

論文の内容の要旨

Molecular dynamics simulations of eukaryotic membrane channel and transporter

(真核生物由来膜チャネル・膜輸送体の
分子動力学シミュレーションによる解析)

武本 瑞貴

細胞は脂質二重膜に囲まれて外界から隔離されているため、膜を挟んだ物質の輸送、膜輸送は細胞の生育にとって重要である。膜輸送はチャネルまたはトランスポータと呼ばれる膜タンパク質のグループによって担われており、その輸送の方向や必要とするエネルギー源に応じて幾つかの種類に分けられる。各々のグループの膜タンパク質が最低限満たさなければいけない条件を考えることによって、これらのグループ内に共通するメカニズムを考えることが出来る。この共通メカニズムを明らかにすることが、チャネルやトランスポータを理解する上で重要である。そのためには、静的な構造である結晶構造のみならず、タンパク質の動的な性質を考える必要がある。分子動力学 (MD) シミュレーションはこのような問題を考える上で最適な手法である。しかしながら同時に、通常的全原子 MD シミュレーションはコンピュータの計算能力の問題で、長い時間スケールで起こる生理学的な現象を観察することが困難であるという問題を孕んでいる。この問題は拡張サンプリングの方法を取り入れることで解決することが出来る。本論文では、通常 MD シミュレーションや拡張サンプリングの方法を取り入れた MD シミュレーションを利用することで、チャネル及びトランスポータの分子メカニズムを、原子分解能で明らかにすることを試みている。1章では、上記の一般的な膜輸送とその共通するメカニズム、および分子動力学法の概要についてまとめている。

2章では、channelrhodopsin (ChR) についての MD シミュレーションを行っている。ChR は青色光によって開閉が制御されるカチオンチャネルであり、現在では特定のニューロンを特異的に興奮させることの出来るツールとして、神経科学分野で広く用いられている。近年、クラミドモナス由来 ChR1 と ChR2 のキメラコンストラクト (C1C2) の結晶構造が得られ、ChR の分子メカニズムについての構造基盤が明らかになりつつあるものの、その詳細な動作機構については未だ不明な点が多い。本論文では、電気生理学的な解析と全原子 MD シミュレーションを行うことで、C1C2 結晶構造において観察されたイオン透過経路上の細胞内側と中央にある、2箇所狭窄部位に位置するプロトン化されていたグルタミン酸の重要性について調べた。電気生理学的解析によって、それぞれ細胞内側・中央狭窄部位に位置する2つのグルタミン酸残基、Glu122 と Glu129 が光サイクルの間に脱プロトン化しなければならないことが明らかになった。全原子 MD シミュレーションから、Glu129 が基底状態で脱プロトン化してしまうとイオンの漏出を引き起こしてしまうことが明らかになり、Glu129 は基底状態ではプロトン化されている必要があることを明らかにした。さらに筆者は、13-*cis* レチナル結合型の活性化された状態の C1C2 をモデリングして MD シミュレーションを行うことによって、

光サイクルの初期段階でどのような構造変化が起こるのかを調べた。このシミュレーションから、レチナールの異性化がチャンネルの開口に必要な TM6, TM7, TM2 の動きを誘導するメカニズムが明らかになった。これらの知見は基底状態と光サイクルの初期段階における ChR のダイナミクスについての理解を高めてくれるだろう。

3章では, triose-phosphate/phosphate translocator (TPT) についての MD シミュレーションについて述べている。二次能動性輸送体は基質の濃度勾配に逆らった輸送を行うが、そのために他の化学種の電気化学ポテンシャルを利用し、大きな構造変化を起こすことで輸送を行っている。トランスポータについて様々な研究がなされてきたものの、局所的な構造変化と大域的な構造変化がどのように共役しているのか、などをはじめとする輸送メカニズムの原子分解能での解明には至っていない。本論文では、植物の葉緑体膜上に存在するアンチポータである TPT について MD シミュレーションを行っている。TPT は葉緑体膜上でストロマ内のトリオースリン酸と細胞質の無機リン酸 (P_i) を、厳密に 1:1 で交換するアンチポータである。本研究ではストリング法やアンブレラサンプリングをはじめとする、バイアスサンプリングの手法を用いることで、基質の結合・解離も含めた内向き開状態-外向き開状態の間の構造変化パスを MD シミュレーションのみから再構築することに成功した。得られた TPT の全体の構造変化パスについての自由エネルギー地形から、膜輸送体の基本的な性質である alternating access 機構や基質の結合・解離についての詳細なメカニズムが明らかになった。トランジェクトリの解析から、 P_i はトランスポータ内腔に並んでいる塩基性残基によって次々と“リレー”されて輸送されることが観察された。さらに、基質結合ポケット内に存在する保存された Glu207 残基が“分子スイッチ”として機能し、局所的な基質の結合と大域的な構造変化を関連付ける役割を持っていることを明らかにした。これらの定量的かつ原子分解能での考察は、二次能動性輸送体のエネルギー共役メカニズムを理解する上で重要な基盤になるだろう。