1P053

β -ストランド構造を形成するアミノ酸残基の配列特異性に基づく蛋白質構造の分子設計

○小副川 博也¹、金光 和保²、大内 将吉^{1,2} (¹ 九工大院・生命体工、² 九工大・情報工)

我々はプロテインデータバンク中の漸増する蛋白質立体構造データを網羅的・統計的に解析し、蛋白質の分子設計に活用してきた。とくに、蛋白質構造の基本構造である二次構造に着目し、そこに含まれるアミノ酸残基の配列上の特異性を詳細に解析してきた。これまでにヘリックス構造の解析から、ヘリックス構造のN末端、およびC末端領域、すなわちヘリックス境界領域に存在するアミノ酸残基の位置特異的な偏りを明らかにし、この特異性を基にして、種々のヘリックスモデルペプチドを作成しそれらのコンホメーション解析を行ってきた。さらに、蛋白質工学へ応用し、構造安定化された変異酵素の作成に活用してきた。本研究では、蛋白質構造のもう一つの基本構造である β -ストランド構造に着目し、ヘリックス構造の解析と同様の手法で詳細に解析した。その結果、ストランド構造では全領域に β 分岐や芳香環を持つアミノ酸残基が存在した。また、極性側鎖、非極性側鎖にかかわらず、よりかさ高い側鎖が多く存在することも明らかとなった。アミノ酸残基の配列上の特異性に関しては、さきの α -ヘリックス構造と同様に、 β -ストランド構造のにおいても境界領域にプロリン残基が多く存在したものの、存在位置を構造内部と外部で厳密に帰属した場合、興味ある知見が得られた。 β -ストランド構造におけるアミノ酸残基の位置特異性を活用することで、蛋白質の二次構造予測や、 β -ストランド構造安定化のための分子設計が可能になると考える。

H. Osoegawa, K. Konko, and S. Ohuchi : Design of protein structure based on statistical analysis of amino acid sequence specificity in beta-strand structure

1P055

タンパク質の de novo デザイナー 3 helix bundle の場合－(II) 構造物性の実験的検証

○神原 大¹、金 文珍¹、高田 彰二^{1,2}、田村 厚夫^{1,2} (¹ 神戸大院・自然、² 科技団・さきがけ 2 1)

Protein G-related albumin-binding domain (PDB code; 1prb) は、three helix bundle のトポロジーを持つアミノ酸残基数 47 の小型タンパク質である。今回我々は、1prb の三次構造をターゲットに de novo デザインを行い、wild type とは全く異なった一次配列をもつ 20 種のデザインタンパク (DHB01～DHB20) を理論計算により設計した (前発表参照)。この 20 種のうち、charge と cavity から評価した上位 3 種 (DHB06、DHB09、DHB19) を選択しペプチド合成機を用いて化学合成を行い、その構造安定性を pH 7 付近で調べた。far UV 領域での CD 測定の結果 DHB09、DHB19 の 2 種はランダムコイル状態のスペクトルであったが、DHB06 は典型的な α -ヘリックス様のスペクトルを示した。DHB06 の配列は、Lys 9 個、Ala 10 個、Arg 4 個、Phe 5 個などからなり、逆に Leu や Val が含まれないなど自然界に存在するアミノ酸配列 (組成) からかけ離れたものである。DHB06 の温度に対する安定性を調べたところ 98℃ で完全変性し、かつこの転移は可逆であることがわかった。Native-Denatured 間の二状態転移モデルで波長 222 nm における CD 値の熱変性曲線の curve-fitting を行った結果、エンタルピー変化 25 kcal/mol および転移中点温度 79℃ を得た。また、near UV 領域の温度変化測定によって三次構造が、同様に変化することがわかった。一方、¹H-NMR 測定によると DHB06 の 1 次元 NMR スペクトルは高磁場シフトしたメチル基や低磁場シフトした His など、DHB09 や DHB19 には見られない特徴を示し、DHB06 が何らかの立体構造を持つことが示唆された。現在、DHB06 の 2 次元 NMR スペクトルを用いて解析を進行中である。

O.Kambara, W.Jin, S.Takada and A.Tamura : de novo design of proteins-3 helix bundle-(II)Experimental study of its structural property

1P054

タンパク質の de novo デザイナー 3 helix bundle の場合－(I) エネルギーランドスケープ理論による配列設計

○金 文珍¹、神原 大¹、田村 厚夫^{1,2}、高田 彰二^{1,2} (¹ 神戸大院・自然、² 科技団・さきがけ 2 1)

本研究は、任意の構造をもつタンパク質を、天然アミノ酸配列とは全く異なった人工的な配列によって設計することを目的とする。配列設計は、エネルギー関数を使ったコンピュータ計算によって行い、得られた配列を実験室で合成し、その構造、物性を検証する。最初の例として、今回 3 helix bundle 構造 (1prb) を target とする。本発表はエネルギーランドスケープ理論による理論設計の結果を、後続する発表で実験結果について、それぞれ報告する。

エネルギーランドスケープ理論によると、折りたたみ可能なタンパク質の設計原理は $[Z=(En-Ed)/\Delta E]$ を最小にする配列を探すことである。En は天然状態のエネルギー、Ed は変性状態の構造アンサンブルの平均エネルギー、 ΔE は変性状態エネルギーの標準偏差、Z スコアは「天然状態のエネルギーの偏差値」である。

モデルでは、一つのアミノ酸に対して主鎖を三つの原子で示し、側鎖 (グリシンを除く) を一つの球として示す。今回、新たに導入した Z スコアは天然構造だけではなく、部分的に天然構造と似ている構造の平均エネルギーも変性状態構造アンサンブルの平均エネルギーと比べるようになっている。設計された配列からのフォールディングシミュレーションの結果、新たに導入された Z スコアによって、高いフォールド能力を持つ配列が探索できることが分かった。

今回は、上の方法を用いて DHB01 から DHB20 までの配列を設計した。設計された配列について、cavity, charge, MD の計算を基にスコアをつける。最高スコアを持つ配列は CD spectra からは helix 構造の存在を示唆し、NMR のデータからは定まった三次構造があると考えられる。詳細な実験方法と結果については次発表を参照のこと。

W.Jin, O.Kambara, A.Tamura and S.Takada : de novo design of proteins-3 helix bundle-(I)sequence design by energy landscape theory

1P056

強い残基対相互作用を取り入れた適応度地形モデル:Biased Mutation Scrambling 法により得た突然変異体の解析

○相田 拓洋^{1,2}、浜松 典郎¹、野宮 由起子¹、内山 秀文¹、芝中 安彦¹、伏見 譲² (¹ ノバルティスファーマ (株)、² 埼玉大工)

我々はこれまで、蛋白質の適応度地形をアミノ酸残基の独立加算性の観点から研究してきた。具体的には、アミノ酸残基が適応度に独立加算的に寄与するモデル (富士山型地形モデル) を用いて、いくつかの蛋白質の局所的地形を解析し、このモデルが現実の地形を定量的に記述し得ることを示してきた。ここに我々は、ある残基間に劇的な相互作用が生じる場合の適応度地形モデルを考案し、プロリルエンドパプチダーゼの (局所) 地形の解析に適用しその妥当性を得たので、これを報告する。この適応度モデルは、各残基が独立的に寄与する “部位適応度” と、相互作用する残基対が寄与する “残基対適応度” から成る。一方、我々は、高速進化法としての Biased Mutation Scrambling 法を開発し、これをプロリルエンドパプチダーゼの耐熱化に適用することで、複数の耐熱性変異体を作成した。その内の 4 5 個のクローンに関して、アミノ酸配列と適応度 (= 57.5℃ における活性の半減期) の関係を当該モデルで解析した。詳しくは、これらの変異型蛋白に蓄積された E67Q と Q656R を含む計 1 4 種類の突然変異が適応度に及ぼす効果を見積もった。結果として、E67Q と Q656R が劇的に相互作用するとしたモデルを用いると、4 5 種類ある各クローンの適応度の実測値をうまく再現できた。この結果は、今回の解析の対象となった 2 値 1 4 次元配列空間上の適応度地形は、2 つのピークを有する山塊上の地形 (Twin peaks landscape) を意味する。また、この結論は、新たな Biased Mutation Scrambling 実験によって得られた突然変異体集団の適応度分布の解析からも、さらに、蛋白質立体構造の残基間距離の観点からも、妥当である可能性が大きいことが分かった。本研究は、通産省産業科学技術研究開発制度の一環として、新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO) より委託を受け (規定枠オーバー)、Takitoyo Aida, Norio Hamamatsu, Yukiko Nomiyaa, Hidefumi Uchiyama, Yasuhiko Shibanaaka & Yuzuru Husimi : A fitness model with a significant epistatic term: analysis of sequence-fitness relationship for mutants from Biased Mutation Scrambling.