3PA029

分子表面残基と水分子との相互作用が立体構造の安定化に果たす役割

○船橋順¹、高野和文¹、山縣ゆり子²、油谷克英¹
(¹阪大・蛋白研、²阪大院・薬)

生体物質は多くの場合水に溶けており、水中で立体構造を形成し機能を有する。近年多くの蛋白質の立体構造解析が蓄積され、蛋白質を取り囲んでいる水と水が蛋白質のダイナミクスに大きな影響を及ぼすことが明らかにされてきたものの、蛋白質が折れ畳まれ機能する場である水との相互作用に関して不明確な点が多い。本研究では蛋白質分子表面残基の水和が立体構造の安定化にどのような役割を果たしているかを明らかにするために、モデル蛋白質としてヒトリゾチームを用い、分子表面残基を置換した変異型を用い、残基と分子表面付近の水分子との関係を調べた。

本研究ではヒトリゾチームの異なった二次構造上にある3箇所の分子表面の部位 [Val2 (β-sheet), Val74 (loop), Val110 (α-helix)] に注目し、それぞれの部位で親水性残基置換変異型 (Val→Ser, Asp, Asn, Arg) を作製し、熱測定から変性の熱力学的パラメーターを求め、100K によるX線結晶構造解析により、変異型の構造変化と分子表面の水との相互作用を直接観察した。我々は最近、これら3箇所の部位で一連の疎水性変異型 (Val→Gly, Ala, Leu, Ile, Met, Phe) を作製し、それらの熱力学的パラメータと構造を決定した。それらの構造を観察することにより、置換によって置換部位周辺の水和構造に変化が生じることや、疎水性表面上に水和クラスターが形成している可能性があることがわかってきた。さらに、置換による安定性の変化は部位によって異なっていた。それらの結果は、各々の部位での水和構造の変化が安定性に影響を与えている可能性を示唆している。本発表では、これら疎水性置換変異型を中心に、親水性置換変異型の結果を加えることにより、表面残基と水和構造との相互作用が安定性にどのように寄与しているかについて議論したい。

Jun Funahashi, Kazufumi Takano, Yuriko Yamagata, and Katsuhide Yutani : The Effect of Interactions between Amino Acid Residues on the Surface and Water Molecules on Protein Stability.

3PA030

分子内部の親水性残基がヒトリゾチームの立体構造・安定性に果たす役割

○高野和文¹、船橋順¹、山縣ゆり子²、油谷克英¹
(¹阪大蛋白研、²阪大院薬)

蛋白質の立体構造安定化に果たすアミノ酸残基の役割を明らかにするために、我々はヒトリゾチームをモデル蛋白質として選び、その系統的な変異型の熱測定と構造解析を行っている。今回は、分子内部の親水性残基の役割を調べるために、分子内部での置換である2種の変異体、L8T と A32S を作製した。これらの変異型の安定性を DSC (DASM4) を用いた熱測定により、結晶構造をX線解析により決定した。

構造解析の結果、L8T と A32S の置換側鎖の OH 基は共に新たな水素結合を形成していた。これは、我々がこれまでに解析した分子内部での疎水性残基→親水性残基の変異型 (I56T, I59S, I59T, I59Y) の側鎖の OH 基が、いずれの場合も新たな水素結合を形成していた結果と一致している。これらの結果は、蛋白質分子内部にあるポリペプチド主鎖の N、O 原子や親水性残基側鎖の親水基が、ほとんどの場合水素結合を形成していることを支持している。このことは、分子内部の親水基は水素結合の形成が必須であるか、分子内部には水素結合可能な親水基が遍在していることを意味している。これらの水素結合は蛋白質安定化に寄与していると考えられているが、分子内部の水酸基の安定性への寄与については、これまでのところ明らかではない。L8T と A32S の安定性 (ΔG) は、それぞれ 1.4、15.6 kJ/mol 野生型に比べ低下していた。これらの結果、及び、他の変異型ヒトリゾチームの安定性・構造解析の結果を含めて、発表では、親水基の安定化への寄与を定量的に抽出し、安定性・立体構造に果たす分子内部の親水性残基の役割を議論する。

K. Takano, J. Funahashi, Y. Yamagata, & K. Yutani: Role of Buried Polar Residues in the Structure and Stability of Human Lysozyme

3PA031

酵素活性部位への静電的効果 - 生化学反応における環境としての比誘電率について -
千葉大・薬 ○藤井 康之、畑 晶之、星野 忠次、津田 穆

【目的】タンパク質の持つ静電的性質はその機能、基質や配位子との親和性及び反応活性等、性質を規定する上で重要な役割を有する。特に活性部位への静電的効果は酵素の反応機構を解明する事において重要である。然し、静電的相互作用は遠隔的にも働く為、活性部位に対する静電的効果は活性中心以外のアミノ酸の構成とその存在位置及び溶媒 (主に水分子) との接触の度合等、不確定な要素に依存する。その為に決定は容易では無い。そこで我々は理論及び構造生物学的知見から自発的に起こる事が明らかにされた Class A β-lactamase における酸-塩基間プロトンリレー反応の反応始源系と反応生成系のポテンシャルエネルギー差を溶媒と反応場モデルを利用した ab initio 分子軌道法により求め、活性中心が受ける静電的効果用最適切に再現し得る活性中心以外のアミノ酸及び溶媒の連続体近似としての比誘電率 ε を決定した。

【方法】Class A β-lactamase により β-lactam 系抗生物質が加水分解された直後のモデルを元に、基質が酵素から完全に脱離した後の状態の系を構築し、反応モデル系とした。この反応モデルを構成する活性アミノ酸残基は、Glu166、Lys73、Ser70、Ser130 である。まず解析する反応の遷移状態を求め、振動解析を行ない、虚の振動数が唯一であることを確認した。さらに得られた振動の順方向及び逆方向に沿う固有反応座標計算を行ない、最低最短のエネルギー経路を決定した。計算方法としては Hartree-Fock 法 (HF 法) 及び密度汎関数法 (DFT 法) を使用し、基底関数は 6-31G**を用いた。又、溶媒との反応場モデルとしては Onsager のモデルを採用し、活性中心以外のアミノ酸及び溶媒を連続体近似 (比誘電率 ε で表す) とした。

【結果・考察】この酸-塩基間プロトンリレー反応は Class A β-lactamase が基質を加水分解した後、resting state に戻るために発生する。この反応では Glu166Oε に結合している水素原子 Hwa が Lys73Nζ の lone pair に捕獲され、Glu166Oε と Hwa との距離が増大するにつれて Lys73Nζ と Hwa との相互作用が強まり、結合が形成する。この反応について HF 法を用い、気相中条件 (ε=0) で計算したところ、反応始源系と反応生成系のポテンシャルエネルギーの差は 20.0kcal/mol であった。NMR により解明された Class A β-lactamase の resting state では、Lys73 はプロトン化され正に帯電している状態にある事が分かっている。しかし上記の結果からでは、resting state の方がエネルギー的に不利である。従って上記計算条件では、活性中心の環境を再現し得ないと判断出来る。さらに ε=20、ε=78.3 として計算を行なったところ、ポテンシャルエネルギー差はそれぞれ 8.29、1.06kcal/mol となり、大幅な改善がみられた。さらに DFT 法を用い、同様に ε=20、ε=78.3 として計算を行なったところ、7.83kcal/mol、1.19kcal/mol であった。また、得られたエネルギー差から各条件下における始源系と生成系の存在確率及び反応の平衡定数を得た。結果は当日報告する。

Y.Fujii,M.Hata,T.Hoshino,M.Tsuda : Electrostatic effect to the activesite of enzyme.

3PA032

動的および二次元赤外分光法による力学摂動下における絹フィブロインの動的構造変化に関する研究
園山正史(東京農工大・工)、中野辰彦(日本バイオラッド)

生体中に多量に存在する繊維タンパク質は、生体の支持、結合、防御、運動などの機能を担っており、その機能発現の仕組みを理解するためには、物性、とりわけ力学特性と構造の関係を明らかにすることは重要である。動的赤外分光法では外部摂動を受けている系のスペクトルを in-situ 測定することが可能であり、力学摂動を受けている高分子における局所的な動的構造変化に関する情報を得ることできる。さらに、動的赤外スペクトルの二次元への展開により、高分子の力学特性と局所的構造の関係についての詳細な知見を得られる可能性が示唆されていることから、近年非常に注目されている(1)。そこで私たちは、構造・物性が広く研究されている家蚕絹フィブロインを対象として、フィルム状試料における力学特性と構造の相関の解明を目的とした研究を動的赤外分光法により行っている。家蚕絹フィブロインでは、試料の調整条件に依存して、ヘリックスおよび disorder 構造に富むシルクⅠ、または逆平行βシート構造に富むシルクⅡという、主として2つの異なる構造形態をとることが知られている。本研究では、前者を延伸することにより後者へ構造が変化していくことを利用し、延伸によるフィブロインの構造変化、力学特性の変化と構造の関係を、時間分解測定を含めた赤外分光法により検討した。

赤外透過スペクトルの測定に用いる数ミクロンの極薄フィルムは、既報に従いマユの可溶化水溶液を作成後、シャーレ上にキャストすることにより得られた。動的赤外スペクトルの測定にはバイオラッド社FTS-6000を用いた。

タンパク質の二次構造に敏感なアミドⅠ領域(1700-1620 cm⁻¹)の解析から、その含有率が低い試料においても、βシート構造において力学的な摂動に対する大きな動的構造変化が誘起されていることが明らかになった。このことは、βシート構造がフィブロイン分子全体の力学特性に大きく寄与している可能性を示唆している。これまでにほぼ中赤外領域全体をカバーする広い波数領域(4000-800 cm⁻¹)にわたって動的赤外スペクトルの測定に成功しており、さらに詳細な解析を現在進めている。

(1) M.Sonoyama, Recent Research Developments in Applied Spectroscopy, in press.
M. Sonoyama, T. Nakano: Dynamic and Two-Dimensional Correlation Infrared Spectroscopic Studies on Structures and Mechanical Properties of Silk Fibroin.