

# Computational analyses on conformational dynamics of two-component regulatory system and NADH:ubiquinone oxidoreductase (二成分制御系および NADH-ユビキノン酸化還元酵素における立体構造ダイナミクスの計算解析)

柴田 眞侑

タンパク質の機能機構を理解するためには、機能に関わる立体構造の動的変化を詳細に理解することが欠かせない。タンパク質の構造動態の研究に用いられてきた実験や計算は、それぞれの短所を補うため複数組み合わせられて用いられる場合が多いが、複合的解析は時間や労力の負荷が高い。そこで、構造動態の研究の初手として、単独で用いても、任意のタンパク質について機能に重要な構造動態の全容をアミノ酸残基の側鎖の挙動もとらえる分解能で探索できる手法が提案されることが期待される。タンパク質の動的な構造変化は、複数の立体構造配座と配座間の遷移の二つの側面に分解でき、これらはさらに物理化学的に相互作用するアミノ酸残基対の集合の変化としても捉えることができる。この視点に立脚すれば、動的に変化する立体構造で形成されるアミノ酸残基対の相互作用を予測すれば、立体構造動態を再現できると考えられる。タンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基間相互作用は、相同なアミノ酸配列の集団にダイレクト・カップリング解析(Direct Coupling Analysis: DCA)を適用し予測できることが知られている。DCA は配列集団中のアミノ酸残基対におけるアミノ酸種の直接相関を見出す解析手法で、直接相関が強い残基対は立体構造で接触する残基対とよく照合することが報告されている。強い直接相関は、タンパク質の機能と構造を保持するという進化的制約がアミノ酸配列に加えられたために生じると考えられ、共進化とも表現される。DCA を用いてタンパク質の構造動態を理解しようとする試みは、現在までも行われてきた。準安定な構造配座の解明における DCA の有用性は、すでに多くの成功例により報告されている。一方、準安定な構造配座間の遷移について、現状では DCA により予測される情報は断片的であり、連続的な遷移過程の再構成は実現できていない。本論文では、相同なアミノ酸配列の集団から DCA により特定される共進化するアミノ酸残基対を用いて、タンパク質の構造動態の二つの側面の解明が可能であるかをそれぞれ確認・検証し、機能に重要な動的な構造変化の全容が相同なアミノ酸配列の集団に含まれているかを調べた。以上の研究背景と論文の概観が、第一章の内容である。

第二章では、先行研究での DCA の適用手法に則し、二成分制御系ではたらく DNA 結合性のレスポンスレギュレーター (DNA-binding Response Regulator: DBRR) の新規単量体構造を明らかにした。DBRR は一般に二つのドメインで構成されるシグナル伝達タンパク質で、その単純なドメイン構成のために構造配座が少ないと考え、研究対象として選択された。DBRR では、N 末端側ドメインがシグナルを受容すると、DBRR 分子全体が活性化し、C 末端側ドメインが

DNA に結合する。両末端側ドメインは、ドメイン間の残基間相互作用により機能的に連携すると考えられる。実際、そのような相互作用の一部は既知であるが、ドメイン間の残基間相互作用は網羅的に解析されておらず、新規の立体構造配座が存在する可能性が残る。本章では、DBRR の N 末端側ドメインと C 末端側ドメインとの共進化を解析し、ドメイン間連携を実現するような新規のドメイン間残基接触を探索した。DCA により見出されたドメイン間の共進化する残基対の一部は、分子動力学シミュレーションおよび立体構造評価解析の結果、新規の不活性型の単量体構造を形成するものと示された。

第三章では、NADH-ユビキノ酸化還元酵素（別称 呼吸鎖複合体 I; Respiratory Complex I: RCI）の構造の変化を担う残基間相互作用の経路を明らかにした。RCI は、膜タンパク質複合体で、酸化還元反応と連携したプロトンのくみ出しにより、好気呼吸における ATP 合成のためのプロトン濃度勾配を形成する。RCI は、その生物学的・医学的重要性から解析対象として選択された。酸化還元反応の触媒下において、RCI の基質キノン(Quinone: Q)が結合すると、ND6 サブユニットの 3 番目のヘリックス (ND6:H3) の構造が変化することが立体構造解析で示唆されているが、この分子機構は不明である。本研究では、Q 結合により生じた構造変化が残基間相互作用の連鎖により ND6:H3 へ伝搬され、ND6:H3 の構造変化を引き起こすと考え、そのような残基間相互作用の経路を、共進化する残基間接触のネットワークを辿ることで調べた。この新規の手法による解析の結果、ND1 と ND6 サブユニットのアミノ酸残基 9-11 個が共進化する残基間接触によりつながった経路を見出した。これらの経路の確からしさは、アミノ酸種の直接相関データおよびヒトの非同義一塩基置換データにより支持された。

第四章では、本論文の成果をまとめ、展望を示した。本論文では、相同なアミノ酸配列の集団に DCA を適用し、立体構造動態を構成する a) 準安定構造（第二章）と b) 準安定構造間の連続的な遷移過程（第三章）を見出すことに成功した。後者は、本論文が初の成功報告となる。上述の結果は、機能に重要な立体構造動態が、アミノ酸残基間接触の形に分解されてアミノ酸配列集団に記述されていることを示す。本論文の成果は、立体構造動態の解明において DCA に基づいた解析が有用となる範囲に構造遷移過程を拡張することで、未知の構造動態を研究する際に最初に行う解析として DCA に基づく構造動態解析を提案するものである。このような DCA の構造動態研究への適用は、個々のタンパク質の構造動態研究の効率化を促進し、より多くのタンパク質の機能と機能機構の解明を可能にすると期待される。蓄積された構造動態の知見は、変異の影響評価・予測やより効率的な薬剤設計など、生物学的・医学的に重要な課題の解決を援助するであろう。