1P061

Generalized Bornエネルギーによるアミロイド形成のMDシミュレーション

○亀田 倫史 (産総研・CBRC)

生体高分子のシミュレーションをする際に、溶媒である水の効果をきちんと考慮することが重要である。しかし、粒子数が多くなるため、現在の計算機資源をもってしても計算に非常に時間がかかってしまう。2000年に入ると、溶媒効果を陰に取り込んだ近似ポテンシャルの一つである Generalized Born(GB) エネルギーを用いた MD によって、20 残基程度のペプチドを伸びきった構造から天然構造へと巻き戻らせることに成功したとの報告がいくつかのグループによってなされ、注目を集めてきた。しかし一方で、水分子を陽に含んだ場合はうまく実験結果を再現するのに、GB を用いた場合は大きく結果が異なってしまう、との報告もいくつかなされている。

昨年の年会では GB エネルギーを用いたレプリカ交換 MD 法を様々なペプチド (6 個) に対して実行することで、その有用性を検証した結果を報告した。これらのペプチドの天然構造は、それぞれ α helix (polyALA, C-peptide)、 β sheet (β -3s, betanovaFLM)、PPII helix (ALATmer, polylysine) であるが、計算で得られた構造はすべて天然構造と一致することがわかった。

溶媒近似ポテンシャルを用いることが出来れば、粒子数が大きく減るので計算速度が上がるだけでなく、溶媒分子による摩擦がなくなるので folding 自体も大きく加速されるため、かなり長い時間の経過を追うことが出来る。そこで、今回は GB エネルギーを用いて、複数個のペプチドが amyloid 様の β 構造を形成する/しないのを再現できるか、シミュレーションを行った。具体的には 12 個のペプチドを弾性体球内にランダムに配置し閉じ込めた後、100ns 間 MD 計算する。詳細は当日報告するが、現在のところ amyloid 形成するペプチド KFFE を速やかに β 構造形成させることに成功した。また、amyloid を形成しない KAAE の計算は dimer すらほとんど形成しないことを示した。

T. Kameda : Molecular dynamics simulation of amyloid forming by Generalized Born energy

1P063

バクテリオロドプシンのアルカリ化に伴う構造変化と光退色現象

○横山 泰範、園山 正史、美宅 成樹 (名大・院工・応用物理)

高度好塩菌の細胞膜上で紫膜と呼ばれる 2 次元結晶を自発的に形成するバクテリオロドプシン (bR) は、光駆動プロトンポンプとしての機能を有する。その機能は、発色団レチナールによる可視光エネルギーの吸収が引き金となり、複数の光中間体へと構造変化することにより行われる。光中間体は励起前の基底状態へ自発的に復元し、この一連の構造変化は bR の光サイクルとして知られている。近年我々は、いくつかの非天然条件下において光照射により bR の不可逆な退色が引き起こされることを報告してきた。高温の紫膜 bR では、暗中所ける変性中間状態への構造変化と光退色との関連が示され、光退色のキネティクスからは異なる安定性を持つ 2 種類の分子種の存在が示された。同様に光退色が報告されているアルカリ pH での紫膜 bR の構造変化の様子を詳細に調べたところ、pH 9 付近を境にレチナールを含む分子構造・4 次構造に変化が見られた。これらの構造変化は pH 9 付近に pKa を持つ荷電残基の脱プロトン化によるものと考えられるが、bR の構造安定性や光中間体からの復元に与える影響は不明である。そこで、アルカリ pH での紫膜 bR に対して光退色のキネティクス測定を行い、同時に暗中所での構造変化を可視吸収・CD 分光測定により観察した。暗中所・アルカリ pH においても、中性・高温で見られた変性中間状態の出現を示す可視吸収・CD のスペクトル変化が観測され、これらの変化は pH の増加に従って低温側にシフトした。キネティクス測定の結果、暗中所・光照射下ともに pH の増加による変性開始温度の低下が見られた。興味深いことに、pH 9 における光退色のキネティクスは中性 pH と同様 2 相性であったのに対し、pH 11 での光退色は単一成分によるものであった。これらの結果を基に、本年会ではアルカリ pH での構造変化がどのように構造安定性や光退色に影響するかを議論したい。

Y.Yokoyama, M.Sonoyama and S.Mitaku : Relationship between structural changes of bacteriorhodopsin upon alkalization and irreversible photobleaching

1P062

タンパク質の構造変化のメカニズムを探る: Multiple Go Model による分子動力学シミュレーション

○岡崎 圭一、古賀 信康、高田 彰二 (神戸大院・自然科学)

タンパク質がその機能を調節する際、その構造変化が重要な役割を果たしている。例えば、基質結合によって構造変化を起こし、機能を調節するタンパク質が多くある。

構造変化を考えるとときにも、フォールディングと同様にタンパク質のグローバルなエネルギー地形の特徴を記述しているファネル描像が有効であるという認識がされつつある。基質が結合することで構造変化が起きるような場合、部分的なアンフォールディングがまず起きて、その後、基質が結合した構造のファネルに従って、部分的なリフォールディングが起きる場合を想像することができる。本研究では、Go Model を拡張した "Multiple Go Model" を構築して、構造変化を記述することを試みる。ここで、"Multiple Go Model" とは、2 つの Go ポテンシャルを重ね合わせた、二状態のファネル型ポテンシャルを考えたモデルである。アミノ酸を C α 原子で近似したモデルで、温度一定の MD シミュレーションを行う。

Adenylate Kinase, S100A6、DHFR など構造変化を示すタンパク質に適用して、自由エネルギー面や構造転移の速度定数の解析を行った。Adenylate Kinase については、自由エネルギー曲線が構造変化方向の order parameter に対して線形に変化することが見出された。また、構造変化の経路、特に遷移状態、の構造的特徴をコンタクトマップなどで解析する。

K.Okazaki,N.Koga,S.Takada : Understanding protein conformational change by using Multiple Go Model

1P064

グアニジン塩酸塩存在下における大腸菌 OmpA の構造変化

○片淵 昌志、亀山 啓一、石黒 亮、高橋 元基、柏本 亜衣子、平松 宏一 (岐阜大・工)

蛋白質の立体構造の熱力学的安定性に関して、これまでに詳細な知見が蓄積されている水溶性の蛋白質に比べ、脂質や界面活性剤などの両親媒性分子の存在下で構造を形成する膜蛋白質に関する知見は極めて限られている。我々は、界面活性剤を用いて可溶化した大腸菌外膜の主要蛋白質の一つである OmpA を対象として、この膜蛋白質の構造変化の系統的な検討を行っている。本研究では、非イオン界面活性剤オクチルグルコシドを用いて可溶化した OmpA に、変性剤としてグアニジン塩酸塩を添加した際の構造変化を円偏光二色性 (CD) スペクトルの測定により検討を行い、その熱力学的安定性の評価を試みた。

[実験]OmpA は、他の外膜蛋白質を欠損した大腸菌株より単離・精製し、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いて可溶化し精製したものを、25mM オクチルグルコシドを含む 0.05M リン酸緩衝液 (pH6.9) へと溶媒交換を行った後に使用した。この溶液にグアニジン塩酸塩を添加し、近紫外部および遠紫外部 CD スペクトルを測定した。[結果と考察] 20~60℃における尿素添加の場合、遠紫外部 CD スペクトルの変化が近紫外部 CD スペクトルの変化より低い尿素濃度で起こることを過去に報告した。一方、本研究における 15℃での測定によれば、上記の報告とは逆に、近紫外部 CD スペクトルの変化が遠紫外部 CD スペクトルの変化より低いグアニジン塩酸塩濃度で起こった。このことは、OmpA の膜内在性の N 末端ドメインと水溶性の C 末端ドメインの安定性の温度依存性が明確に異なっていることを示している。これらの結果は、膜内在性部分の安定化機構を理解する上で興味深い。

M. Katabuchi, K. Kameyama, R. Ishiguro, M. Takahashi, A. Kashimoto, and K. Hiramatsu : Conformational change of E.coli OmpA in the presence of guanidine hydrochloride