2PA053

DEEを利用した蛋白質変異設計プログラム shrike
○守川壮一¹、中井孝尚¹、中村春木²
(¹鐘淵化学工業(株)、大阪大学蛋白質研究所²)

天然蛋白質の主鎖高次構造(フレームワーク)をそのまま利用し、変異蛋白質を設計する手法は、蛋白質の熱安定性や酵素活性などの改良に活用されている。われわれはそういった手法の一つとして、dead end elimination(DEE)アルゴリズム⁽¹⁾を利用した計算手法を考案し、立体構造が既知の蛋白質について多点突然変異の設計を支援させるプログラム shrikeを開発した。ここでは、蛋白質構造を真空中での AMBER 分子力場ポテンシャルに溶媒とエネルギー項⁽²⁾を加えた力場ポテンシャルを用いて取り扱う。変異蛋白質の熱安定性を比較するためには、溶液中で unfolded 状態から native 状態へ移行するときの自由エネルギー差分値 $\Delta\Delta G$ を算出する必要がある。しかしながら、ここでは主に側鎖間のパッキングを考えており、変性状態での側鎖間相互作用を無視できるとみなし、荒い近似として、native 状態の構造エネルギー値のみの比較を行った。個々の変異蛋白質構造の算出は2ステップより行なう。まず、変異させたアミノ酸側鎖構造だけでなく、側鎖構造が影響を受ける周辺の側鎖構造を算出する必要がある。そのために、主鎖原子座標を固定した状態で、変異させたアミノ酸側鎖およびその側鎖から8 Å以内に存在する側鎖について、側鎖ロータマー・ライブラリを用いた DEE アルゴリズムを利用し、最低構造エネルギー値をあたえる側鎖ロータマーの組み合わせと原子座標を算出する。得られた立体構造には原子間の vdW 反発が残っているため、次に、主鎖原子に位置束縛を与えた条件で、蛋白質全原子のエネルギー最小化計算を行ない、その変異蛋白質の native 状態での安定構造とみなす。これらの計算をアミノ酸変異の組み合わせごとに行ない、それらの構造エネルギー値を用いて変異蛋白質の安定性の順位付けを行なう。発表では、計算結果と変異蛋白質の熱安定性実験データとの比較を含め、この設計手法の妥当性を議論したい。

(^{*1}) I.Lasters, M. DeMaeyer, et.al. *Protein Engineering* (1995) 8, 815
(^{*2}) P.F.W. Stouten, C. Sander, et.al. *Mol. Simulation* (1993) 10, 97

Souichi Morikawa, Takahisa Nakai, Haruki Nakamura :
The program Shrike by using the DEE algorithm to design the mutation of proteins

2PA055

構造比較に基づくアライメントを利用した立体構造予測法の設計
○富井健太郎、藤博幸(生物分子工学研究所)

蛋白質の立体構造予測法あるいは遠縁蛋白質の検出法として、様々な fold recognition 法が開発されてきている。しかし、コンテスト(CASP3)の結果から、現在の fold recognition 法は、アライメントの精度や、類縁蛋白質間以外での類似構造検出能力に問題があるとされている。

本研究では、これら二つの要請を満たすような fold recognition 法構築のため、類似構造を持つ非類縁蛋白質ペアの複数組の構造比較の結果を予測/検出結果の「正解」のデータセットとし、これを再現するようなパラメータセットの探索を試みた。具体的には、「正解」のデータセットとして、double dynamic programming による自動的な構造比較に基づくアライメントの結果を用いた。パラメータセットは、データベース検索を行う際の簡便性から dynamic programming の使用を想定し、立体構造上の各残基位置での「環境」に対する20種類のアミノ酸のスコアおよびギャップペナルティーという形式で設定した。「環境」については、自動的な構造比較のアライメントの結果を最も良く反映する様な分類を行った。

幾つかの例について、他手法と比較しながら、本手法の予測/検出結果を報告する予定である。

K. Tomii, H. Toh : Design of a fold recognition method by utilizing the alignments based on structural comparison.

2PA054

単分子解析を二次元結晶に応用することによるNa⁺/K⁺-ATPaseの投影像の改良
○大嶋篤典、光岡薫、平井照久、藤吉好則、+田原義和、+林雄太郎(京大・理・生物物理、+杏林大・医)

Na⁺/K⁺-ATPaseは細胞膜に存在し、Na⁺を細胞外に、K⁺細胞内に輸送するP-type ATPaseである。イヌ腎臓から単離した膜結合型Na⁺/K⁺-ATPaseは膜を酸性条件下におくと、膜が二重に重なったところに二次元結晶を作る。この結晶は格子欠陥を含み、結晶学的手法での平均化が困難であった。そこで分子一つ一つを分類したり、一つの分子の回転角および平行移動も考慮して平均化できる単分子解析を本結晶に応用して平均化を試みた。

解析に用いた氷包埋された非染色試料の像はコントラストが弱く、15個程度の分子を平均したフィルター像を用いて画像分類を行った。その結果、除外されるべき像の不均一な領域が結晶中にランダムに分布することが確認された。それらを除外し、更に回転と平行移動で分子位置を調整した後、オリジナルの像から単分子に対応する領域を切り出して投影像を得た。分子の配置は2回対称性を持っており、分解能は13 Åと判断された。12枚の画像から4938個の分子が平均化に用いられた。

投影像には5つのピークが見られ、以前2つのピークしかなかった像よりも分解能が大きく改善され、このことから本結晶のように欠陥の多いものに対して単分子解析を適用することが有効であることがわかった。この投影像はNa⁺/K⁺-ATPaseのプロトマーに相当すると考えられるが、分解能が13 Åであることや大きな細胞質ドメインを持つことから、投影像上でサブユニットの対応づけや膜貫通部位の特定は難しい。より高分解能の三次元構造の解析が待たれる。それには傾斜した像を解析するためのプログラム開発が必要である。そうすれば単分子解析が欠陥の多い二次元結晶から三次元構造を求めるための有力な手段の一つになりうると考えられる。

A.Oshima, K.Mitsuoka, Y.Fujiyoshi, T.Hirai, Y.Tahara, Y.Hayashi :
Improvement of the Na⁺/K⁺-ATPase projection map by the single particle analysis of two dimensional crystals

2PA056

NMRと分子シミュレーションから生体高分子の立体構造とダイナミックスを決定するための新たな方法
○北尾彰朗、Gerhard Wagner(京大・院理、Harvard・医)

分子シミュレーションは、生体高分子の比較的速い動きを高解像度で観察するためには大変優れた方法である。しかし、生体高分子のゆらぎの時間のスケールはフェムト(10⁻¹⁵)秒から秒のオーダー以上までの広範囲におよぶ。これに対して分子シミュレーションのカバーする時間領域は極めてかぎられたもの(フェムト秒からマイクロ秒)である。一方、様々な実験からは、ひろい時間領域での生体高分子のふるまいが観測される。しかし、空間的な解像度は必ずしも十分でない。

そこで我々は、早い動き(<10ピコ秒)を分子シミュレーションから、遅い動きを実験から決定する方法を開発した。そのベースとなるのは、蛋白質にはエネルギー的に準安定な状態、いわゆる Conformational Substates (CS) が多数あり、それらの間のジャンプが起こっているという事実である。つまり、蛋白質のダイナミックスは、CS内での比較的速いゆらぎとCS間のジャンプという2つの運動から構成されていると考えることができる(Jumping-Among-Minima (JAM) モデル)。このモデルに基づき、それぞれのCS内でのゆらぎは分子シミュレーションからもとめ、各CSの統計重率を実験データを再現するようにもとめる方法を開発した。この方法で決定すべきパラメータの数はCSの数と同じであるので、少数のCS間のジャンプが重要であるようなタンパク質では決定すべきパラメータの数が少なくてすむというメリットがある。この理論は様々な実験データの解析に用いることができる。

我々はこの方法を更にNMRのデータ解析に用いた。免疫系における分子認識に重要な働きをするタンパク質CD2の立体構造とダイナミックスをNMRの構造情報と緩和データを用いて解析した。この結果、CD2にはごく少数のCSしか存在しない事、その中でも主に2つのCSが重要である事が示された。また、これらのCS間の遷移は、Counter Receptor であるCD58との結合に伴う構造変化と深く関係していることが明らかになった。

A. Kitao, G. Wagner : A Novel Method to Refine Structure and Dynamics of Biomolecules.