B209

サブナノ秒MDとペプチドフォールダビリティ

○川俣 大輔、青山 崇、西垣 功一（埼玉大・工・機能）

モジュールサイズのペプチドは構造形成単位として興味深い。しかし、タンパク質に比べて、分子量の小さいペプチド（15mer程度）は、一般に構造安定性が低く安定構造にフォールドしないことが多い。一方、小さいとはいえ、このサイズのペプチドについてミリ秒にわたるMD計算をすることは今のところ現実性に乏しい。進化分子工学技術、とりわけブロックシャッフル法において要請される合理的設計の1つに「用いるブロックの最適化問題」があるが、この分野はまったく未開拓の状態に取り残されている。当面、ペプチドとしてのfoldabilityを論ずる所から始まると考えられ、我々はこの目的のためにMD法を用いている。本研究では天然状態で α ヘリックス構造をとるribonuclease AのC末端からの16残基部分、 β シート構造としてprotein Gの41~56残基などを選びMD計算を行った。サブナノ秒での計算結果から天然においてフォールドするペプチドに特有と思われる現象——早い段階から旋回半径が有意に小さくなる——が観察され、別の指標（構造のゆらぎ）からは α ヘリックスと β シートの差異が認められた。これらの現象は数百ピコ秒という時間の計算から得られており、進化分子工学において膨大な数の分子からの絞込みを行う予備スクリーニングに用いる可能性が示された。本研究を進めてペプチドのfoldabilityを計算的に求める道を拓く可能性を論じる。

D.Kawamata, T.Aoyama, K.Nishigaki : Subnano-second molecular dynamics and peptide foldability

B211

金属イオン結合ループを導入したミオグロビンでの酸素結合制御機構の解明

○谷口 修平、伊原 正喜、高橋 聡、石森 浩一郎、森島 績（京大院・工）

我々は、酸素貯蔵蛋白質ミオグロビン(Mb)の活性部位へム周辺のループ構造をCa²⁺結合ループに置換することで、Ca²⁺結合により酸素結合が制御される蛋白質(CMb)の人工的設計を試みてきた。これまでに、CMbの変異体の一つである Δ Gly-CMbは、高いCa²⁺親和性($K_d=8.3 \times 10^{-5}$ M)を保持し、Ca²⁺結合に伴い酸素親和性が0.184 μ M⁻¹から0.109 μ M⁻¹へと低下することを見出した。この Δ Gly-CMbの酸素親和性の変化は、酸素解離速度定数が60.1s⁻¹から76.0s⁻¹へと増加した寄与が大きく、そのCO体のIRスペクトルの結果から、へムに配位した酸素分子と水素結合を形成するへム遠位側His64のイミダゾール環の配向が、Ca²⁺結合に伴い変化したためと考えられた。このHis64は、46番アミノ酸残基と立体的に相互作用していることから、Leu46を側鎖体積の大きなPhe及び小さいValに置換した変異体(Δ Gly-CMb46F, Δ Gly-CMb46V)を作製することにより、 Δ Gly-CMbにおけるHis64の配向と酸素解離速度との相関を検討した。Ca²⁺非結合状態ではPhe、Leu、Valと側鎖体積が減少するに従い、酸素解離速度定数は増大し(46.5s⁻¹ 60.1s⁻¹ 78.1s⁻¹)、水素結合を形成するHis64の配向が減少することが示唆された。一方、Ca²⁺結合状態では、46番アミノ酸残基の立体障害にかかわらず、ほぼ同じ酸素解離速度定数(79.7s⁻¹ 76.0s⁻¹ 76.8s⁻¹)を示した。このような現象は、Ca²⁺が結合した場合、Ca²⁺結合ループが縮まることで、そのN末端付近に位置する46番アミノ酸残基がHis64から遠ざかり、His64との立体的相互作用が弱くなったためと考えられた。このことから、 Δ Gly-CMbにおいては、46番アミノ酸残基の立体障害によってCa²⁺非結合状態のHis64の配向を変化させることが可能で、その結果Ca²⁺着脱による酸素親和性の差を制御できると期待される。

S.Taniguchi, M.Ihara, S.Takahashi, K.Koichiro and I.Morishima : Regulation Mechanism of a Novel Myoglobin with a Metal Binding Loop

B210

ジペプチドを単位パラメータとした蛋白質二次構造の統計的解析

○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)

これまで、蛋白質の二次構造に関するアミノ酸残基の統計的解析が行われてきた。これは、20種類のアミノ酸残基をパラメータとするのが基本的な見方である。しかしながら、二次構造の形成において本質的なのは、アミド間の水素結合であり、このアミドを特徴付けているのは、アミドの両端にあるアミノ酸側鎖であると言える。そこで、本研究では、ジペプチドを一つの単位と見て、二次構造の統計的解析を行った。これによって、アミノ酸残基の連続した、つまり配列としての情報をも考慮に入れることができる。

1081種類の蛋白質に対して、二次構造に含まれるジペプチドの割合と、全蛋白質中に含まれるジペプチドの割合の比をとり、ジペプチド単位のパラメータとして算出した。その結果、ジペプチドによっては、アミノ酸残基の順序の違いにより、ジペプチドパラメータに逆転が見られたり、アミノ酸残基の順序の違いが見られないものもあった。次に、ヘリックス構造において、パラメータが高いジペプチドAA, AE, AK, AL, AM, AQ, ARの主鎖二面体角のヒストグラムを調べたところ、分布がせまい形をとるAA, AE, AK, ARと、逆に広い形をとるAL, AM, AQとに分類できた。また、ジペプチドAAにおける最も頻度の高い主鎖二面体角を、ヘリックス構造の場合とストランド構造の場合とで求め、AAの分子軌道計算を行った。その結果、ヘリックス構造での自由エネルギー(9.5kcal/mol)の方が、ストランド構造での自由エネルギー(10.2kcal/mol)よりも低かった。したがって、ジペプチドAAについては、ヘリックス構造中の方がストランド構造中よりもエネルギー的に安定であった。また、AAのストランド構造中での主鎖二面体角のヒストグラムは、広い形をとっているため、せまい形をとるジペプチドは、広い形をとるジペプチドよりもエネルギー的に安定であると考えられる。

Hiroya Osoegawa, Kazuyasu Konko, and Shokichi Ohuchi : The statistical study of protein secondary structure by the parameter of dipeptide unit.

B212

単層シートを基とした β -sheet構造を持つペプチドのデザイン

○笹川 拓明¹、中川 とも子²、岡本 英嗣³、田村 厚夫^{1,2} (¹科技団さきがけ21、²神戸大学自然科学研究科、³神戸大学理学部)

分子量の小さいペプチド鎖を用いて β -sheet構造をデザインする事で、タンパク質の2次構造の一つである β -sheet構造の安定化機構を明らかにすることを試みた。出発点として β -sheet構造のみから構成されるタンパク質、OspAを用いた。OspA内の β -hairpin(β -strand 9-10)領域は、安定な単層シート構造を持ちシートの両面が溶媒に露出しているが、そのみを合成、単離した場合、構造をもたない。そこで、タンパク質の構造データベースの統計的な分析やモデルペプチドから得られる経験的な情報を用いて、OspAの β -hairpinの領域が溶液内にて単独でペプチドが構造を持つようにリデザインを行った。この結果、いくつかの安定な構造をもつ β -hairpinペプチドが得られ、NMRによって決定した立体構造より、構造安定化には芳香族残基が大きく寄与していることがわかった。また、OspA内での β -hairpinより多くの側鎖間相互作用が存在し、芳香環相互作用と併せて単離によって失った疎水相互作用等を埋め合わせていることが明らかになった。また、静電相互作用の安定化への寄与は小さいことが示されたが、リジンやグルタミン酸のように長いメチレン基を持つ極性残基は、モノマーの β -hairpinペプチドデザインにおいて有用であることが示唆された。さらに、これらの2本鎖 β -sheetペプチドから1本の β 鎖を追加した3本鎖の β -sheetペプチドの設計を試み、立体構造の解析を行った。

H.Sasakawa, T.Nakagawa, H.Okamoto, A.Tamura : Designing β -sheet peptides based on the single layer β -sheet.