1P041

転写因子 CREB の CRE 配列認識機構におけるマグネシウムイオンの役割

○塩満 栄司¹、小田井 圭²、杉本 徹³、伊藤 悦朗¹ (¹北大・院理・生物、²湘北短大・情報メディア、³関東学院大・工)

転写因子 CREB は CRE という DNA 配列に特異的に結合する。CREB は塩基性領域で DNA と結合しており、結合には両者の間の静電相互作用が大きく寄与している。このため、CREB は CRE 以外の DNA 配列にもある程度の親和性で結合することが確認されているが、マグネシウムイオン Mg^{2+} 存在下では CREB-CRE の結合特異性が顕著になることが実験的に示されている。CREB と CRE が結合して複合体をなした状態の結晶構造は既に求められているが、そこでは CREB と CRE に挟まれた窪みにマグネシウム 6 水和物 $Mg(H_2O)_6^{2+}$ が観察される。この $Mg(H_2O)_6^{2+}$ が CREB-CRE 間で各種の結合が成立する仲介をし、CREB の CRE 配列認識機構において重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

本研究では、この CREB による CRE 配列認識機構に Mg^{2+} の有無が及ぼす影響を計算機科学の立場から調べた。まず、上記の CREB-CRE 複合体の結晶構造を出発点とし、複合体の周りにカウンターイオンを配置し溶媒和した上で、分子動力学法によって等温定圧条件下でその構造を平衡化した。次に、こうして得られた平衡構造の自由エネルギーを分子軌道法によって量子化学計算した。複合体から $Mg(H_2O)_6^{2+}$ を抜き出した場合や各構成分子単体についても同様の計算を行い、その結果得られたそれぞれの値を相互に比較したところ、まず、 Mg^{2+} の有無にかかわらず、CREB と CRE は複合体を形成しているときの方が自由エネルギーが低い（構造が安定である）ことが分かった。さらに、 Mg^{2+} 存在下の方が結合は自由エネルギー的により安定になっていることが確認された。つまり、CREB と CRE の結合には、両分子間の静電相互作用はもちろんのこと、 Mg^{2+} の存在が大きな意義を果たしていることが分かった。

E. Shiomitsu, K. Odai, T. Sugimoto and E. Ito : The Role of a Magnesium Ion in the CRE Recognition Mechanism by the Transcription Factor CREB

1P043

Barnase-Barstar 複合体の X 線結晶構造解析
Barstar Asp39 → Ala の変異による解離平衡定数の著しい上昇と、構造との相関

○浦久保 良昭¹、伊倉 貞吉^{2,3}、伊藤 暢聡⁴ (¹東京医歯大院生命情報、²東京医歯大院疾患生命、³JST さきがけ、⁴東京医歯大院疾患生命)

Barnase は *Bacillus amyloliquefaciens* の RNA 分解酵素であり、細胞内でその活性を阻害するタンパク質が Barstar である。両者は極めて高い親和性を持って、結合することが知られている。

この Barnase-Barstar 複合体は野生型 (Wt) で $1.0 \times 10^{-14} M$ という非常に低い解離平衡定数を持つことが知られている。この解離平衡定数は複合体の結合界面において、Barstar の Asp35、Asp39、Glu76 の 3 残基が、特に強く相互作用することによるものである。Asp35、Asp39、Glu76 のアラニンへの置換体は、それぞれ、 2.0×10^3 倍、 4.1×10^6 倍、10 倍、複合体の解離平衡定数を上昇させる。即ち、この複合体は Barstar の Asp39 と Barnase の相互作用により、極めて強く結合しているといえる。しかし、これは既知の結晶構造からは説明できない。

この特異的な相互作用の詳細を調べるために、我々は、Barstar の Asp39 をアラニンに置換した変異体と、Barnase との複合体の結晶構造を解析した。Asp35、Glu76 のアラニンへの置換体と Barnase との複合体は、既に報告されており、この 3 つの複合体構造と Wt の複合体との構造を比較し、解離平衡定数が著しく変化する理由について、構造の変化から考察したい。

Y.Urakubo, T.Ikura, N.Ito : X-ray structural analysis of a barnase-barstar complex. Comparative study of protein structures and dissociation constants

1P042

グルカンスクラーゼ (Glucosyltransferase-I) におけるドメイン間相互作用：C 端系統的欠損体の酵素化学および物理化学的性質

○貞兼 孝幸¹、小松 英幸²、皿井 明倫²、児玉 孝雄² (¹九大院・情報科学・生命、²九工大・情報工・生命)

Streptococcus sobrinus 6715 の Glucosyltransferase-I (GTF-I, $M_r=175k$) は、N 端側の触媒ドメイン (NCD, $M_r=120k$) と C 端側のグルカン結合ドメイン (GBD, $M_r=55k$) で構成されている。GBD は 1 回が約 70~115 残基の 6 回繰り返し配列を有しており、この繰り返し数はグルコシル基アクセプターとなるデキストランを結合する強さと相関がある (昨年度年会)。NCD および GBD は、単独でそれぞれスクロース分解およびデキストラン結合の機能を有するが、NCD の作用によるスクロースからデキストランへのグルコシル基転移には GBD が必須であり、そのメカニズムについては不明である。そこで、GTF-I 反応における GBD の役割を解明するために、C 端の系統的欠損変異体について、物理化学的特性の解析を行った。

等温滴定熱測定により、各変異体のデキストランとの親和性を評価し、さらに、円二色性スペクトル測定により両ドメインの変性過程を追跡した結果、C 端の欠損によってデキストランとの親和性が低下するのみならず、両ドメインの熱変性における協同性の低下が観測された。これらのデータは、NCD と GBD の両ドメインは互いの二次構造には影響を与えないが、互いのドメインの高次構造変化を引き起こしていることを示唆する。また、C 端約 260 残基を欠損した変異体では、デキストラン結合能はあるにも関わらず転移活性と両ドメインの協同性が著しく低下する。これらの結果から、NCD のグルコシル基転移の発現には、GBD によるデキストラン結合能=アクセプター近接効果だけでなく、ある大きさ以上の GBD によって誘起される触媒サイトにおける微妙な構造変化が重要な役割を果たしていることが考えられる。現在、両ドメイン間における相互作用の評価を行うために、示差走査熱測定による熱変性過程の解析を進めている。

T.Sadakane, H.Komatsu, A.Sarai and T.Kodama : The domain-domain interaction in glucansucrase: enzymatic and physico-chemical properties of a series of C-terminal deletion mutants

1P044

蛋白質相互作用界面でのアミノ酸残基置換がもたらす相互作用変化の定量的予測

○伊倉 貞吉^{1,2} (¹東京医歯大院・疾患生命、²JST・「さきがけ」)

近年のプロテオミクス研究の発展により、細胞内には広範囲に及ぶ蛋白質分子間の相互作用ネットワークが存在していることが明らかになった。ところが、蛋白質分子間の相互作用は温度や塩などの環境因子や点突然変異などにより様々な影響を受けるので、プロテオミクス研究によって示された相互作用が必ずしも恒常的に存在するとは限らない。中でも、点突然変異は、アミノ酸残基の置換と、それに伴う蛋白質間相互作用の低下につながり、疾病にも関わる重要な因子である。もしアミノ酸残基置換が蛋白質分子間相互作用に及ぼす影響を予め推測することができれば、プロテオミクス研究の成果活用の一助となるに違いない。そこで、本研究では、蛋白質間の相互作用界面内のアミノ酸残基置換に注目し、置換に伴う相互作用自由エネルギー変化の定量的な予測を試みた。モデル系には、蛋白質分子間の相互作用研究で実験的かつ理論的に幅広く利用されているバルナーゼとバルスターを取り上げた。まず、野生型の蛋白質複合体の立体構造を元に変異型の立体構造を構築した。変異型複合体として、野性型バルナーゼと変異型バルスター D39A の複合体を用いた。次に、野生型及び変異型複合体のそれぞれについて、分子動力学シミュレーションを用いて 900ps 間の蛋白質分子及び水分子のダイナミクスを解析し、比較をおこなった。相互作用の評価には、直接的相互作用、水を介した間接的相互作用、水分子の侵入の影響のそれぞれに関して最近独自に決定したパラメータ (Ikura et al., Chem. Phys., in press) を用いて行った。解析の結果、野生型と変異型での相互作用の変化は変異箇所に集約し、相互作用自由エネルギーは 6.5kcal/mol 減少することが予測された。この値は、実験から求められた 6.0kcal/mol と極めてよい一致を示している。

T.Ikura : Quantitative prediction of a change in the protein-protein interaction caused by a substitution of an amino acid residue at interface