LS1A1

エネルギー地形とフォールディング機構：計算機による蛋白質フォールディング解明への試み

○肥後 順一^{1,2} (1 東京薬科大・生命科学、²BIRD, JST)

タンパク質の立体構造は、極めて多くの可能な状態から限られたものが選ばれている。実際にどの構造が選ばれるかは、その配列情報が決めているはずである。配列情報から立体構造を導き出し、そして機能を予測する研究はバイオインフォマティクスとよばれ、データベースに貯えられた情報から立体構造に関するなにかの規則を見つける、という方向で進められている。一方、タンパク質の立体構造は自然の法則に従って決定されているのであるから、物理化学的なアプローチも可能な筈である。我々は、コンピュータシミュレーションを厳密に行うことにより、生体高分子の自由エネルギー地形を求め、その地形に分布する多くの安定構造を吟味することで立体構造形成のメカニズムを理解する試みを行ってきた。特に、マルチカノニカル分子動力学法と呼ばれる効率的なサンプリング法を用いることで、10 残基程度のペプチドの水中での立体構造予測が可能になるころまで、研究は進んできた。また、蛋白質の一部分を切り出してきてシミュレーションを行うことにより、蛋白質全体のフォールディングに対しての知見も得られるようになってきた。ところで、分子動力学法では利用する原子間相互作用（力場）の正確さが決定的に重要であるが、これまでその妥当性を充分吟味できなかった。しかし、効率的なサンプリングが可能になり、はじめて力場の妥当性を議論できるようになった。より鎖の長いペプチドや蛋白質を研究するためには、アルゴリズムをさらに発展させることと、計算機の高速化が必要である。我々は、MD engine II と呼ばれる専用計算機を今年導入して、この問題に取り組み始めた。なお、この研究は、科学技術振興事業団バイオインフォマティクス推進事業（BIRD, JST）からの援助を受けて進められている。

J. Higo : Energy landscape and folding mechanism: Approach for understanding protein folding by computer

LS1B1

生細胞における H-Ras 活性化の 1 分子イメージング解析

○村上 瑞奈、小林 剛、楠見 明弘（名大院理/科技団・ERATO）

低分子量 G タンパク質である H-Ras は、成長因子などの刺激によって活性化される分子スイッチである。細胞増殖、分化、細胞骨格の再編成などを誘導するシグナル伝達系を ON-OFF する重要な機能を果たしている。我々は、Ras の活性化とシグナル伝達の制御機構の解明を目指して研究している。その特徴は、生細胞中での H-Ras を、その動きのみならず、活性化までも 1 分子毎に可視化する方法を開発したところにある。すなわち、YFP-H-Ras 発現細胞に Alexa594 標識した RBD (Raf-1 の Ras binding domain) をマイクロインジェクションし、YFP-H-Ras が活性化されたときに RBD が H-Ras に結合するのを、YFP から Alexa への 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動（1 分子 FRET）をモニターすることによって検出した。リガンド刺激後に Ras が活性化される時間帯（3－4 分）に、FRET シグナルが顕著に増加したが、1 分子 FRET 輝点の個々の寿命は殆どが 0.67 秒以下と非常に短かった。また、不活性型の H-Ras 分子は、リン脂質並みに速い拡散運動をしているが、活性化して FRET を起こしている間は殆ど運動を停止した。この停留は、カベオラ/ラフトに依存しておらず、上流のシグナル分子や下流の effector との結合にも依存しなかった。我々は、Ras が活性化に伴って、SUR-8 などの Ras スキャフォールディングタンパク質に結合し、停留した場所で短時間に信号伝達をおこなってすぐに不活化される可能性を考えている。このように、癌遺伝子産物である H-Ras のシグナル伝達は空間的・時間的に非常にタイトに制限され、暴走しないように、空間情報を維持するように制御されているのであろう。

M.Murakami T.Kobayashi A.Kusumi : Single molecule imaging analysis of H-Ras activation in living cells

LS1A2

タンパク分子の「硬さ」の分子動力学シミュレーションによる研究

○太田-飯野 里子、Rukman Hertadi、Mohammad Taufiq Alam、猪飼 篤（東工大院・生命理工）

本研究室では、タンパク分子を AFM を用いて延伸し、その力学的特性を調べている。最近、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase、以下 CA、分子量 29000)、カルモジュリン (calmodulin、以下 CAM、分子量 16000) の 2 種類の分子について以下のような興味深い Force-Extension profile が得られた。まず CA は活性のある Type I コンフォーマーから活性の無い Type II コンフォーマーへの転移が見られた。CAM の場合は Ca2+ 存在下で力のピークを示し、分子内に特に「硬い」部分が存在することが分かった。一方 Ca2+ 非存在下ではピークはなかった。これらの転移やピークにおいて具体的にどのような構造変化が起きているか、すなわちどのような構造が延伸力に対して「硬い」かを調べるために、分子動力学シミュレーションを行った。プログラムには NAMD、または AMBER 7 を Steered Molecular Dynamics の方法 (Lu et al., 1998, Biophys. J. 75 662-671) を参考に改変したものを用いた。CA は Zn2+ 非結合状態、CAM は Ca2+ 結合状態 (holo-CAM) と非結合状態 (apo-CAM) から計算を行った。シミュレーションの結果、CA、CAM とともに実験と同様の Force-Extension profile を示した。CA、holo-CAM が示した力のピークにおける構造変化を調べると、ともに金属イオンが結合出来なくなる構造変化が生じていることが分かった。CA は Zn2+ に配位する 3 つのヒスチジンが位置する β シートが引き伸ばされたとき、CAM の場合は Ca2+ と結合するループが引き伸ばされたときと一致していた。本シミュレーションの結果、実験と同様の Force-Extension profile が得られたことから、これらのタンパク分子のような大きな分子についても分子動力学計算により AFM の延伸の実験を大局的には再現できることが示された。さらに、力のピークにおける構造変化を可視化することにより、実際に起きている構造変化を推測した。

S. Ohta-Iino, R. Hertadi, M. T. Alam and A. Ikai : Mechanical strength of single protein molecules studied by molecular dynamics simulations

LS1B2

細胞内 1 分子イメージングによる細胞質-核間輸送の定量解析

○徳永 万喜洋^{1,2,3} (1 遺伝研、² 総研大、³ 理研・免疫センター)

細胞の内部で分子 1 個を蛍光で見るための、新しい顕微鏡法の開発に取り組んできた。ガラス表面の蛍光 1 分子イメージング法として開発した対物レンズ型全反射照明では、対物レンズの縁に照明用レーザー光を入射しているが、この入射位置を少し変え、全反射することなくカバーガラスに平行に近い浅い角度で試料を照明し、薄い光の層で照明することで、背景光を下げることができた。

この薄層斜光照明法により、細胞質-核間で輸送される分子を GFP で蛍光標識し細胞内で観察した。核膜上で、核膜孔と相互作用、あるいは通過している GFP-Importin beta 分子や NLS-GFP 分子 1 個を観察することが可能となった。ガラス表面上の GFP と比べて、ほぼ遜色のない 1 分子像が得られている。

分子 1 個の動態観察からは、核膜孔上での滞在時間・通過時間が求められた。さらに、核膜孔 1 個の蛍光強度と 1 分子の蛍光強度との比から、1 つの核膜孔に結合している分子数を求めた。濃度を変えて定量的画像解析を行うことにより、最大結合分子数・結合定数といった、分子機構上重要な量を定量的に求めることができた。その結果、核膜孔には弱い結合部位と強い結合部位があることが見つかった。弱い結合部位は多くの分子を集める役割を果たし、強い部位もしくはその近傍で、G タンパク質との反応がおこって核内に荷物を降ろすのであろうと考えている。今回の結果は、1 つの核あたり毎分約 100 万個という数字を、説明することができる。

細胞内 1 分子イメージング法は、分子間相互作用に関する諸量を細胞内で定量的に求め、分子機構を解明するための有力な手法である。

M. Tokunaga : Single molecule imaging and quantitative analysis of nucleocytoplasmic transport and intermolecular interactions in the cell