3PA069

トランスフェリン金属間協同性結合過程に及ぼすpH及びトリス濃度の影響に関する研究
○辻内 裕¹、長谷川拓郎²、斎藤真紀子²、富永香織² (1 秋田大・工学資源・材料工、2 秋田大・教育・数理情報)

溶液中において種々の金属イオンを可逆的に結合するトランスフェリン(Tf)は血液中などに存在するイオン輸送性蛋白質で、その可逆的な結合反応には水素イオンや種々のアニオンなどが影響する。Tf分子には2個の金属結合サイトがあり、その一方に金属イオンが結合すると他方の空きのサイトに金属イオンが結合する速度には金属イオン種間に差異がみられる。例えば鉄では正の協同性を示すが銅では協同性がみられないことなどが知られている。この協同性の分子機構の詳細は未だに解かれていない。我々は、Tf蛋白質を取巻く水以外の溶質分子に着目してこの協同的挙動を解析している。今回Tf金属結合実験を、正の協同性の鉄と協同性のない銅との比較において、また、溶液中の溶媒分子の組成比及びpHの種々の組み合わせにおいて行った。実験条件としては、金属結合過程を促進する補助的イオンとしてシュウ酸イオンをTf分子数比100倍濃度で用い、溶質成分としては金属イオンと結合しないトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを用い、高濃度のトリス濃度のpH調整にはリン酸を用いた。pHは生理的条件pH7.5を中心として6.5~8.5の範囲に設定した。

その結果、銅の場合、pH7.0~7.5の間の一つのpH(pHcとおく)でTf-Cu結合のトリス濃度依存性がTf比200倍付近でほぼ明瞭に反転することが明らかになった。すなわち、pHc<pHでは高濃度トリス条件のほうが低濃度条件よりより多く結合し、pH<pHcではその逆の過程が起きた。Tf-Feの場合も大局的にほぼ同様な反転が起きたが、反転が起きるpH点は銅と異なりアルカリ側にずれpH7.5~8.0の間にあり、トリス濃度依存性の反転現象は銅ほど明瞭にはならないがある一定の規則に従って起きていることが分かった。

Yutaka Tsujiuchi, Takuro Hasegawa, Makiko Saito, and Kaori Tominaga
The influence of pH and buffer solute on cooperative metal-binding properties of transferrin in the aqueous solution.

3PA071

格子モデルを用いたタンパク質 folding における kinetic partitioning と energy landscape の研究
○中村寛則、笹井理生(名大院 人間情報)

近年、フォールディングのメカニズムを理解するためにエネルギーランドスケープの特徴を記述する研究が発展してきた。ミリ秒以下の時間でフォールドするタンパク質のエネルギーランドスケープがおおよそファンネルであるという記述は、多くの実験データを矛盾なく説明した。しかし、単純なファンネル型では、その折れたたみの説明が困難なタンパク質もある。例えば、 β -lactoglobulin では、中間状態がネイティブ構造と大きく異なる。plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)は、中間状態においてのみ活性を持つ。hen lysozyme は、ネイティブ構造で形成されるよりも多くの α ヘリックスが中間状態で形成されている。

本研究では、シンプルなモデルを用いて、より複雑なタンパク質の折れたたみのシナリオを模索する。また、中間状態を巨視的なエネルギーランドスケープの形状から理解していく。実際には、あるコンパクトな構造の周りで構造空間を制限した二次元格子上で動く16残基の HP モデルを用いた。このモデルでは、多くのトラジェクトリーの統計を、長い時間スケールで見ることができる。そのため、システムが熱力学的定常状態としての平衡状態に達するまでの様子を統計的に観察できる。モンテカルロシミュレーションの結果は、overshoot 現象や、fast phase と slow phase の存在を示し、hen lysozyme 等の実験から観測されるデータと類似していることがわかった。モデルをより詳細に分析した結果、これらの現象は、平衡状態に向かう途中の時間において、ある構造が他の構造より kinetic な理由で優位に選ばれるために生じる(kinetic partitioning)。実験と比較し、検証することを目的として、この現象の温度依存性等をより系統的にシミュレーションする。また、フォールディングメカニズムを定量的に理解していくために、本来多次元のエネルギーランドスケープをより定量的に少数のパラメーターで記述する指標を探索する。

H. K. Nakamura, M. Sasai: Lattice-model study on the energy landscape and the kinetic partitioning of protein folding process

3PA070

安定化したヤギ α -ラクトアルブミン変異体の解析
○堀井克紀¹、依田隆夫²、津本浩平¹、斎藤 稔³、松島正明^{4,5}、桑島邦博²、熊谷 泉¹
¹東北大・院工、²東大・院理、³弘前大・理工、⁴創技研、⁵現山之内製薬

分子進化と構造安定性の比較からヤギ α -L Aの分子内疎水性領域(Bヘリックス)にある Thr29、Ala30、Thr33 に変異を導入し、モルテングロビュール状態の形成を考察することで、分子内部の疎水性残基がモルテングロビュール状態の安定性に重要であることが報告されている(Uchiyama *et.al.*, *Protein Eng.* 11, 1153 (1995))。我々はそれらの中で近年 Thr29Ile 変異体が、天然状態において野生型よりも 3kcal/mol 程度安定化していることを見い出した。そこで、分子内部の疎水性残基の安定化の寄与と構造との相関について深い知見を得るために、ヤギ α -L Aの Thr29 を疎水性残基 (Val, Ile) に置換した変異体が大腸菌高発現系を用いて作製し、円二色性を用いた安定性の解析と、X線結晶構造解析を行った。さらに、蛋白質の安定性は、変性 (D) 状態と天然 (N) 状態との自由エネルギー差によって決まることから、D 状態として 29 位周辺の 6 残基を切り取ったペプチドの Extend 構造を仮定し、D,N 両状態についてそれぞれ分子動力学法に基づく自由エネルギー計算を行った。

前回、円二色性を用いて塩酸グアニジンによる変性過程を測定し、その転移曲線を解析した結果、Thr29Val, Thr29Ile は野生型よりそれぞれ 1.7, 3.2 kcal/mol 安定化すること、X線結晶構造解析から、29 位周辺のみに局所的な構造の違いがみられることを報告した。また、分子動力学法を用いて Thr29Ile, Thr29Val を平衡化した後の定常状態での RMSF(Root Mean Square Fluctuation)はX線結晶構造解析から得られる温度因子とよく一致していた。今回、さらに分子動力学法に基づいた自由エネルギー振動計算を行い 29Ile $\rightarrow$ Val, 29Val $\rightarrow$ Thr の変異に対する $\Delta\Delta G$ を求めた。 $\Delta\Delta G$ の計算値は実験値と近い値になり、これらの成分分析を行った結果、Thr29 $\rightarrow$ Val では、D,N 両状態において自由エネルギーは増加するがN状態における自由エネルギーの増加の方が小さいため、Thr29Valの方が安定化することが明らかになった。N状態における自由エネルギーの増加が小さい原因については、年会で詳しく報告する。一方、Thr29Val $\rightarrow$ Ile は主にN状態で安定化し、その主な成分はファンデルワールス相互作用であることが明らかになった。

K. Horii, T. Yoda, K. Tsumoto, M. Saito, M. Matsushima, K. Kuwajima, I. Kumagai:
Analysis of stabilized recombinant goat α -lactalbumin mutants

3PA072

格子模型によるマルチドメイン蛋白質のフォールディングシミュレーション
○宮下博之、笹井理生(名大・人情)

分子量の大きな蛋白質は、ドメインと呼ばれる複数の領域を持っている。蛋白質内では、これらのドメインが互いに相互作用しており、情報やエネルギーの伝達が行われていると考えられる。本研究では、複数のドメインを持つ蛋白質の情報伝達のメカニズムを明らかにすることを目的とし、計算機シミュレーションを行った。このような分子量の大きい系のシミュレーションを行う場合、分子動力学法などで用いられるようなリアルなモデル系を構築するよりも、蛋白質の性質をよく反映した、より簡単なモデルを用いる方が、蛋白質の持つ必要な情報を拾うことができると思われる。そこで今回は、Miyazawa-Jernigan 相互作用をエネルギーパラメータとした、27個の格子点を持つ3次元格子模型を用いてモンテカルロシミュレーションを行った。まず、適当な単一のドメインのみでフォールド可能な構造と対応する配列を設計し、モンテカルロシミュレーションを行い、ドメインの情報をピックアップした。このようにして作られたドメインを連結した複数のドメインを持つ蛋白質のシミュレーションを行い、連結する前と後の各ドメインにおける構造ゆらぎの変化及び folding 過程を考察する。

H. Miyashita, M. Sasai: Folding simulation of the lattice model of multi-domain protein