B101

静電ポテンシャルと分子表面形状による蛋白質のDNA結合能および結合部位の予測

○土屋 裕子¹、木下 賢吾^{2,3}、中村 春木¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 横浜市大院・総合理学、³ 科技団・さがけ)

蛋白質-DNA相互作用は遺伝子の転写制御などの生命現象において非常に重要な役割を果たしている。蛋白質-DNA複合体の立体構造は数多く解析されているが、異なる蛋白質が類似したDNA塩基配列の認識を行う場合や、類似した構造をもつ蛋白質同士でも一方はDNA結合能を持つが他方はまったくDNAに結合しない場合があるなど、複合体形成の共通原理はいまだ明らかにされていない。そのため、ある蛋白質の立体構造が解析されても、それがDNAに結合するの、結合するのであればどのようにDNAと結合するのといった予測を行うことは容易ではない。

そこで、蛋白質、DNA分子表面の物理化学的性質(特に静電ポテンシャル)と分子表面の形状の相補性といった、従来法とは異なる新しい視点から蛋白質-DNA相互作用についてさまざまな解析を行った。その結果をもとに、蛋白質のDNA結合能、蛋白質分子表面上のDNA結合部位を評価する関数を決定し、DNA結合能および結合部位を評価(予測)する手法を開発した。

この手法を用いてdsDNA結合蛋白質複合体、また、ssDNA、RNA、モノヌクレオチド結合蛋白質複合体に対して評価を行った。

図 蛋白質表面上の (b) dsDNA結合部位(黄色)と (c) dsDNA結合が予測された部位(緑色)

Y.Tsuchiya, K.Kinoshita and H.Nakamura : Prediction of DNA binding surface of proteins, by evaluating the scores of electrostatic potential and the shape of molecular surface

B103

バルナーゼのアンフォールディング過程におけるモジュール構成の保存

○篠田 和紀¹、高橋 健一²、郷 通子² (¹ 名大・院理・生命理学、² 長浜バイオ大・バイオサイエンス)

モジュールは、蛋白質の球状ドメイン内のコンパクトな構造単位であるが、力学的に安定であることがわかっていない。バルナーゼは6個のモジュールに分解できる。モジュールが蛋白質の折れ畳み過程で果たす役割を理解する為に、バルナーゼの水中での498 Kにおける熱変性過程の分子動力学シミュレーションを静電相互作用のカットオフなしで3 ns × 10 回行った。その結果、10 回のシミュレーションに共通な特徴として、バルナーゼの変性過程において二次構造や疎水性コアなどの構造要素は徐々に失われていくのに対し、天然モジュール境界はほぼ100%維持されており、天然構造上のモジュールは変性過程においてそれぞれの立体構造は変形しながらも相対的にコンパクトな構造をかなりの間保つことがわかった。これは、主にモジュール内両末端領域残基間の疎水性相互作用が残存しているためであった。生理条件下での自由エネルギー曲面が498 Kのものと定性的に違わないとすれば、今回の結果を逆に辿ることで、バルナーゼの折れ畳みメカニズムは次のように考えられる：まず近距離残基間の非特異的な疎水性相互作用により個々のモジュールは疎水性残基が局在する両末端領域間が閉じてコンパクトに凝縮し、その後特異的な相互作用を形成しながら個々のモジュールが折れ畳むのと並行してモジュール間相互作用を形成して天然構造に折れ畳む。折れ畳み初期に個々のモジュールがコンパクトにまとまることは構造空間の劇的な縮小を伴うので、Levinthal Paradox を解く要因になり得る。これらの結果から、本研究は蛋白質のモジュール構造と折れ畳みのメカニズムを初めて直接関連付けることができたと言える。

K.Shinoda, K.Takahashi and M.Go : Conservation of Native-like Module Structure in Unfolding of Barnase

B102

分子動力学法によるMutTの8-oxo-dGMP認識機構解明

○樋口 真理子¹、石田 恒¹、北尾 彰朗^{1,2}、山縣 ゆり子³、郷信広^{1,4} (¹ 原研・中性子利用センター、² 東大・分生研、³ 熊本大院・薬、⁴ 奈良先端大・情報科学)

生物は様々な修復機構を用いてDNA上の情報を維持している。その中の一つにDNAの材料であるヌクレオチドが酸化した時にそれを除去する機構がある。*E. Coli* から発見されたMutTは、DNA変異原となる8-oxo-dGTPを加水分解して8-oxo-dGMPとすることで除去している。我々は分子動力学法を用いてMutTの8-oxo-dGMP認識機構を解明することを目指している。

最近、山縣らによりMutTと8-oxo-dGMPが結合した複合体の構造と基質フリーのMutTの構造がX線結晶構造解析を用いて解かれた。それによると複合体ではフリーのMutTと比べて8-oxo-dGMPを囲むように大きな構造変化を起こしている。また、MutTは8-oxo-dGMPの酸化された部位O8は認識せず、dGMPとはグアニン塩基のN7位に水素が付加されているかで区別していることが分かる。Mildvanらは滴定型熱量計を用いてMutTと8-oxo-dGMPの結合に関する熱力学量とMutTとdGMPのそれを測定しているが、大きなエントロピー損失を上回るエンタルピーによりMutTと8-oxo-dGMPの方が安定化している。MutTは8-oxo-dGMPのH7に生成される水素結合の有無だけではなく、構造変化によっても8-oxo-dGMPとの結合を安定化させていると考えられる。

我々はフリーのMutT、MutT-8-oxo-dGMPの2つの系で分子動力学シミュレーションを開始している。そしてMutTの基質認識部位の構造揺らぎを比較することで大きな構造変化の起こる機構を探る。また、8-oxo-dGMPとMutT基質認識部位との相互作用を詳細に解析することにより、MutTと8-oxo-dGMPとの結合の安定化と認識機構のかかわりを解明する。詳細は本年会にて報告する。

M.Higuchi, H. Ishida, A. Kitao, Y. Yamagata and N. Go : Molecular dynamics simulation study of 8-oxo-dGMP recognition mechanism of MutT

B104

抗体の親和性成熟に関する量子化学的研究

○大野 一樹、井上 義夫、櫻井 実(東工大院・生命理工)

【研究目的】生体分子間相互作用の解明は、生物学において重要な問題の1つである。生物の全ての相互作用を実験的に解明することは困難であり、高精度の生体分子間相互作用予測手法の確立が望まれている。本研究では量子化学レベルの高精度な相互作用計算手法の確立を目的としている。

【研究対象】抗体は親和性成熟という過程により、異物を認識する能力を洗練させる。抗体48G7の染色体の抗体配列に9個のアミノ酸残基の変異が入ることにより、活性は10000倍以上になる。

【方法】48G7の染色体型・成熟型の結晶構造はプロテインデータバンクから取得し、構造可視化ソフト(Web Lab Viewer)を利用して水素を付加した。構造最適化、エネルギーの一点計算は分子軌道計算により実施した。(プログラム:MOPAC2002、計算理論:MOZYME/AM1)特にエネルギーの一点計算においては連続誘電体近似により水分子の影響を考慮した(COSMO法)。

【結果と考察】全原子量子化学計算による相互作用計算によって実験を正確に再現することができた。具体的には親和性向上の計算値は-5.8 kcal/molとなり、実験値(-5.6 kcal/mol)を再現した。ただし、相互作用エネルギーの絶対値に関しては2~3 kcal/mol程度の誤差があった。原因はCDR領域以外からの寄与を考慮しなかったことなどが考えられる。

また、CDR領域以外の解離性アミノ酸残基は相互作用エネルギーに影響していることが分かった。特に解離性アミノ酸残基のつくる静電場によって影響を受けていることが分かった。電荷状態の変化も親和性の向上の原因だと思われる。

発表当日は抗体の電子状態に関する知見、抗体・抗原間の電荷移動などについても発表する。

K. Ohno, Y. Inoue, M. Sakurai : Quantum Chemical Study of Antibody Affinity Maturation