3P117

β プロペラ構造ホスホトリエステラーゼの発現と二次構造解析

平野 信二、阿部 真樹子、○大内 将吉（九工大・情報工・生命情報）

ホスホトリエステラーゼ (PTE) は、有機りん酸化合物を基質とする酵素である。これまで、*Flavobacterium* sp. からの PTE をモデル蛋白質として、蛋白質の構造安定化やバイオテクノロジーへ応用した研究を進めてきた。最近、*Loligo vulgaris* (イカ) の神経節から、PTE と同様の有機りん酸化合物を基質とするジイソプロピルフルオロホスファターゼ (DFPase) が見いだされ、 β プロペラ構造を有する蛋白質であることも示された。PTE のアナログとして、基質特異性や蛋白質の二次構造研究という観点から、この β 構造型ホスホトリエステラーゼに着目し、蛋白質の発現と構造解析を行うこととした。この DFPase は β プロペラ構造を形成した 314 残基からなる蛋白質で、その遺伝子配列も報告されている。遺伝子の設計法としては、分割した DNA 断片から段階的に伸長し、全長の DNA を作製することとした。DFPase 遺伝子の配列をもとにして、まず、15 bp の相補的な配列をもつ DNA 断片を設計した。一段階目では、一つが 95 bp からなる DNA 断片 2 本を一組とし、PCR による結合と増幅を行い、つぎの段階の長さ 175 bp が得られた。さらに、同様な操作により 335 bp、655bp、そして全長の 942 bp の DNA 断片を得た。これらの DNA 断片については、いずれも配列の確認も行なった。途中で得られた 335 bp の 3 本の断片は、 β プロペラ構造蛋白質を 3 分割した構造として部分配列を発現することも可能であるため、得られた全長 DNA、さらには 3 つの断片 DNA について、常法により蛋白質を発現した。得られた蛋白質および蛋白質断片の二次構造解析を CD スペクトルにより行なった。

S. Hirano, M. Abe, S. Ohuchi : Expression of beta propeller type phosphotriesterase and its secondary structure analysis

3P119

境界要素法を用いた Avian Pancreatic Polypeptide のボルンエネルギー計算

○川上 健、岩永 孝司、高崎 隆行、入佐 正幸（九工大・情報工）

「3次元構造予測問題」を解決するための自由エネルギー計算のうち、水との相互作用に起因する水和自由エネルギーの計算、特に静電相互作用の寄与（ボルンエネルギー）の計算には時間的困難が存在する。我々は、ボルンエネルギーを計算する手法として計算幾何学を用いた境界要素法 (BEM) を適用し、プログラムを開発してきた。これまでアミノ酸など低分子での計算における境界要素の影響を検証してきた。我々のプログラムは、(1) 水溶液に適応した場合無限個の水分子を考慮することができる (2) 計算幾何学手法により境界面の分子形状を保ったまま境界要素への分解を行うため、入力データ数が大幅に減少し、計算の高速化や高精度での計算が可能となる、等の利点を持っている。しかし、我々はこれまでグリシン（原子数 10 個 要素数 約 2000 個）など低分子での計算にとどまっていた。蛋白質で計算を行う場合、原子数の増加に伴い境界要素数の大幅増加につながり、メモリ使用量など問題が生じ計算が不可能であった。しかし、今回、計算アルゴリズム及びデータの入出力部分のプログラム改変を行うことにより蛋白質分子として Avian Pancreatic Polypeptide（原子数 368 個 残基数 36 個 要素数 約 6000 個）の計算を可能とし、その際の計算結果における境界要素数の影響及び計算時間、メモリ使用量を含めて検証を行った。

T.Kawakami, T.Iwanaga, T.Takasaki and M.Irisa : Born Energy calculation of Avian Pancreatic Polypeptide by using Boundary Element Method

3P118

全原子モデルを用いた新規タンパク質デザインシステムの開発と構造デザインへの応用

○伊藤 英夫¹、高田 彰二² (¹神戸大院・自然科学、²神戸大・理)

タンパク質のデザインは、「機能デザイン」と「構造デザイン」の 2 つに大きく分けられる。機能デザインとは、ある機能を持つ構造（とりわけ機能部位）に対して最適なアミノ酸配列を予測する事により、望みの機能を持つ新たなタンパク質分子の創製を試みるものである。また構造デザインとは、任意のタンパク質構造に対して最適なアミノ酸配列を予測する事により、望みの構造を持つタンパク質分子の創製を試みるものである。デザインの研究は共にその工学的応用に止まらず、前者ではタンパク質の機能と構造の関係に対して、後者ではタンパク質の立体構造構築原理に対して、現在我々が持つ知見の達成度を知る良い指標となるものである。計算機を用いて機能デザインを行う際、タンパク質分子の機能部位とリガンド分子との相互作用を高精度に評価する為には、分子を全原子で表現する事が必要不可欠である。また構造デザインを行う際にも、全原子モデルを用いる事で主鎖と側鎖、側鎖と側鎖間の相互作用を詳細に表現できる為、分解能の高いデザインが可能となる。そこで我々は、全原子モデルによる新規タンパク質配列の合理的なデザインシステムの開発に取り組んでいる。同システムは、力場として CHARMM19 力場と、同力場に最適化された陰溶媒モデル Generalized Born エネルギー項（共に Brooks ら）を実装し、離散的に構造変化をする側鎖 (rotamer) として、主鎖構造依存型 rotamer ライブラリ (Dunbrack ら) を採り入れている。これにより高精度かつ高速な側鎖構造空間の探索を可能としている。タンパク質の配列デザインは、モンテカルロ法によりアミノ酸配列と側鎖構造を変えながら、ある構造（ある機能を持つ構造）に対して最適な配列を探索する事によって行う。今回は、同モデルの詳細とその構造デザインへの応用例を示す予定である。

H. Ito, S. Takada : Computational protein design system with all-atom models

3P120

ナノセカンド MD でタンパク質構造安定性の片鱗を伺い知る

○村山 真一¹、森 透¹、西垣 功一^{1,2} (¹埼玉大・工・機能、²埼玉バイオ / 埼玉県中小企業振興公社)

進化分子工学的目的で構築された膨大な数の分子群の中から特定の目的に叶う可能性を持った分子の選別のために分子動力学が利用できないかを検討している。その一環として、本研究ではオリゴペプチドのナノ秒シミュレーション観察から最終的なオリゴペプチド安定構造が推定可能かどうかを調べている。そこでいわゆるモジュールサイズの 16 残基のランダム配列ペプチドについて分子動力学によりフォールディングシミュレーションを行った。配列には天然タンパク質のアミノ酸組成を基にしてランダムに発生させたもの 30 種、それとは別に、 α ヘリックス形成傾向の高いもの 10 種、 β シート形成傾向の高いもの 10 種を発生させ用いた。シミュレーション環境では AMBER99 の力場を用い、Generalized Born 溶媒モデルを採用した。予め主鎖の二面角をランダムに与え、立体障害のあるものを取り除き、50 個の初期構造を作成した。それらの構造についてエネルギー極小化を行った後、300K で 1 ナノ秒の MD シミュレーションを多数並列に行った。解析には Rg(回転半径)、%-stickiness(原子間近接性指標)を用いた。また RasMol による可視化を行い、 α ヘリックス含量を算出した。その結果 α ヘリックス形成傾向の高い配列について α ヘリックス含量が有意にほかの配列よりも高くなり、1 ナノ秒という短いシミュレーション時間において差が現れていることがわかった。他の構造要素についても検討し、1 ナノ秒という短時間シミュレーションの有効性について考察する。

S.Murayama, T.Mori and K.Nishigaki : Possible predictability on the stable structures of proteins based on nano-second molecular dynamics simulations