

(続紙 1)

京都大学	博士（理学）	氏名	堀 直人
論文題目	RNA—タンパク質複合体の粗視化分子モデル開発とそれを用いた翻訳伸長機構のシミュレーション研究		
（論文内容の要旨） RNA は遺伝情報の仲介物質としてだけでなく、タンパク質と複合体を形成することで細胞内で積極的に機能を果たしている。それら生体分子の機能発現機構を調べるには、分子シミュレーションが実験情報を補完するツールとして有用である。しかし、興味ある現象が大きな系（分子量数万～） また長時間（ミリ秒～） である場合、計算コストを抑えるための適切なモデル化が必要とされる。本研究では、RNA—タンパク質複合体のダイナミクスを分子シミュレーションを用いて理解することを目指し、粗視化モデルの開発およびリボソーム翻訳伸長機構への応用研究を行った。 粗視化モデルでは、核酸1ヌクレオチドをリン酸、糖、塩基部分に相当する3つの粗視化粒子で表現し、粒子間の相互作用を、天然構造が最安定となるようなポテンシャルでモデル化した。これはタンパク質の研究で広く用いられてきた構造依拠モデルの適用である。より精度の高いモデル化のために、Fluctuation matching 法で全原子力場の情報を取り入れながらパラメータを決定した。検証の結果、作成したモデルが天然構造周りでの揺らぎの大きさをよく再現していることを確認した。また、tRNA やリボソームの計算に適用したところ、いくつかの特徴的な動きのモードが再現され、大きさだけでなく揺らぎの方向性についても確認できた。また、核酸のシミュレーションでしばしば問題となる静電相互作用について、3つの異なる扱い方を比較検討し、リボソームのような巨大分子の場合、既存のDebye-Huckelモデルと構造依拠モデルの単純併用が不安定な挙動を招き、構造依拠モデルのみとした方が有効であると結論づけた。 開発した粗視化モデルを用いて、リボソームの翻訳伸長サイクルの一部、トランスロケーション機構の研究を行った。翻訳伸長サイクルにおいて、リボソームに結合したの2つのtRNA は、mRNAとともにちょうど1コドン分移動する。この移動を実現する際、リボソームの2つのサブユニットはラチェット式の回転運動を起こす。また、L1ストークの動きや、tRNA のハイブリッド状態形成が重要であると実験的に示唆されている。しかし、それら特徴的な運動がどのように共役しているかなど、機構の全体は不明である。2011年にCateのグループによって解かれた結晶構造は、サブユニットの回転状態が異なる2つの構造を含んでおり、本研究ではそれら2つの構造を用いてシミュレーションを行い、tRNA ハイブリッド状態の形成とリボソーム構造の関係性について調べた。結果として、PサイトtRNA がハイブリッド状態をとりやすいこと、サブユニット回転後の構造においてハイブリッド状態がより安定であることが分かった。実験的に関連が示唆されているA-site finger (ASF)についても、変異型リボソームでシミュレーションを行い、ASFがAサイトtRNA のハイブリッド状態形成を抑制していることが確認された。			

(論文審査の結果の要旨)

堀直人氏の学位論文は、RNA とタンパク質の複合体に対して利用できる粗視化分子モデルを構築し、それを適用してリボソームの翻訳伸長過程のうちトランスロケーションの前半部分の動態を解析したものである。

博士論文の第1章は、RNA とタンパク質の複合体についての粗視化分子モデルの構築に関する研究である。タンパク質はアミノ酸1個を1粒子で表現する粒度で、RNA はヌクレオチド1個を3粒子で表現する粒度で表し、タンパク質の粗視化モデルでよく用いられてきた構造依拠型のモデルを独自に RNA に拡張している。また、静電相互作用について、3種類の取扱いを提案し、比較している。次に、粗視化モデルに含まれる多くのパラメータを、fluctuation matching とよばれるマルチスケール技法により求めた。すなわち、16個の RNA 分子と、10個の RNA-タンパク質複合体をトレーニングセットとして、それぞれについて、標準的な全原子モデルによる分子動力学計算で求めたゆらぎと、堀氏が提案した粗視化モデルによる分子動力学計算で求めたゆらぎが一致するように粗視化モデルのパラメータを求めた。大部分のパラメータは、分子によらずほぼ一定の値を与えており、モデルの妥当性を示している。また、jackknife test によって、求めたパラメータがトレーニングに使われていない RNA や RNA-タンパク質複合体のゆらぎを再現できることを確かめている。さらに、求められたパラメータを用いて、tRNA の大きなゆらぎや、リボソームの機能的な運動を解析している。特に、RNA-タンパク質複合体一般に適用できる普遍的な粗視化モデルは、まだ報告されておらず、本研究のオリジナルな内容である。今後のさまざまな研究に利用できる方法が開発されたことは意義がある。トレーニングに用いた分子系が、(技術的にはやむを得ないことではあるが) X線結晶構造をもつものばかりであるため、求められたパラメータに偏りができる懸念はある。また、RNA-タンパク質複合体には強い静電相互作用が関与しており、カウンターイオンも含めた取り扱いが今後の鍵となるであろう。

博士論文の第2章は、第1章で開発した粗視化モデルを用いて、リボソームの翻訳伸長過程の中のトランスロケーションの前半部分を解析したものである。トランスロケーションでは、最初、A位とP位に結合している tRNA が、それぞれ P位と E位に移動する。その前半は A位と P位に結合している tRNA の 30S サブユニット側は動かないまま、50S サブユニット側が前方に傾倒して P位と E位に移動するハイブリッド状態をとることが、最近の実験によって示されている。さらにハイブリッド状態には1型と2型がある。堀氏の研究は、A位と P位に tRNA が結合している状態のリボソームからの時間発展と自由エネルギー解析の計算を行い、P位に結合している tRNA のハイブリッド (P/E) は、安定で、速く形成されるのに対して、A位に結合している tRNA は傾倒しにくくハイブリッド (A/P) を作りにくい、という結果を得た。これはハイブリッド2状態に対応する。最近の研究にも、ハイブリッド2状態のほうがハイブリッド状態1よりも安定であることを示唆する実験報告があり、それと合致する結果である。リボソームは、巨大分子系であり、そのシミュレーションは、たとえ粗視化モデルといえども挑戦的な課題である。静電相互作用の取り扱いなどに改良の余地はあるものの、ハイブリッド状態1、2の安定性、自由エネルギー面の解析は意義のある結果である。

以上のように、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25年1月16日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。