明らかになりつつある。一つの考え方として、 γ -dictator mechanism がある。これは、 γ の回転角度によって、ヌクレオチド状態が制御されているという考え方である。この考えを検証するために、まず、 γ の回転角と ADP 解離の間の allostery についてシミュレーションを行った結果、 γ を正方向に回してやることで ADP サイトが open 構造へ構造変化する速度が速くなることを示し、 γ と ADP site の β の間の相互作用が重要であることを示した。また、80° 回転を生み出す ATP 結合、ADP 解離の間の allostery についても解析をして、2つのプロセスのタイトなカップリングに γ -サブユニットの存在が必要不可欠であることを示した。これらの結果は共に、 γ -dictator mechanism が機能していることを示唆している。

以上のように本論文はタンパク質の大規模な構造変化をうまく記述できるような粗視化モデル (multiple-basin energy landscape model) を開発し、リガンド結合/解離過程を確率的に表現する implicit ligand model と組み合わせることにより、分子回転モーター F₁-ATPase の動作機構を解明しようとするものであり、タンパク質・酵素において見られる大規模構造変化の本質を理解するための重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の岡崎 圭一は、博士(理学)の学位を得る資格があると認める。