【130】

氏　名（本籍）	姜（かん）　志　妗（じよん）（韓　国）
学位の種類	博　士（理　学）
学位記番号	博　甲　第　6005　号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 24 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	**Computational analyses of electronic structures in catalytic reactions of biological macromolecules** （生体高分子の触媒反応における電子構造の計算科学的解析）

主　査	筑波大学教授	理学博士	矢　花　一　浩
副　査	筑波大学教授	理学博士	青　木　慎　也
副　査	筑波大学准教授	博士（理学）	宮　崎　州　正
副　査	兵庫県立大学教授	博士（理学）	舘　野　　賢

論文の内容の要旨

本研究は、生物機能において重要な役割を果たしている生体高分子を対象に、計算科学的手法を用いてこれらの立体構造及び電子構造を正確に解析することより、生命機能メカニズムの一端を解明したものである。

生体高分子系を物理的に正確に解析するためには、対象となる生体高分子に加えて、その周囲を取り囲む溶媒水分子などを含めた、リアルな計算モデルを構築し、これを理論的に正確に解析することが必要である。このようなモデル全体に対して量子力学（Quantum Mechanics; QM）による第一原理計算を適用することは現実でないため、本研究では古典場におけるエネルギ関数（Molecular Mechanics; MM）と QM 計算とを組み合わせた、ハイブリッド QM/MM 計算法を適用した。

このハイブリッド QM/MM 計算では、電子構造計算を必要とする活性中心に対しては第一原理 QM 計算を適用し、それ以外の部分（活性中心以外の生体高分子部分と溶媒水分子など）には MM 計算を適用する。これにより、環境構造の効果を導入した、活性中心の立体構造・電子構造などを高精度に求めることができる。

本研究では、こうした理論計算解析技術を用いて、「セントラル・ドグマ」および「生体エネルギ変換」に関係する以下の 3 つ系を解析した。第 1 および第 2 の系は、生体エネルギ変換に寄与する重要なタンパク質であり、特に後者の系は、化学浸透圧理論において重要な役割を演ずるタンパク質である。第 3 の系は、細菌類（Eubacteria）においてそのセントラル・ドグマを担う重要因子であり、生体内のすべてのタンパク質自体の生合成に不可欠な因子といえる。しかしいずれの場合についても、それらの機能メカニズムの詳細は不明であった。用いられたハイブリッド QM/MM 計算システムは、著者が所属する研究室で近年開発されたものである。

第 1 の系であるアズリンは、光合成における電子移動機構に関与するタンパク質であり、現在までに多数の実験・理論研究がなされている。そのため、本研究で用いたハイブリッド QM/MM 計算システムのテスト計算にも適した系である。

同システムを適用して計算した結果、既存の QM/MM 計算システムを用いて再現できなかった幾何構造因

子に対しても、実験データをよく再現できる計算結果を得ることに初めて成功した。すなわちアズリンの活性部位においては、Cu-O の結合距離が実験値より著しく短くなるか、または長くなるのが、従来の計算システムを用いた結果であった。当該解析システムを用いた結果においては、そうした結合長についても、正確に実験データが再現することを実証した。

また本研究では、活性部位以外のタンパク質構造や溶媒などの環境構造を、活性部位の電子状態計算に含めて考慮することの可能な方法、すなわち、「アディティヴ・スキーム」(Additive Scheme) を用いることが、とりわけ分極しやすい (Polarizable) 原子の関わる結合距離、およびその電子構造を調べる目的には重要であることも明らかにした。

このようにして独自のハイブリッド QM/MM 計算システムは、その並列計算における高度な計算効率のみならず、その計算精度においても、既存の解析システムを超える計算が可能であることを示した。

そこで第 2 に、シトクロム酸化酵素 (CcO) の Cu_A サイトに対して、その電子構造の理論解析に先のシステムを適用した。シトクロム酸化酵素は、酸素分子を水分子に還元することによって、化学浸透圧理論に基づき、電子伝達系を駆動するタンパク質である。CcO の Cu_A サイトは、この生体反応に使われる電子を、シトクロム c (Cyt c) より受け取る役割を有する。

本研究では、Cu_A サイトにおける Met 残基の役割に注目した。この Met 残基の役割については、これまでに多数の実験が精力的になされてきていたが、以下のように研究グループにより矛盾した結論が導かれていた。これら実験で使用された生物種の Cu_A サイトの立体構造はどれも同じであったが、Met 残基を Leu に変換した変異体においては、その酸化還元電位が大きく変化している矛盾があったのである。これは、変異体とその活性測定の実験のみでは、Met 残基の真の機能的役割は理解できないことを意味している。

そこで本研究では、Met 残基のナイーブな役割を、ハイブリッド QM/MM 計算と、Cu_A サイトの変異体に対する立体構造モデリングとを組合せることにより、組織的に解析した。その結果 Met 残基は、Cu_A サイトの電子構造を大きく変えることはないが、特定の電子軌道、すなわち d_{zx} 軌道のエネルギのみを、選択的に上昇させること、Met 残基が Cu_A サイトの Inner-sphere Reorganization Energy に与える影響は大きくないことを明らかにした。

さらには、Met 残基の Leu 変異体に対する構造モデリングを組織的に実行した結果、CcO の新たな機能構造単位を見出した。すなわち、Cu_A サイトの近傍に存在し、同時に Cu_A サイトにコンタクトする Inserted Modular Structural Motif (IMSM) が明らかになったのである。同時にこの IMSM は、Met 残基の置換による影響を、その周囲のタンパク質構造に伝播させ得ることも、この構造モデリングによって明らかになった。これらの解析により、先に示した実験結果の矛盾は、Met 残基のナイーブな影響ではなく、生物種に依存して Cu_A サイトの近傍の IMSM の有無によって生じた結果であると考えられることが分かった。

これらの結果を元に本研究では、Cu_A サイトが「機能的な 2 重構造」を持つことをさらに提案した。すなわち、2 つの銅イオンと 2 つの Cys/His 残基とが配位結合によって形成する平面が、電子伝達機能の役割を形成する「基本構造 (platform)」を構成すると共に、他方で Met 残基は「調節因子 (fine-modulator)」として、その電子伝達機能を高精度に調節するという描像である。これにより、各々の生物種が持つそれぞれの環境に適応することが可能となり、最適の効率で酸素分子の還元反応を達成しているものと考えられる。

さらに本研究では第 3 の系として、セントラル・ドグマを直接担う酵素である glutamyl-$tRNA^{Gln}$ amidotransferase CAB (GatCAB) における、基質・輸送メカニズムを解析した。この酵素は、Glu-$tRNA^{Gln}$ を Gln-$tRNA^{Gln}$ に変換する反応を行うことによって、すべてのタンパク質の生合成における正確な「翻訳」を保証する重要なタンパク質のひとつである。

この酵素は次の 3 つの生体化学反応を行う。すなわち、1) アミノ酸 Gln 分子より、アンモニアを生成する反応、2) Glu-$tRNA^{Gln}$ をリン酸化することによって活性化する反応、3) リン酸化された Glu-$tRNA^{Gln}$ とア

ンモニア分子から、Gln-tRNA^{Gln}を生成する反応の3つである。ここで、2）と3）の反応は、~30Å以上離れた2つの活性中心サイトにおいて行われ、それらふたつの活性部位の間を、アンモニア分子が輸送される必要がある。ところが、その輸送機構は、これまでほとんど未知であった。

そこで本研究では、合計~1.1 μsに渡る分子動力学（MD）計算を行うことよって、以下に述べるアンモニア輸送機構を明らかにした。すなわち、従来提案されていた、ふたつの活性部位を結ぶトンネル構造（チャネル）は、MD計算の中で実際には入口が開かないことから、アンモニア分子が通らず機能しない。その代わりに、それとは異なる新たなチャネルを、GatCAB酵素分子内に見出した。本研究では、これら2つのチャネル（以前提案されたものと新たに発見したもの）に対し、それぞれのチャネルに存在する入口をアンモニア分子が通過するためのエネルギ障壁を自由エネルギ計算によって評価し、新たに見出したチャネルの入口の方が、アンモニア分子を~10^4倍も通過させやすいことを明らかにした。さらに、通過の際、Phe206とAla207の相互作用より、アンモニア分子が逆流することが禁じられていることも明らかにした。これは、タンパク質分子の内部で、アンモニアなどの物質を一定方向にのみ輸送すること可能とする、ユニークなメカニズムを示した最初の研究である。

審査の結果の要旨

以上のように本研究では、「生命におけるふたつの基本機能」を担う、3つの重要な系について、そのメカニズムの解析を行った。第1および第2の金属結合タンパク質の研究は、今後、生体系における電子伝達機構を解析するために基礎となる成果である。その際、実験的な精度に限界がある場合でも、高精度な電子構造計算を駆使することによって、その技術的困難を超えることが可能であることを示した。第3のGatCABの研究では、その反応機構の研究を進めるためには、古典場のMD計算による機能メカニズムの研究が不可欠であることを示した。すなわち、動的な立体構造変化によるダイナミクス（主として理論解析による）を追跡することの重要性を示しているのである。

本研究は、そうした生物機能メカニズムの本質を解明するための理論解析技術を確立し、その応用を飛躍的に展開するための基盤を構築したものであり、電子構造理論と分子ダイナミクスに基づく、新しい生命物理学を構築するための第一歩といえるものであり、高く評価することができる。

平成24年2月17日、数理物質科学研究科学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、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。