1P101

プロスタグランジン D₂ 合成酵素反応機構のモデル系に関する理論的研究

○山口 直人^{1,2}、森 聖治³、高妻 孝光¹、高田 俊和⁴、坂田 文彦¹ (¹茨城大院・理工、²NECソフト、³茨城大・理、⁴NEC)

プロスタグランジン D₂(PGD₂) は、睡眠誘発、アレルギーや炎症反応を伝達する物質であり、体内での発現部位によって、生理機能が全く異なる大変興味深い物質である。したがって現在、プロスタグランジン H₂(PGH₂) を PGD₂ へ合成するプロスタグランジン D₂ 合成酵素 (PGDS) に注目が集まっている。よって、PGDS の反応機構を解明することは、居眠り防止薬やアレルギー・炎症反応の抑制薬など、将来の創薬を行うにあたって有効であることが分かる。今回、この酵素反応に関して、PGH₂ の五員環部分の 2,3-dioxo-bicyclo[2.2.1]heptane が、PGD₂ の五員環部分の 3-hydroxycyclopentanone へ異性化する過程に着目した。そこで、反応に重要であると思われる、グルタチオンと PGH₂ を、それぞれチオレートアニオンと 2,3-dioxo-bicyclo[2.2.1]heptane にモデル化した系を用いて、2,3-dioxo-bicyclo[2.2.1]heptane が、PGD₂ をモデル化した 3-hydroxycyclopentanone へ異性化する反応機構に関して理論的な検討を行った。異性化の反応経路は、脱プロトン化で活性化したチオレートアニオンが、2,3-dioxo-bicyclo[2.2.1]heptane の 2 位のエンドペルオキシド基に求核攻撃を行ってから始まる経路と、活性化したチオレートアニオンが、2,3-dioxo-bicyclo[2.2.1]heptane の 3 位のプロトンを引き抜く経路の 2 つを推定した。この経路に関して、量子化学計算から遷移状態を求め、そこから反応物方向と生成物方向へ固有反応座標解析を行い、反応物構造と生成物構造を求めた。それらの構造のエネルギーから、反応経路それぞれに対する活性化エネルギーが求まり、その活性化エネルギーを比較することによって、推定した反応経路の妥当性を検証することが可能となる。その検証による考察から、反応機構の検討を行った結果を報告する。本計算には B3LYP、BB1K、HF、MP2 法など、いくつかの方法を用いて検討した。

N. Yamaguchi, S. Mori, T. Kohzuma, T. Takada and F. Sakata : Theoretical studies on model reaction pathways of prostaglandin D₂ synthase

1P103

タンパク質 HMG-I(Y) と DNA の水を介した結合について

○濱崎 展行¹、三友 大輔¹、肥後 順一¹、山岸 明彦¹、宮川 博夫² (¹東京薬科大学、²大正製薬)

It has been believed that binding of bio-molecules, realized in enzyme-substrate or DNA-protein complexes, is controlled by a random diffusion of the bio-molecules. This implies the binding occurs by chance only when the binding sites of the bio-molecules encounter to each other with appropriate relative orientations. On the other hand, a computer-simulation work proposed another binding mechanism that the bio-molecules can approach to each other through a field, i.e., solvent site-dipole field. In this mechanism, water-molecule orientations coherently order in space between the bio-molecules even when the two bio-molecules are apart by about 20 Å to each other. Physico-chemically saying, this ordering makes the electrostatic interactions longer range than expected from a continuum theory. However, no experimental support on the existence of the solvent site-dipole field has been provided yet, because highly time-dependent measurement at an atomic resolution is required to detect the field. If two bio-molecules are known to bind experimentally and also computationally, analysis on the simulation data may provide a key to understand the binding mechanism. For this purpose, we chose a DNA-peptide complex (DNA-protein HMG-I(Y) fragment complex) for the simulation. We observed that the two bio-molecules, which were initially put apart by about 20 Å to each other in explicit solvent, bound during the simulation. The analysis showed the solvent site-dipole field mediate the binding. We will report details of the analysis.

N.hamasaki, D.mitomo, J.higo, A.yamagishi, H.miyagawa : A solvent site-dipole field mediating DNA-protein binding

1P102

マルチポイント FCCS 測定による細胞内蛋白機能解析

○高橋 保夫^{1,2}、澤田 龍治¹、斉藤 健太²、金城 政孝² (¹オリンパス・基礎技術部、²北大・電子研・超分子分光)

蛍光相互相関分光法 (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy : FCCS) は蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy : FCS) を基本概念とし、2 つの異なる蛍光分子をそれぞれのターゲット分子に標識して両者の動きの同時性を測定することによって、溶液内あるいは生きた細胞内における分子の生理的相互作用を高感度に検出できる方法である。我々は昨年の当学会にて発表したマルチポイント FCS システムの機能を発展させ、細胞内 FCCS 測定をマルチポイントで行う試作機の開発及びそれを用いた細胞内蛋白の機能解析実験を行ったので報告する。

実験はカスパーゼ 3 の認識配列をリンカー内に持つキメラ蛍光蛋白質 (GFP-mRFP) を細胞内にて発現させ、4 細胞同時の FCCS 測定によって各細胞がアポトーシスする過程でのカスパーゼ 3 活性の時間変化を追跡した。アポトーシスを誘導した細胞では時間とともに細胞萎縮などの形状変化が起こり、さらにアポトーシスの初期段階で活性化されるカスパーゼ 3 によって細胞内発現蛋白質は特異的に切断され、FCCS 測定の結果得られた相互相関値は徐々に減少する傾向が見られた。さらに各々の細胞に着目すると、細胞萎縮よりも以前にカスパーゼ 3 が活性化するがその時期は細胞によって異なり、アポトーシスによる形態変化の時期とカスパーゼ 3 の活性化時期との間に関連性が見られた。以上の結果から、マルチポイント FCCS で複数個の細胞を同時に計測することによって、各々の細胞内におけるシグナル伝達系を動的に捉えることが可能となった。

Y.Takahashi, R.Sawada, K.Saito and M.Kinjo : The analysis of protein functions in live cell by multipoint FCCS measurement

1P104

分子動力学法によるリパーゼ・エステラーゼのアシル化反応における四面体中間体のコンフォーメーション解析

○鷹野 優^{1,2}、Houk K.N.² (¹阪大・蛋白研、²UCLA・Dept. of Chem. and Biochem.)

リパーゼやエステラーゼは、種によってアミノ酸配列が大きく異なるにも関わらず、酵素-阻害剤複合体の結晶構造からホスホン酸エステルはある特定のコンフォーメーションをとる。ホスホン酸エステルのコンフォーメーションの特異性と酵素により触媒されるエステル加水分解の反応機構との関係を明らかにするため、分子動力学法を用いてリパーゼ・エステラーゼのカルボン酸エステル加水分解反応 (アシル化反応) における四面体中間体のコンフォーメーション選択性を調べ、密度汎関数法によって得られた酢酸メチルのエステル交換反応におけるコンフォーメーション選択性、ホスホン酸エステルのコンフォーメーションと比較した。

Y. Takano and K. N. Houk : Conformational preference in the tetrahedral intermediates of the acylation step of ester hydrolysis catalyzed by lipases and esterases