

DNA 結合蛋白質 HU の温度による機能変化に関する 分子動力学シミュレーション

学位論文内容の要旨

情報分子である DNA から機能分子である蛋白質に研究の重心が移動し、いわゆるポストゲノム時代に突入しつつある。ポストゲノム時代ではこれまでの要素還元的な研究手法から、ゲノム情報、蛋白質機能・構造情報などの網羅的な情報を元にした体系的な研究手法へとシフトすると考えられる。特に蛋白質の構造と機能については両者未だ網羅し切れておらず、蛋白質一分子についての生化学的機能解析と協調して、続々と解析される機能未知な蛋白質立体構造から機能情報を抽出するデータマイニング手法が必要になってくる。

近年になって蛋白質の動きが機能と密接な関係があることが言われており、立体構造から分子の動きを直接再現する分子動力学シミュレーションによる機能予測法に期待が持たれている。しかし蛋白質分子の構造・動き、そして機能の複雑さにより動きからの機能予測は大変難しく、未だ確立した手法は登場していない。更に「蛋白質の機能」と言っても整理されたものではなく、生化学実験で確認された現象を機能と言っている状態である。また前提としての分子動力学法の適用範囲が問題であり、現在は個々の蛋白質に各自計算環境に見合った条件を与えてシミュレーションを行っている。本学位論文ではこうした問題を対象とし、「結合」という単純な機能と評価し易い動きを兼ね備えた蛋白質 BstHU を取り上げ、汎用 PC・ソフトウェアを用いて BstHU に最適化した分子動力学を様々な条件で適用することで BstHU の動きを網羅的に解析し、「結合」する機能との関連付けを行う。また、同条件下で BstHU と同じファミリーの蛋白質 TF1 に分子動力学法を適用し、機能予測が可能か検証する。さらに計算条件を変えてシミュレーションを行い、計算条件の違いが機能予測に与える影響を調査する。これらのシミュレーション結果を元に、分子動力学法による動きと機能の関連付け及び動きによる機能予測について述べる。

本論文は六章から構成されている。以下にその概要を示す。

第一章ではまずポストゲノム時代における構造生物学の問題点を述べ、分子動力学を導入する。本論文で扱った蛋白質・BstHU、TF1 のイントロダクション、蛋白質と温度の関係性を述べ、本論文の目的を述べる。BstHU は「DNA に結合する」機能を持ち、長く柔らかい機能的 arm と硬い body からなる。BstHU は温度に依存した挙動の生化学実験データが充実していることから、本論文では特に温度に依存した蛋白質の動きと機能の変化を扱う。BstHU、TF1 とともに機能的モジュールが大きく柔ら

かいので評価し易い。最後に、本論文で行った解析手法の解説をする。

第二章では、始めに分子動力学及びソフトウェア AMBER について詳細を述べ、本研究で用いたパラメータ設定について述べる。踏まえて環境温度を変えたシミュレーション結果から BstHU の動きを比較、温度を変えたことによる機能の変化を議論する。本研究では水分子に TIP3P を陽に使い、Particle mesh Ewald 法を採用して多くの coulomb 力を考慮して行った。計算コストの問題から cut off 距離は 8 Å とし、周期境界条件を用いた。温度は 37°C・51°C・64°C(至適温度)・77°C・91°C で、それぞれ 4nsec(4,000,000steps)のシミュレーションを行った。シミュレーション過程の立体構造軌跡をそれぞれの温度で重ね合わせ、至適温度の構造軌跡を重ね合わせたものと比較を行うことにより、温度に依存した動きの変化を解析し機能性の変化との関連付けを行った。arm に関しては全体或いは残基毎に RMSD を測定し、詳細な解析を行っている。生化学実験データと比較して、BstHU に関して一分子からの DNA 結合モデルを提案している。特に 91°C のシミュレーションでは、BstHU は DNA がモジュール内に入り込めない構造を多くとったが、この結果は BstHU の高温での構造及びそれに伴う機能損失を一分子で表している。

第三章では、BstHU より低い温度で変性する変異体 BstHUG15E に関して 64°C でのシミュレーションを行い、構造不安定性導入による動きの変化、及び機能への影響を解析する。BstHUG15E に関しては変性温度が 10°C 下がること、一方で DNA 結合能は変わらないことが生化学実験で示されているが、64°C では BstHU G15E は DNA 結合を阻害しない構造をとり、BstHUG15E はシミュレーションからも機能は失われないことが示唆された。しかし機能的モジュールである arm の動きは明らかに変化しており、RMSD 解析の結果、64°C では構造が崩れ易いことが示唆された。

第四章では、HU と同じ Type-II DNA binding protein に属し、常温菌である大腸菌の TF1 に関し 37°C と 64°C での 1nsec のシミュレーションを行い、HU の動きとの比較を行っている。arm についての構造軌跡解析により、TF1 は HU と同じく高温では DNA に結合しにくい構造を多くとることが示された。HU と TF1 では立体構造解析手法に依存した初期構造の歪みに違いは見られたが、nsec オーダーのシミュレーションを行い蛋白質骨格の大きな動きに着目することで、蛋白質のファミリー内で統一した性質が見られた。それを踏まえて、Type-II DNA 結合蛋白質の枠組みで DNA 結合に関するモデリングを行っている。

第五章では、富士ゼロックス社製の非結合相互作用の計算速度を専用に行う高速分子動力学計算ボード MD Engine -II を用いて、長距離相互作用をほぼ 2 倍まで延長考慮した計算を行った結果を示している。cut off 距離を 2 倍まで延ばすことにより HU の動きは異なったものとなった。シミュレーション環境の違いによる蛋白質の分子動力学への影響について考察を述べている。

第六章では、本論文のまとめと総括を行っている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 和 田 充 雄
副 査 教 授 大 森 隆 司
副 査 教 授 嘉 数 侑 昇
副 査 教 授 大 内 東

学 位 論 文 題 名

DNA 結合蛋白質 HU の温度による機能変化に関する 分子動力学シミュレーション

蛋白質は生体内の機能分子であり、自然のある法則に従い決められた立体構造を持つことで機能する。構造生物学では生体分子の構造を扱い生命現象を明らかにするが、その構成及び構造の複雑性により、構造と機能を完全に対応させることが出来ていない。このため、蛋白質工学では、1 万種以上ともいわれる蛋白質の網羅的立体構造解析などにより、累積的に蓄積される立体構造情報から機能情報を抽出する手法が強く求められている。しかし蛋白質の機能は一分子一機能対応ではなく様々であり、機能性の定義づけなど行われていないのが現状である。また立体構造も蛋白質の構成や機能環境などにより様々であるから、構造から出る動きと機能の系統だった関連付けは困難で、未だ行われていない。

近年になって、蛋白質の構造変化、即ち動きがその機能性と関連していると言われており、立体構造情報から特定のアミノ酸の動き情報を捉え、その機能の発現を解析するデータマイニング手法の一つとして分子動力学シミュレーション法が脚光を浴びている。蛋白質の立体構造解析は結晶化した状態、いわば死んだ状態で計測されるのに対し、実際には水溶液や脂質などの中に存在するのであるから、分子動力学的手法は生きた状態に近い動きを再現することができると期待されているのである。しかしながら、分子動力学法自体にも古典力学的枠組みでは整備されてきているものの、複雑な相互作用力を全ての分子にわたって逐次計算し、温度揺らぎや圧力の変化に対応して長時間計算することからナノ秒程度でシミュレーション限界に突き当たってしまう。この他にも境界条件の与え方、高速処理アルゴリズムの与え方によって結果が変わるという問題もあり、構造生物学、生化学からのデータとつぎ合わせながら機能解明を進めていかなければいけない状況にある。

本学位論文は、こうした問題を踏まえシミュレーション対象として、Type-II DNA 結合蛋白質 family である BstHU を取上げている。この蛋白質は、DNA をフォールディングする機能を持ち、その構造生物学データも整えられ、また生化学実験データもあることから、これらの知見と対比しながら分子動力学シミュレーションによってその動きから機能

の発現との関連性を明らかにすることに成功している。さらに BstHU と同じ Type-II DNA 結合蛋白質ファミリーに属し、よく似た立体構造をとる蛋白質・TF1 について温度パラメータを変化させたシミュレーションを行い、Type-II DNA 結合蛋白質に共通した温度に依存した構造変化及び機能変化を抽出し、DNA 結合機能と温度との関係に関する新たな知見を付け加えている。

本論文の主要な結果を以下にまとめる。

第一章では、本論文の動機となった問題点、蛋白質と動きの関係、本論文で扱う蛋白質 BstHU に最適化した構造変化解析手法について述べ、BstHU の機能部位は柔らかい arm であるから、既存の RMSD 解析手法を arm に最適化させることにより、特に機能と関連した動きの評価手法を提案している。

第二章では、分子動力学及び分子動力学ソフトウェア・AMBER について述べ、特に本論文で最適にチューニングした各種シミュレーションパラメータ、並びに温度の設定方法について明らかにし、この上で 37, 51, 64, 77, 91℃において行った BstHU のシミュレーションの結果を示している。この上で、蛋白質の立体構造解析に関する知見、BstHU の温度に依存した動きの変化と生化学実験による構造・機能変化の関連付けに関する知見を得ている。

第三章では、コンピュータ上で作成した BstHU の耐熱温度変異体についてシミュレーションを行い、生化学実験データと比較することで BstHU の至的溫度での動きと DNA フォールディング機能との関係を多面的に定量化した知見を得ている。

第四章では、BstHU と同じ Type-II DNA 結合蛋白質である TF1 について温度を変えたシミュレーションを行い、BstHU の同じ温度差でのシミュレーションと比較することで Type-II DNA 結合蛋白質ファミリーの動きと機能の変化について共通する特性を得ている。

第五章では、BstHU に関して環境条件を周期境界条件から非周期境界条件に変えたシミュレーション、また計算加速ボードを用い長距離相互作用を考慮したシミュレーションについて評価し、将来の分子動力学的シミュレーション技術の発展方向を論じている。

これを要するに、本論文は蛋白質の構造と機能の解明を進める上で重要性が増している分子動力学シミュレーション手法を発展的に適用し、構造生物学的解析にも適合する評価を行って、対象とした BstHU の動きと機能性の関連性について有益な知見を得たものであり、この成果はシステム情報工学、生物複雑系工学に寄与するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。