1P105

Calmodulin による新しい結合制御機構の解析: protein 4.1R と赤血球膜蛋白質の結合制御

○布村 渉、高桑 雄一 (東大医・医・生化)

【目的】赤血球膜骨格の要である protein 4.1 (以下 4.1R) の NH₂ 末端の 30kDa domain (R30) は、calmodulin (CaM) と Ca²⁺ 非存在下で結合する。しかし、4.1R と膜貫通蛋白質 Glycophorin C 等との結合は Ca²⁺ と CaM の複合体 (Ca²⁺/CaM) によって調節される。本研究では、R30 の CaM 結合部位を同定し、反応速度論的解析と熱量測定により結合様式を解析した。【材料と方法】R30 は、GST-fusion protein として大腸菌に発現し精製した。ペプチド (pep9、pep11 各々 17 残基) は化学合成した。CaM は牛脳から精製した。蛋白質間の結合は Resonant Mirror Detection による IAsys (Thermodynamics 社) を用い、熱量変化は VP-ITC (MicroCal 社) を用いて測定した。【結果】R30 の CaM 結合部位は、Ca²⁺ 依存性の pep9 と非依存性の pep11 の 2ヶ所が同定された。pep9 と CaM は、平衡解離定数 ($K_{(D)}$) = $\sim 1 \times 10^{-6}$ M (Ca²⁺ 存在下)、 $K_{(D)}$ = $\sim 1 \times 10^{-5}$ M (Ca²⁺ 非存在下) で結合した。pep11 と CaM は、Ca²⁺ の存在に関わらず $K_{(D)}$ = $\sim 1 \times 10^{-7}$ で結合した。Ca²⁺ 存在下では、pep11 と CaM の結合には、エンタルピー変化 -18.36 kJ/mol が測定されたが、Ca²⁺ 非存在下では両方のペプチドと CaM との結合で熱量変化は観察されなかった。【論議】CaM は、4.1R の 2ヶ所に同時に結合することにより、Ca²⁺ に依存した結合の制御をすると考えられる。【謝辞】熱量測定は、日本シーベルヘグナー 坂口安史氏、廣畑裕治氏に御協力を頂いた。

Wataru Nunomura and Yuichi Takakuwa : Novel modulation mechanism of calmodulin: modulation of protein 4.1R binding to membrane proteins by calmodulin

1P107

(Pro)caspase-3 のアクティベーター及び阻害剤との複合体の探索

○杉本 康志、宮内 梨早、津下 英明、勝沼 信彦 (徳島文理大学健康科学研究所)

Apoptosis (機能的細胞死) は病理的な条件下で起こる受動的な細胞死である Necrosis (壊死) とは異なる細胞死の形態として生理学的、または病理学的に重要な役割がある。Apoptosis を引き起こすシグナルとして増殖因子や神経栄養因子の除去、活性酸素、DNA 傷害、サイトカイン、薬物などによるストレスが主な要因となっている。勝沼等は、in vitro の活性実験において、ライソゾーム中に Procaspase-3 を活性化するタンパク質として分子量 78kDa の Lactoferrin を見出した。Lactoferrin が Procaspase-3 の構造変化を起こし、活性型の caspase-3 への自己分解が促進すると提案した。また、お茶に含まれている Epigallo-catechin gallate がマイクロモルオーダーで caspase-3 の活性を 50% 抑える事を見出した。

我々は Procaspase-3 と Lactoferrin 及び caspase-3 と Epigallo-catechin gallate の複合体での結晶化のために、Procaspase-3 と caspase-3 の精製を行った。安定な Procaspase-3 と Lactoferrin の複合体を得るために、caspase-3 の活性部位にあたる 163 番目の Cys を Ala に変異導入したベクターを用いて、大腸菌での培養により Inactive な Procaspase-3 を 1L あたり 16.17mg 精製した。大量精製後、activator である Lactoferrin との複合体による結晶化を行っている。また、活性型の caspase-3 の大量発現と精製を行い、この活性型の caspase-3 と阻害剤である Epigallo-catechin gallate との複合体による結晶化を行っている。また様々な手段を用いて、複合体を安定化する条件の検索を行っている。

Y.sugimoto, R.miyauchi, H.tsuge, N.katsunuma : Complex study of activator and inhibitor with (Pro)caspase-3

1P106

キサンチンオキシダーゼモデルの反応機構に関する理論的研究

○天野 達夫、中尾 嘉秀、佐藤 啓文、榊 茂好 (京大院工)

キサンチンオキシダーゼはプリン塩基の酸化を触媒する。本研究ではキサンチンオキシダーゼのモデルとして [Mo(-SCH=CHS-)(O)(S)(OH)]⁻、基質にはホルムアミド、実在基質キサンチンを採用し、DFT 法を用いて理論的研究を行った。ホルムアミドの酸化には、水素と水酸基が協奏的に移動する機構 (協奏機構) と、二段階で移動する機構 (逐次機構) が考えられる。協奏機構の活性障壁は約 26 kcal/mol となった。逐次機構の第一段階の障壁は約 26 kcal/mol、第二段階は約 14 kcal/mol となり、障壁の高さは協奏機構とほぼ等しい。従ってこの酸化反応は協奏機構、逐次機構の双方で進行すると考えられる。一方、キサンチンの場合、協奏機構の障壁は約 26 kcal/mol であるが、逐次機構では第一段階の障壁が約 31 kcal/mol となった。従って実在基質は中間体を経ずに酸化されることが示された。また、プテリン補因子は簡略化してもほぼ同じ構造変化、エネルギー変化で反応が進行することから (Figure 参照)、プテリン補因子は酵素反応に対して電子的に寄与していないことが示された。さらに、DFT 法と古典的力場を組み合わせた方法を用い、タンパク質の影響を検討した結果も発表する。

Figure. Transition state of xanthine oxidation reaction in the concerted mechanism. In parenthesis are geometrical parameters for the simple model system.

T.Amano, Y.Nakao, H.Sato and S.Sakaki : A Theoretical Study of Reaction Mechanism by Xanthine Oxidase Model

1P108

ATP 依存でのタンパク質のアンフォールド・トランスロケーション: ミニマルモデルシミュレーションによるそのメカニズムの理解。

○竹内 晋司¹、高田 彰二^{2,3}、古賀 信康¹、小林 千草² (¹神戸大・自然、²神戸大・理、³CREST・JST)

細胞内に存在する ATP 依存性プロテアーゼは、プロテアーゼドメインリングと ATPase ドメインリングが会合した構造を持ち、不要な蛋白質を分解する他、短寿命調節蛋白質を特異的に分解し、細胞機能を調節する。基質蛋白質は ATPase ドメインで ATP 依存的にアンフォールドされ、ATPase リング中央の孔を通過し、プロテアーゼチャンバーに送り込まれ (トランスロケーション) 分解される。結晶構造解析や様々な実験によりドメイン中のアンフォールド、トランスロケーションに関する重要な部位の特定や、いくつかのモデルが提唱されているが、ATPase ドメインによる基質蛋白質のアンフォールディング、トランスロケーションの詳細な機構は明らかではない。この機構を理解するため、「ATP の結合・加水分解に伴う ATPase ドメインの立体構造変化で、ドメイン内の疎水性領域の変化が起こり、その結果、基質蛋白質がアンフォールド・トランスロケーションされる」という結晶構造解析を元にした仮説をもとにシミュレーションを行なった。ATPase ドメインのモデル化は、1) 結晶構造をもとに「ラッパ型」に近似し、2) ラッパ上の基質蛋白質の入り口、中ほど、出口の円周上に疎水性領域を設置する。3) そして、疎水性領域の疎水性の強さを時間と共に変化させることにより表現した。基質蛋白質には、1つの残基を1つの球とみなし、蛋白質の天然構造のエネルギーを最小とする、郷モデルを用いた。基質タンパク質 (例えば natively-fold, natively-unfold, small peptide) の違いや、ラッパ上の疎水領域の変化の仕方の違いなど、様々な条件下でシミュレーションを行い、それぞれの条件下での基質タンパク質の振る舞いを元に、タンパク質のアンフォールド・トランスロケーションについて考察する。

S.Takeuchi, S.Takada, N.Koga, C.kobayashi : Understanding the Mechanism of ATP-dependent protein unfolding and translocation by the Molecular Dynamics Simulation.