

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	安田賢司
論文題目	Studies Based on Statistical Mechanics for Structural Stability of Proteins and Protein Complexes (タンパク質及びタンパク質複合体の立体構造安定性に関する統計力学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、「溶媒に対して分子モデルを採用する；タンパク質（及びそれらの複合体）を原子レベルで扱う；タンパク質－溶媒分子間の多体相関を考慮した独自の統計力学理論（分子性流体用積分方程式論と形態熱力学的アプローチの統合型方法論）を用いる；溶媒の並進配置エントロピーを新機軸とする」ことなどを特徴とし、タンパク質やそれらの複合体の立体構造安定性を解析したものであり、全7章から成る。</p> <p>第1章は序論で、「排除体積効果に起因する溶媒のエントロピー利得がタンパク質折り畳みなどの種々の自己組織化の駆動力であること；個々の溶媒分子の存在も他の溶媒分子にとっての排除容積を生成することに起因して生じるタンパク質－溶媒分子間の多体相関が決定的に重要であること；従来朝倉－大沢理論やMintonのクラウディング理論では溶媒が不活性なバックグラウンドとみなされていること；たとえ溶媒を分子集団として扱ったとしてもこれらの理論を適用すると上記多体相関が考慮できないこと；この多体相関は溶媒に対して分子モデルを採用した精密な統計力学理論を用いて初めて考慮できること」などを論じている。</p> <p>第2章では、水環境中において側鎖の充填が2次構造選定に決定的な影響を与えることを明らかにしている。2次構造は、「主鎖の排除体積を減少させることによる水のエントロピー利得」と「分子内水素結合形成によるタンパク質－水分子間水素結合切断の補償」の両方を確保できる格好の構造ユニットであり、できるだけ多く形成することが望まれる。しかし、折り畳み過程においては、膨大な水のエントロピー利得をもたらす側鎖の密な充填がむしろ優先され、それを達成できるようなα-ヘリックスやβ-シートの含有率が選定される。その結果、天然構造の2次構造含有率は必ずしも高くない。また、α-ヘリックスのみ、β-シートのみ、あるいはその両者を有する多様な天然構造が安定化される。</p> <p>第3章では、木下らによって構築された、タンパク質立体構造に依存して変化する自由エネルギー関数（以下、関数1）の性能を「デコイ構造と呼ばれる非天然構造のセットと天然構造の中から天然構造を射当てる（自由エネルギー関数に最低値を与える立体構造を選び出す）テスト」により詳細に検討している。テストは、8つのデコイセットの133種類に及ぶタンパク質に対して行われ、現在までに報告されているどの関数をも凌駕する成績（ほぼ100%の的中率）を取めている。この結果は、関数1が天然構造の特徴を的確に捉えており、タンパク質の立体構造予測に適用可能であることを示している。</p> <p>第4章では、水及び疎水環境中におけるタンパク質の立体構造安定性を比較検討している。関数1は水環境にしか適用できないため、疎水環境中のタンパク質（膜タンパク質など）に適用可能な自由エネルギー関数を新たに開発している。疎水環境中で</p>			

は溶媒のエントロピー効果が弱くなり、側鎖の密な充填よりも分子内水素結合形成の方が重要となる。 α -ヘリックスは β -シートよりもより効率良く分子内水素結合を形成でき、前者が好んで選定される。水環境中におけるような立体構造の多様性は見られなくなる。膜タンパク質は α -ヘリックスを高い含有率で形成することが多いが、 α -ヘリックス同士の会合は脂質2重層膜の疎水鎖を構成する炭化水素基 (CH_2 , CH_3 , CH) の並進移動に起因するエントロピー利得により駆動されることを論じている。

第5章では、関数1とそのエンタルピー及びエントロピー成分を用いて、実験情報に基づいて決定されたタンパク質天然構造モデルのキャラクタリゼーションを行う方法を提案している。モデルは、実験手法や実験条件、構造計算の方法などの影響を大きく受け、同一のタンパク質に対して複数のモデルが提案されているというのが現状である。本方法を用いることにより、各々のモデルの特徴や弱点が明らかになり、より良いモデルを作成するための有用な指針が得られる。

第6章では、タンパク質-タンパク質界面のホットスポット (2つのタンパク質の結合自由エネルギーを支配する少数のアミノ酸残基) の予測法を構築している。例えば、アミノ酸置換によって結合力を強化したい場合、ホットスポットを置換してしまうと結合力が低下するため、ホットスポット以外のアミノ酸残基を置換することが推奨される。ホットスポットの有名な予測法として、タンパク質分子内エネルギーと、水を連続体として扱って計算した水和自由エネルギーを考慮したRobettaが知られている。Robettaは、実験データと合致するように調節される複数のフィッティングパラメータを含んでいる。一方、排除体積効果に起因する水のエントロピーのみに着目した本予測法は、一切のフィッティングパラメータを用いていないにも拘わらず、Robettaよりも優れた性能を有する。この結果は、水のエントロピー効果がホットスポットの物理起源を的確に捉えていることを示している。

第7章は本論文の総括である。水および疎水環境中におけるタンパク質立体構造形成のメカニズムが明らかにされた。上述した2通りの自由エネルギー関数の計算時間は、タンパク質を原子レベルで扱い溶媒に対して分子モデルを採用しているにも拘わらず、形態熱力学的アプローチの導入により、1つの立体構造あたり1秒程度に抑えることができている。出来る限り少ないNMR実験情報 (願わくばケミカルシフトのみ) から優れた天然構造モデルを作成できる方法の開発が期待される。実験情報がゼロとなった場合が天然構造の立体構造予測に対応し、その糸口が開かれたと言っても過言ではない。膜タンパク質は、その立体構造を実験的に決定するのが難しいため、理論的援用が必要であるが、本論文で開発された自由エネルギー関数が使えるであろう。

「水のエントロピー効果のみでホットスポットを予測できる」という結果は、広く一般のレセプターとリガンドの結合力の制御にも応用することができ、ターゲットタンパク質の活性部位と選択的に結合する低分子の設計に向けた研究に大きく寄与する。タンパク質あるいはタンパク質複合体の機能はその立体構造と密接に関係するため、本論文で得られた成果は、タンパク質やそれらの複合体の機能改変、新たな機能を持つ人工タンパク質や人工タンパク質複合体の設計など、次世代のバイオエネルギーシステムの開発に向けた意義ある進展をもたらすものと期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、「溶媒に対して分子モデルを採用する；タンパク質（及びそれらの複合体）を原子レベルで扱う；タンパク質-溶媒分子間の多体相関を考慮した独自の統計力学理論（分子性流体用積分方程式論と形態熱力学的アプローチの統合型方法論）を用いる；溶媒の並進配置エントロピーを新機軸とする」ことなどを特徴とし、タンパク質やそれらの複合体の立体構造安定性を解析したものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 水環境中におけるタンパク質立体構造形成のメカニズムを明らかにした。膨大な水のエントロピー利得をもたらす側鎖の密な充填が優先され、それを達成できるような α -ヘリックスや β -シートの含有率が選定される。その結果、 α -ヘリックスのみ、 β -シートのみ、あるいはその両者を種々の含有率で有する多様な天然構造が安定化される。

2. 木下らによって構築された、タンパク質立体構造に依存して変化する自由エネルギー関数を用いて、「天然構造と極めて多くの非天然構造の中から天然構造を射当てる（自由エネルギー関数に最低値を与える立体構造を選び出す）テスト」を合計133種類のタンパク質に対して実行し、世界最高の成績（ほぼ100%の的中率）を収めた。

3. 疎水環境中のタンパク質（膜タンパク質など）に適用可能な自由エネルギー関数を開発した。 β -シートよりもより効率良く分子内水素結合を形成できる α -ヘリックスが好んで選定され、水環境中におけるような立体構造の多様性は見られなくなる。膜タンパク質は α -ヘリックスを高い含有率で形成することが多いが、 α -ヘリックス同士の会合は脂質2重層膜の疎水鎖を構成する炭化水素基（ CH_2 , CH_3 , CH ）の並進移動に起因するエントロピー利得により駆動されることを示した。

4. 2. の自由エネルギー関数とそのエンタルピー及びエントロピー成分を用いて、実験情報に基づいて推定されたタンパク質天然構造モデルのキャラクター化を行う方法を提案した。本方法を用いることにより、モデルの特徴や弱点が明らかになり、より良いモデルを作成するための有用な指針が得られる。

5. タンパク質-タンパク質界面のホットスポット（2つのタンパク質の結合自由エネルギーを支配する少数のアミノ酸残基）の予測法を構築し、Bakerらが開発した最も有名な方法よりも優れていることを検証した。予測には、水のエントロピー効果が鍵になることを示した。

以上のように、出来る限り少ないNMR実験情報から優れた天然構造モデルを作成できる方法の開発、実験と理論の連携による膜タンパク質立体構造の決定、一般のレセプターとリガンドの結合力の制御などに繋がる多くの成果が得られている。本論文は、タンパク質やそれらの複合体の機能改変や新たな機能を持つ人工タンパク質や人工タンパク質複合体の設計などに大きく寄与し、次世代のバイオエネルギーシステムの開発の基礎を与える。

よって、本論文は博士（エネルギー科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成25年2月22日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降