

|         |  |        |      |
|---------|--|--------|------|
| 氏名(本籍)  | はぎ わら よう すけ<br>萩原陽介(三重県)   |        |      |
| 学位の種類   | 博士(理学)   |        |      |
| 学位記番号   | 博甲第5263号   |        |      |
| 学位授与年月日 | 平成22年3月25日   |        |      |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当   |        |      |
| 審査研究科   | 数理物質科学研究科  |        |      |
| 学位論文題目  | <b>Theoretical studies of functional mechanisms of biological macromolecules</b><br>(生体高分子の機能発現機構の理論的研究) |        |      |
| 主査      | 筑波大学准教授  | 博士(理学) | 館野賢  |
| 副査      | 筑波大学教授   | 理学博士   | 白石賢二 |
| 副査      | 筑波大学教授   | Ph. D. | 山本泰彦 |
| 副査      | 筑波大学教授   | 理学博士   | 有光敏彦 |
| 副査      | 産業技術総合研究所研究チーム長  | 博士(理学) | 山崎和彦 |

### 論文の内容の要旨

本研究は、生体機能高分子の立体構造と電子構造とに基づき、重要な幾つかの生物機能が発現されるメカニズムを、原子解像度および原子構造レベルにおいて、計算科学的手法を用いて理論的に解明したものである。

生体内に多量に存在する金属カチオンである  $\text{Na}^+$  や  $\text{K}^+$  などは、芳香環を有するアミノ酸とカチオン- $\pi$  相互作用を形成し、その安定化エネルギーはアミノ酸同士のそれと比べて非常に大きい。しかしこれらは、低分子量の化合物において見出されてきた結合様式であり、実際の生体高分子立体構造の中で、金属カチオン- $\pi$  複合体の存在が明らかになった例は、従来、極めて少なかった。このため、その生物機能における役割については、これまでほとんど不明であった。

最近、松村(大阪大学)らが行った T1 リパーゼ(脂質分解作用を有する)に対する X 線結晶構造解析の結果、活性部位を構成するアミノ酸のひとつであるフェニルアラニン(Phe)の近傍に、球状の電子密度の存在することが明らかになった。松村らは、その電子密度が  $\text{Na}^+$  に相当するとし、Phe 側鎖と  $\text{Na}^+$  とのカチオン- $\pi$  相互作用の存在を提案した。しかし実験手法の限界から、その電子密度が水である可能性も排除しきれない。そこで本研究では、分子動力学(MD)計算により、その電子密度の実体が何であるかについて解析した。

この問題を解決するために、本研究では以下のような新たな計算スキームを開発した。芳香環近傍の空間をグリッドに分割し、原子核位置にその中心を有するガウス関数を用いて、各原子に与える(電子の)「密度関数」を定義する。これにより静電ポテンシャルを求め、全エネルギーを CCSD(T)法によるポテンシャル曲線に適合させる。このスキームを用いて、エネルギー関数を構成することにより、CCSD(T)法と同等の計算精度で、また計算コストは ff99 および ff02 とほぼ同じレベルにおいて、エネルギーを計算できることがわかった。この計算法を Grid-based Energy Representation (GER) 法と名付けた。

GER 法を用いた MD 計算(5 ns)では、 $\text{Na}^+$ -Phe 相互作用様式は安定に保持され、その活性部位の立体構

造は、実験構造を安定に再現した。これより、T1 リパーゼにおける  $\text{Na}^+$ -Phe 複合体の役割は、その非常に大きいエンタルピ利得によって、活性部位の立体構造の安定化に寄与することが明らかになった。一方、水 - Phe 結合を仮定した MD 計算では、実験構造を正確に再現しないことが明らかになった。これは、両者の安定化エネルギーが小さいことによるものである。したがって、X 線結晶構造解析で得られた、Phe 近傍の球状の電子密度は、水分子ではないことがわかった。このようにして、T1 リパーゼの活性部位における電子密度の実体が  $\text{Na}^+$  イオンであり、 $\text{Na}^+$ -Phe 結合によるタンパク質コア構造形成における役割が明らかになった。

本研究ではさらに、生体内触媒反応機構を解明するために、量子力学 (Quantum Mechanics; QM) に基づく *ab initio* 計算と、古典力学 (Molecular Mechanics; MM) に基づく MM 計算とを融合した、QM / MM ハイブリッド法による電子状態計算を行った。QM / MM 法は、巨大な分子系の中で、量子力学理論に基づいて取り扱う比較的小さな部分系 (QM) と、古典理論に基づいて取り扱う大きな部分系 (MM) とに分け、性質の異なるこれら 2 つの手法を統合した計算法である。本研究ではさらに、この QM / MM 法と MD 計算とを組み合わせることによって、QM / MM MD 計算を実現した。この計算法を、遺伝暗号の正確なデコード (decode) を担う重要なタンパク質である「アミノアシル tRNA 合成酵素」(aaRS) による酵素反応機構の解析に応用した。

20 種類のアミノ酸に対応する aaRS のうち、 $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  ロイシンを付加する酵素をロイシル tRNA 合成酵素 (LeuRS) と呼ぶ。LeuRS は、ロイシンおよびロイシン用 tRNA ( $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$ ) の双方を認識して両者を結合させる (ロイシル -  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  の生成。反応には他に ATP も必要)。しかし実際の生体においては、20 種類のアミノ酸の中に、ロイシンと似通った別のアミノ酸も存在する (イソロイシン、バリンなど)。そのため LeuRS は、そうした類似のアミノ酸を誤って  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  に結合させてしまう場合がある。そのため、LeuRS は自らの誤りを修正する校正機能 (エディティング) も有している。すなわち、LeuRS 内のエディティング・ドメインにおいて、 $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  に誤って結合したイソロイシン/バリンを、加水分解反応によって切り離すのである。この反応をエディティング反応とよぶ。

本研究では、エディティング反応において考え得る 4 つの反応スキームすべてについて、QM / MM MD 計算を実行し、LeuRS によるエディティング反応における反応経路を解析した。その結果、エネルギー障壁が最も低い最適な反応機構を見出した。この反応経路の特徴は、基質部位 ( $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  における 76 位のアデノシン A76 およびバリン) が有するリボースのヒドロキシル基 (3'-OH) が、求核剤 (溶媒水分子) を活性化する点にある。すなわちこれは、tRNA 自身が反応を駆動することを意味する。したがってこの反応は、誤ったアミノ酸が結合した  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  (バリル -  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$ ) が、触媒機能を有する RNA、すなわち“リボザイム”であることを意味する。

しかしながら、 $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  が単独で酵素反応のすべてを行うわけではない。反応の開始、つまり求核剤がカルボニル炭素に接近するためには、保存されたアミノ酸残基であるスレオニンが、求核剤の“通り道”を開く役割を果たしていることも明らかになった。すなわち、バリル -  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  によるリボザイム反応は、タンパク質の助けを借りてその活性を向上させているといえる。さらにこのリボザイム反応では、遷移状態のエネルギーを低下させるために、LeuRS のアミノ酸残基が関与していることもわかった。このように、LeuRS・バリル -  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  複合体によるエディティング反応は、リボザイムとタンパク質が共同で作用する“ハイブリッド触媒”によるものであることが明らかになった。

こうしたハイブリッド触媒の存在は、「生命の起源」や「遺伝暗号の起源」にも新たな考え方をもたらすものである。すなわち、「生命の起源」と考えられている RNA ワールドから、現在の RNP ワールドへの変遷を考えた場合、それらを担う原始の生体分子の機能構造や反応機構の間に、大きなギャップのあることが、従来からの深刻な問題であった。ハイブリッド触媒は、こうした理論におけるギャップを埋め、より連続的

かつ統合的な生命進化の理論体系を構築するために、不可欠の役割を果たすものと考えられる。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、生物物理学において極めて重要な生体高分子の生物機能発現機構について、分子の立体構造・電子構造の双方に立脚し、計算科学的手法を用いて理論的に解明したものである。解析手法における、これまでの限界を突破するための計算スキームの開発とその実装、およびそれらの応用までを遂行し、重要な生物機能のしくみを分子ダイナミクスのレベルにおいて詳細に明らかにした。T1 リパーゼの活性部位における $\pi$ 電子系と金属イオンとの相互作用について、古典理論による正確なポテンシャル場の記述法を初めて開発し、これを分子動力学計算に応用することによって、 $\pi$ -金属イオン相互作用の機能的役割を解明した。また、タンパク質生合成におけるアミノ酸配列の誤りを防ぐための、アミノアシル tRNA 合成酵素による酵素反応（エディティング反応）機構を、その活性サイトにおける分子構造および電子構造のダイナミクスに基づき、初めて明らかにした。これらはいずれも、生物物理学における長年の課題であり、本研究成果がそれらの分野に果たす貢献は極めて大きいと判断される。同時にこれらは、国際水準に照らしても極めて高いレベルの研究といえるものである。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。