3A1445

1 分子計測でみた蛍光標識チトクロム c における形態間遷移

○和沢 鉄一¹、西田 智幸²、石井 由晴¹、後藤 祐児³、柳田 敏雄^{1,2,4} (¹ 科技振・1 分子過程プロジェクト、² 阪大・基礎工、³ 阪大・蛋白研、⁴ 阪大・医・第1生理)

テトラメチルローダミンで Cys107 を蛍光修飾したコウボチトクロム c 単分子の蛍光を観察すると、酸性条件下では塩強度に応じて蛍光強度の揺らぎが変化することを昨年の年会で報告した (3PA017, 1999 年)。今回、このような蛍光強度の揺らぎが蛋白質のどの状態に起因するかを検討した。

多分子系の実験から、酸性下でこの蛍光修飾蛋白質の蛍光強度は低塩強度 ($I \leq 0.03M$) では高く、高塩強度 ($I \geq 0.4 M$) では低いことがわかっている。これは、ヘム/蛍光色素間に蛍光エネルギー移動が起こっていて、変性/モルテングロビュール (MG) 状態に応じてエネルギー移動効率が変化しているためである。一定量の蛍光標識蛋白質分子を石英ガラス基板上に載せて全反射蛍光顕微鏡下で観察した場合、顕微鏡の視野内で蛍光発光が観察される蛋白質分子の密度は低塩強度から高塩強度になるにしたがって減少した。また、この変化は可逆であった。中塩強度 ($I = 0.1 - 0.4 M$) においては、蛍光発光/消滅を繰り返す蛋白質分子が多く観察された。これらの結果は、蛍光の発光状態、消滅状態がそれぞれ変性状態、MG 状態に対応し、中塩強度における蛍光の点滅は双方向への状態遷移を反映していることを示唆している。実際、1 分子系の実験による発光状態→蛍光消滅状態/消滅状態→発光状態の遷移速度定数はそれぞれ 2 sec^{-1} 、 0.6 sec^{-1} (20 mM Glycine, 0.4 M NaCl, pH = 2.5) となったが、これらの値は多分子系から得られたチトクロム c の変性/ MG 状態間の遷移速度に近い。このように、平衡状態にある蛋白質のコンフォメーション遷移を直接観察できるようになってきた。また、この方法をさらに精密化すれば、緩和法などでも計測が困難な状態遷移の観測や、分子過程における新たな中間状態の検出も将来的には可能になると期待される。

T.Wazawa, T.Nishida, Y.Ishii, Y.Goto and T.Yanagida : Transition in cytochrome c conformation observed by single-molecule fluorometry

3A1515

ファントム鎖モデルとレプリカ交換法を用いたタンパク質立体構造探索の高速化

○福西 広晃¹、渡辺 修²、高田 彰二² (¹ 神戸大・院自然・化学、² 神戸大・理・化学)

膨大なゲノム配列についてタンパク質の立体構造を決定するためには、計算機シミュレーションによる構造予測に期待されるところが大きい。我々は、より高速な分子動力学計算を行うため、1 つのアミノ酸を 4 つの原子で表した粗視化モデルを用いているが、フォールディングにかかる 1 ミリ秒以上の計算を行うには、まだ時間がかかりすぎる。そこで本研究では、さらなる高速化に向けて、ファントム鎖とレプリカ交換法を導入する。

1) ファントム鎖モデル

ファントム鎖は、本来非常に近い原子間距離で無限大になるエネルギー関数について、それを有限のエネルギーとすることで原子の重なりを許すモデルである。よって、原子が重なるという障害を受けることなく速い構造サンプリングが可能になる。

2) レプリカ交換法

レプリカ交換法は、複数の温度一定での分子動力学計算を同時に実行し、ある頻度でモンテカルロ法を用いて温度の交換を行うことにより、統計的に確かな拡張アンサンブルを得ることができる。また、複数の分子動力学計算において並列計算を行うことも容易である。この計算手法によって、より広い構造空間でのサンプリングが可能になる。

3) ファントム鎖レプリカ交換法

さらに今回、複数の Fantom 鎖を用いたレプリカ交換法も開発している。温度以上に強力な原子が重なるというエネルギーの効果は、高速な構造探索においてもより強力なものであり、画期的な手法である考えられる。この結果についても報告したい。

H.Fukunishi,O.Watanabe,S.Takada : Speeding up protein conformational exploration by phantom chain model and replica exchange method

3A1500

Tsallis 統計レプリカ交換法でのタンパク質折れ畳み

○伊藤 正勝、岡本 祐幸 (分子研)

序 タンパク質のポテンシャル面の複雑な構造は立体構造予測を困難にしている。ペプチド鎖が一次、二次、三次、... といった階層的な構造を形成することを反映して、ポテンシャル面もまた様々なスケールの構造を持つ。そこで、準安定構造に捉えられずに配座空間を広く探索するためには、ランダムサンプリングにも様々なスケールの揺らぎを持たせる必要があると思われる。

Tsallis 統計はべき則的な長く尾を引く分布を与えるので、こうしたサンプリングを行うのに都合が良い。

方法 レプリカ交換法のアルゴリズムは、通常の Boltzmann-Gibbs 統計を用いた場合と同じであるが、Tsallis 統計集団を発生させるための重み関数は、

$$w_{GE}(E, \beta, q) = (1 - (1 - q)\beta E)^{\frac{1}{1-q}} \quad (1)$$

のように、温度の他に Tsallis のエントロピー指標 q にも依存する。従って、それぞれのレプリカは異なる温度と q の値を持つ。

結果・議論 ポテンシャル関数として ECEPP/2 を使い、エンケファリンについてシミュレーションを行った。詳細釣合を満たすように配座を交換することで、それぞれのレプリカに最安定構造だけでなく高エネルギー領域までの広い配座空間をサンプルさせることができた。しかし、モンテカルロ法と同様にエントロピー指標 q の選び方によって効率が大きく変わるため、温度、 q 分布の最適化法を開発中。

M.Ito and Y.Okamoto : Replica-exchange method using Tsallis statistics for protein folding

3A1530

拡張 scaled particle theory を用いた Avian pancreatic polypeptide の水和自由エネルギーの温度依存性の計算

大和 可奈、○入佐 正幸 (九工大・情報工)

【序】 カロリメトリーの実験から、蛋白質の熱変性の際の熱容量変化のほとんどは疎水性水和に起因するものであることが知られている。溶液理論の 1 つである拡張 scaled particle theory (XSPT) は統計力学に基づく理論であり、溶質分子を溶媒の中に入れる溶解過程の熱力学量を計算することができる。広く用いられている溶質の露出表面積を用いる経験的手法に比べて、XSPT は必要なパラメーターが少なく分子動力学で用いられているパラメーターをそのまま使用することができる。温度等を変化させた計算の際に、実験によってパラメーターの再決定を行う必要はない。今回 XSPT を用いて蛋白質の水和自由エネルギーの温度依存性を計算し、あわせて熱変性での熱容量変化への水和の寄与を計算した。

【方法】 今回の研究では溶質に Avian pancreatic polypeptide (PPT)、溶媒に水を用い、希薄溶液の条件で計算した。溶質である PPT は重原子 301 個からなる 36 残基の蛋白質である。計算に用いた PPT の天然構造は、X 線結晶解析による構造 (1PPT) である。非天然状態については、PPT のモデル構造を計算機上で作成し水和自由エネルギーを計算した。非天然状態の構造としては、最ものびた構造と β strand 構造の 2 通りの構造を試した。

【結果および考察】 水和自由エネルギーそのものの成分比較では、疎水相互作用と親水相互作用からの寄与がほぼ同じであるが、温度依存性では疎水相互作用の寄与が天然状態、非天然状態ともに支配的であった。計算された熱変性の際の熱容量変化量は一般の蛋白質での実験値と同じオーダーの値となった。また、蛋白質の chain entropy を簡単なモデルで見積もると、低温変性の存在が計算により再現された。

K.Yamato and M.Irisa : Temperature dependency of the hydration free energy of Avian pancreatic polypeptide by using the extended scaled particle theory.