

博士論文審査報告書

論 文 題 目

生体分子機械の誘電アロステリーと
水和水の物理特性

**Dielectric allostery of biomolecular machine
and physical property of hydration water**

申 請 者

佐藤	昂人
Takato	SATO

物理学及応用物理学専攻 理論生物物理学研究

2018年2月

生物を原子・分子のレベルから物理的に理解するためには生体高分子の基本的な物性の理解が欠かせない。生体高分子の中で、タンパク質は生物のあらゆる機能において中心的な役割を担っている。分子 1 個のレベルで高度な機能を発揮するものもあり、それらは「分子機械」と呼ぶにふさわしい。タンパク質分子でできた分子機械は大きさが数ナノメートル程度と小さく、また構造も複雑なため、その動作機構の解明は容易ではなく、これまで結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡、1 分子計測、蛍光共鳴エネルギー移動法、高速原子間力顕微鏡、計算機シミュレーション等の手法によって静的および動的構造の解析が進められてきた。分子機械の動作機構解明の鍵を握るのは、1 個の分子の中で空間的に離れた部位間でみられるカップリング機構と分子間相互作用である。前者のカップリングは一般に「アロステリー」と呼ばれ、この特性により、タンパク質は入力部と出力部をもつ「分子素子」として機能し、高度に組織化された分子間相互作用ネットワークを形成することが可能になる。後者については、生体分子の間は水で満たされているため、タンパク質表面付近の水（水和水）の物理物性の理解も重要になってくる。

このような背景のもと、申請者は分子動力学（MD）シミュレーションを用い、筋収縮を駆動する分子機械であるアクトミオシンの動作機構の解明に取り組んできた。アクトミオシンはミオシンとアクチンの 2 種類のタンパク質の相互作用によって駆動される分子機械で、ATP（アデノシン三リン酸）から供給される自由エネルギーが駆動力となってミオシン分子の内部状態とミオシン-アクチン間の分子間相互作用が変化し、その過程で一方向に力が発生する。よく知られた力発生機構はミオシンのレバーアーム部位の構造変化を想定した機械的なモデルだが、ブラウン運動とラチェット機構による力発生機構も 1 分子計測と MD 計算で示されている。いずれの力発生機構においても、アクチンに強く結合したミオシンをアクチンから解離させる（すなわち平衡状態から引き離す）ことが重要で、これが ATP によってなされる。そこで、申請者は、約 10 万個の原子からなるミオシン-水系の MD 計算を行い、ATP 結合によって誘起されるミオシン分子の応答を長時間にわたって追跡した。得られた膨大なデータの解析から「誘電アロステリー」と名付けた新規アロステリック機構を見出し、これがアクトミオシンの力発生機構に関与していることを示した。さらに、申請者は分子間相互作用における静電相互作用の寄与を調べるため、ミオシンおよび疎水性粒子表面の水和水の物理特性を解析し、表面付近では水の誘電率が低下し、静電引力が強まることを示した。本博士論文はこれら一連の研究成果をまとめたものである。

第一章は序論であり、分子機械の概説からはじまり、分子機械における入力と出力のカップリング機構とそこに関与するアロステリー、アロステリー-研究の流れと最近の新展開、ミオシンの力発生機構、特に機械論的なタイト・カップリング機構とブラウニアン・ラチェット機構に代表されるルース・

カップリング機構の対比、そして、タンパク質分子の誘電的性質とアロステリーの関連性、最後に分子間相互作用における水和水の物理特性について述べ、本論文で登場するキーワードと基本概念が解説されている。

第二章では研究手法が述べられている。はじめにミオシン-水系（ATP結合系とATP非結合系）のMD計算のための系構築法と計算条件が明記され、また、水和水の解析のためのモデル系（Weeks-Chandler-Andersen型ポテンシャルを用いた疎水粒子系）の系構築法と計算条件が述べられている。つぎに、解析手法が述べられている。特に、Poisson-Boltzmann方程式による静電ポテンシャルの算出方法、約1万個のスナップショット構造から分子内部の誘電応答を抽出するための方法、およびATP結合による応答と単なる熱ノイズとを見分ける（偽陽性応答を除外する）ための工夫が述べられている。また、本来はマクロな物理量である誘電率を局所的に用いるための理論的枠組み（Onsager、Kirkwood、Fröhlichらが発展させた誘電体の統計力学理論）が見通しよく示されている（補遺において式の導出も丁寧になされている）。

第三章ではATP結合によるミオシン分子の応答を解析した結果が示され、本博士論文の中核をなす。まず、申請者はATP結合領域から約30 Å遠方にあるアクチン結合領域に着目した。解析の結果、従来の研究で示唆されていたアクチン結合領域にあるドメイン間の機械的な（剛体的な）内部運動が検出された。しかし、さらに顕著な応答を示したのは、これまで着目されていなかったドメイン内部の応答であった。この応答は誘電応答的なもので、ATP（リン酸部）の高密度負電荷部位がミオシン分子内の荷電アミノ酸間の静電結合の連鎖的な組み替えを誘起し、それが遠方のアクチン結合領域に到達して表面の静電ポテンシャルを変化させ、さらに表面の正電荷に富んだ可動ループ領域（アクチンと静電的に相互作用する）に顕著な変位をもたらす、というものであった。申請者によるこの発見は、従来の機械的なドメイン運動のみを想定したアクチン解離機構に修正をせまるものである。申請者らはここで見出された誘電応答にもとづく新規のアロステリーを「誘電アロステリー」と名付け、今後のタンパク質分子の物性研究に新たな視点を提供している。これを自ら実践すべく、申請者はこの誘電アロステリーがアクチン結合部位だけでなく、レバーアーム部位にも生じていることを示した。従来はATP加水分解反応とタイトにカップルしてレバーアーム部位が構造変化する（そして力を発生する）と考えられてきたが、カップリングは本質的にルースであることを申請者の結果は示しており、アクトミオシンの力発生機構を理解する上で重要な視点を提示している。

第四章では水和水の物理特性の解析結果が示されている。タンパク質表面の不均一性と水和水の不均一性を切り分けるため、まず表面が均一な球状疎水粒子を用いてMD計算と解析を行っている。その結果、表面の水和水はバルクの水に比べて圧縮率が高く、誘電率が低いことが分かった。水和水の水素結合解析結果から、これらの水和水の特性が疎水粒子を取り囲むように

形成される水和水の水素結合ネットワークに起因することが示されている。表面の水和水の水素結合ネットワークは不完全で動的であり、これが圧縮率の上昇と誘電率の低下（ともに水和水の揺らぎの増大に起因）に反映されている。この結果をふまえ、申請者はミオシン周囲の水和水についても同様の解析を行い、そこでも同じ結果（圧縮率の上昇と誘電率の低下）が見られること示した。誘電率の低下は静電相互作用の強化を意味するので特に重要である。そこで、申請者はこれを実証するため、アンブレラ・サンプリング法を用いて疎水表面における異符号電荷間の相互作用自由エネルギー計算を行い、バルク水中に比べ、疎水表面で静電相互作用が強化されることを示した。

第五章では前の二つの章での結果をふまえて総合考察がなされている。まず、本論文で示した誘電アロステリーがアクトミオシンの力発生機構のどこで用いられているかを明示し、アクトミオシンが複数の力発生機構を併用している可能性を静電相互作用を軸に考察している。さらに、機能がまったく異なる他の分子機械にも誘電アロステリーが関わっていることをいくつかの具体例をあげて言及している。最後に、誘電アロステリーはタンパク質分子の内部自由度があってはじめて実現される性質であることから、分子機械のルース・カップリング機構との関連性にも言及している。

以上のように申請者はミオシン-水系の大規模な MD 計算とデータ解析によって誘電アロステリーというタンパク質分子の新たな特性を見出し、それがアクトミオシンの力発生機構に深く関与していること示した。誘電アロステリーはアクトミオシンに限定されるものではなく、他の分子機械にも見られる普遍性をもつと考えられる。また、生体分子表面の水和水の誘電率低下を明らかにし、分子間相互作用における誘電アロステリーの有効性も示した。これらの結果は、生体高分子の基礎物性の解明に貢献しただけなく、実際にそれが分子機械の機能に寄与していることを強く示唆するものであり、生物物理の基礎研究として高く評価できる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文に値するものと認める。

2018 年 2 月

審査員	(主査)	早稲田大学教授	博士(学術)(東京大学)	高野光則
		早稲田大学教授	理学博士(東京大学)	上田太郎
		早稲田大学教授	理学博士(早稲田大学)	安田賢二
		早稲田大学教授	博士(理学)(名古屋大学)	由良 敬