

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	成 鉞 (Cheng Cheng)
論文題目	Theoretical investigation of protein functions related to electron and ion transports working in thermal fluctuation (イオンと電子が関わる生体分子機能におけるタンパク質熱ゆらぎの役割の理論的解明)		
(論文内容の要旨)			
タンパク質の分子機能では、反応中心の化学的な変化と相関してタンパク質の大きな構造変化が引き起こされる。特に、電子やイオンなどの荷電粒子の輸送を伴う機能では、静電環境を制御する内部水の再配置を伴うタンパク質構造変化が本質的に重要となる。本論文を構成する研究では、分子シミュレーションの手法を用いた理論的な解析により、反応中心での化学的変化、電子やイオンの輸送、及びタンパク質の大きな構造変化を含むタンパク質機能の分子機構を原子論的に解明した。研究では、非経験的量子化学計算による反応中心の電子状態と構造変化の高精度な記述と、長時間の古典分子動力学 (MD) シミュレーションによる大きく遅いタンパク質構造変化の記述の両方を考慮することが可能なハイブリッド法である QM/MM reweighting free energy-SCF (QM/MM RWFE-SCF 法) を用いることにより、顕著な分子機能に関わるマルチスケールな現象の統一的理解を得ることに成功した。具体的には以下の三つのテーマの研究が行われた。 1. ヒト細胞レチノール結合タンパク質 (hCRBP II) の色変異体の吸収波長制御分子機構の解明 hCRBP II タンパク質は、様々な点変異の導入により、発色団分子であるプロトン化レチナールシッフ塩基 (PRSB) の吸収波長を 200 nm の幅で変化させることが可能であることが実験的に示されている。特に、従来考えられている変異アミノ酸側鎖と発色団分子との静電相互作用の変化では理解が困難な色変異体も得られている。そこで、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて点変異導入に伴う発色団分子及びタンパク質の構造変化を正確に記述することにより、この顕著な吸収波長の分子機構を明らかにした。7 個の色変異体をモデリングし吸収波長を計算した結果、200 nm に渡る吸収波長シフトを精度よく再現することに成功した。更に、従来考えられている変異アミノ酸側鎖と発色団分子の静電相互作用の変化の他に、変異導入におけるタンパク質構造変化、及びそれに相関するタンパク質内水分子の再配置による静電相互作用の変化が吸収波長シフトに重要な寄与を与えていることを明らかにした。 2. チャネルロドプシン (ChR) 光活性化状態の構造モデリングとイオン透過分子機構の解明 ChR は PSRB を発色団分子として結合する膜タンパク質であり、光照射による PSRB の光異性化反応がトリガーとなるタンパク質構造変化によりイオンの細胞膜透過が行われる光感受性イオンチャネルであり、神経科学分野における光遺伝学で応用されている。光照射前の暗状態 (D₀ 状態) の X 線結晶構造は得られているものの、光活性化やイオン透過の分子機構は未だ不明である。そこで、光活性化初期状態 (P₁) やイオンチャネル開状態の前駆状態 (eP₂ 状態) に対して、QM/MM RWFE-SCF 法を用いた光活性化状態のモデリングを行った。その結果、eP₂ 状態において、これまで知られていた類縁のタンパク質とは大きく異なる構造変化を明らかにした。その構造変化は、分			

光学実験や低分解能回折実験、また変異体を用いた生化学実験も良く説明している。また、この新規なモデルにより、従来提唱されている矛盾を含むイオン透過経路とは異なる、実験と無矛盾な透過経路及びゲート制御機構が明らかになった。

3. シトクロム c の酸化還元電位の非経験的計算 シトクロム c は呼吸鎖に含まれる電子伝達経路で電子輸送を担う金属タンパク質であり、その酸化還元過程は生命機能に重要な役割を果たしている。一方、複雑なタンパク質分子の中で電子状態と静電環境を大きく変化させる酸化還元過程の分子論的な理解は困難であった。そこで、本研究では、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、シトクロム c の酸化還元電位を非経験的に計算し、その制御機構を解明した。シトクロムの酸化状態と還元状態の両者に対して自由エネルギー最適化構造を決定し、その間の電子状態のエネルギー差を補正法により精度よく求め、更にタンパク質の自由エネルギー差を MD 法を用いた自由エネルギー摂動法を用いて計算することにより、酸化還元電位を系に依存したパラメータを用いること無しに精度よく計算することに成功した。これは、他の複雑な金属タンパク質の酸化還元過程の計算への拡張が可能であることを意味している。また、アミノ酸分割解析により、酸化還元電位を制御しているアミノ酸の同定に成功した。

(論文審査の結果の要旨)

電子やイオンのような荷電粒子の移動に関わるタンパク質分子機能の理解のためには、大きく変化する局所的相互作用とタンパク質分子全体にわたる大域的な構造変化の相関を明らかにする必要がある。近年の分子シミュレーション研究の発展は、化学反応やタンパク質の構造変化のそれぞれに関する理解に大きく貢献しているが、その両者が強く相関したタンパク質分子機能の解明は困難であった。

本論文を構成する研究では、その困難を克服するハイブリッドシミュレーション法を駆使することにより、光受容体タンパク質変異体の吸収波長制御機構、光感受性イオンチャネルタンパク質の光活性化機構、及び電子伝達タンパク質の酸化還元過程の分子論的な解明に成功した。これらの解明は、複雑な電子状態変化と大域的なタンパク質構造変化を別々に扱う従来法では成し遂げられず、非常に顕著な成果である。その結果、反応中心の光異性化反応や酸化還元電位反応などの非常に複雑な化学反応によって引き起こされる機能性なタンパク質構造変化を原子論的に精度よく解析する道が開かれた。これにより、光合成タンパク質などの非常に複雑な複核金属錯体反応中心を有するような従来法では記述が非常に困難な系に対しても、タンパク質の構造変化や熱揺らぎを考慮した反応解析が可能になったことを示しており、理論化学や生物物理学分野に大きなインパクトを与えている。また、変異導入によるタンパク質の構造変化が機能に関わる反応中心に及ぼす効果が精度よく計算できることも示され、タンパク質工学や創薬における理論的分子デザインの道を拓くものと期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 31 年 1 月 18 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。