

氏名	杉山 歩
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第860号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Docking Dynamics and Electronic Structure of Metalloprotein Complexes (金属含有蛋白質複合体のドッキングダイナミクスと電子状態)
論文審査委員(主査)	長尾 秀実(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副主査)	西川 清(自然科学研究科・教授), 斎藤 峯雄(自然科学研究科・教授), 小田 竜樹(自然科学研究科・助教授), 遠藤 一央(自然科学研究科・教授)

### 要約

In this thesis, the author presents computational simulation results about the blue copper protein's dynamics and electronic structures. Part II contains a three discussions about the blue copper protein azurin. One is electronic structure of the active site of azurin in slovent water environment. Next, Resonance Raman(RR) spectrum of the active of azurin are estimated. This spectrum are estimated from the correlation function between Cu - coordinated atom bistance. Hydration water behavior are also analyzed in part II. The author estimated the diffusibility of the hydration water molecules in each temperature. Part III consists of methodology and the result of docking dynamics simulation. The author has carried out the MD simulation of azurin - cytochrome  $c_{551}$  complexes.

### 本文

本学位論文は計算機シミュレーションによる銅含有金属蛋白質アズリンとヘム鉄蛋白質シトクロム  $c_{551}$  のドッキングダイナミクスと電子状態に対する研究の成果をまとめたものである。アズリンは電子伝達の機能を持つ銅一核の金属タンパク質として、バクテリア内に存在し、シトクロム  $c$  からシトクロム  $c$  酸化酵素への電子伝達の媒介的役割を担っている。また、その構造は 128 残基から構成され、機能中心となる反応活性部位は中心となる銅イオンと五つの配位残基からなっている。銅イオンは His46、Cys112、His117 と強い配位結合を持ち、また Gly45 及び Met121 と弱い結合を持つことから、活性部位はひずんだ三方両錐形となっている。アズリンに関する研究はこれまでも実験、理論の両面から様々な研究が行われ、X線構造解析からは多くのタイプの構造が明らかとされてきた。本論文ではその中でも *Pseudomonas aeruginosa* 由来の酸化型アズリンの構造をもとに溶媒中で分子動力学(MD)シミュレーションを行い、溶媒中での構造と性質に対するより詳細な考察をまとめたものである。該当研究で拙者は活性部位付近の分子振動及び主鎖のダイナミクスに関する研究を進め、MDシミュレーションから計算したスペクトルと実験の共鳴ラマン(Resonance-Raman)スペクトルの比較、溶液中でのアズリンの反応活性部位の安定構造の解析などアズリンの構造、機能性に関する総合的理解を試みた。これらの研究から、溶媒中のタンパク質はタンパク質のゆらぎや残基ジャンプ運動と呼ばれる原子同士の協調的運動などが確認出来た。またこのMDシミュレーションでの活性部位付近の平均構造に対し密度汎関数計算を行うことで、電子状態に関する考察を行った。

一方、電子伝達パートナーとなるタンパク質とのドッキング状態のダイナミクスに関する研究は電子伝達機構解明の足がかりとなる研究であり興味深い。近年、アズリン-シトクロム  $c_{551}$  間の電子伝達モデルによる実験が行なわれ、その電子伝達機能に関する報告されている。この実験結果を基にアズリン-シトクロム  $c_{551}$  間のドッキングモデルが提唱された。アズリンのドッキングパートナーとなるシトクロム  $c_{551}$  は 82 残基によって構成されるヘム鉄タンパク質であり、アズリン同様 *Pseudomonas aeruginosa* 由来のX線構造解析による構造が報告されている。本論文ではこのアズリン-シトクロム  $c_{551}$  間のドッキング状態を構築し、

MD シミュレーションを実行する事で、タンパク質のダイナミクスがドッキングに与える影響に対する考察をまとめた。

本学位論文はアズリンの単体系でのシミュレーション結果によるパートとアズリンとシトクロム  $C_{551}$  との複合体でのシミュレーション結果によるパートに大別できる。以下にそれぞれパートからの主な研究成果について簡易に説明をする。

### Part I

#### アズリンの MD シミュレーション

アズリンに対する 3ns 間の MD シミュレーションにより多くの残基において複数の安定した配置があることが分かった。特に活性部位付近の残基では Met121 がジャンプ運動により二つの安定構造を行きかう様子が確認された。平衡化初期段階の構造は X 線構造解析の構造と近い構造 (Low type(LT)) であったが、直ぐにジャンプ運動によって変化した構造 (High type(HT)) となる。それぞれの構造での平均滞在時間は約 224ps(LT)、及び約 526ps(HT)、また総滞在時間は約 0.9ns(LT)、及び約 2.1ns(HT) であった。

#### 電子状態計算

アズリンの MD シミュレーションによって見出された活性部位付近の二つの安定配置での平均構造から構築した 2 つのクラスタモデル (LT 及び HT) に対して密度汎関数計算を行った。この結果、SOMO の解析から両モデル共、銅イオンの  $3d_{x^2-y^2}$  に対し N イオン (His46, His117) が的に配位し、S イオン (Cys112) がダ的に配位している。さらに HT では Met121 からの配位が強く見られる。また、スピン密度分布は二つのモデルでは大きな違いは現れず、それぞれ Cu に約 51%、S (Cys112) に約 40% を占める結果となった。

#### RR スペクトル

酸化型、還元型の両アズリンの活性部位原子間の相関関数から理論的に RR スペクトルを見積った。実験系の RR スペクトルとの比較が可能となったのみならず、実験的に観測が困難なスペクトルピークの予測、酸化型と還元型のスペクトルの比較も行った。

#### アズリン周辺の水和水のダイナミクス

3 つの異なる温度に対し、アズリンの MD シミュレーションを行い、蛋白質周辺の水和水分子のダイナミクスの比較を行った。各々の温度において蛋白質表面にトラップされた水分子の存在が確認された。また、各々の条件での水分子とアズリンの水素結合の比較、第一水和層と第二水和層と水分子のダイナミクスの比較を行った。

### Part II

#### 蛋白質複合体のドッキングダイナミクス

アズリン - シトクロム  $C_{551}$  複合体の MD シミュレーションから両タンパク質間及びそのの活性部位間の距離は減少し、自発的にドッキング状態を選択する過程が確認された。2ns 経過後のタンパク質間の結合自由エネルギーは -92.64kcal/mol 程度であった。また、動的相関関 (Dynamic Cross Correlation Map(DCCM)) よりドッキングに関与する残基間に正の相関が発生する事が確認された。シトクロム  $C_{551}$  単独のシミュレーション結果からの DCCM との比較からタンパク質全体が正の相関へ変化する事がわかった。

## 学位論文審査結果の要旨

当該学位論文に関して、各審査員が個別に検討し面接調査を行った後、論文内容を詳細に検討した。その後平成19年2月9日に行われた口頭発表の後に審査委員会を開き、協議の結果以下のように判定した。

本論文は分子動力学シミュレーションにより銅タンパク質アズリンと鉄タンパク質シトクロム  $c_{551}$  のドッキング構造およびそのダイナミクスと電子状態に関する研究を行っている。これらのタンパク質間では電子伝達が行われ実験的にもドッキング構造や生理機能解明が進められている。銅タンパク質アズリンに関して活性部位付近の残基のジャンプ運動を見だし、ジャンプ運動に伴う構造変化による酸化還元電位差を見だしている。またタンパク質周りの水分子ダイナミクスの解析から、タンパク質特定部位との水素結合により特定部位に位置する水分子の構造緩和が長いという結論も得ている。タンパク質ドッキングにより構造およびダイナミクス変化に伴う活性部位間距離の縮小やタンパク質振動相関変化を見だし、ドッキングによる大きなダイナミクス変化を見だしている。以上の研究結果はタンパク質ドッキングとダイナミクス、すなわちタンパク質間相互作用の理解および今後の実験研究に多くの寄与をもたらすものである。以上により、この論文は博士（理学）に値するものと判定した。