3P157

分子動力学シミュレーションによるシトクロム c₅₅₁ の構造安定性に関する研究

○杉山 歩、高松 佑一郎、西川 佳吾、長尾 秀実、西川 清 (金沢大・院自然・数物科学)

シトクロム c₅₅₁ はニトリトリダクターゼ (NIR) の電子供与体として、生体内において電子伝達を担うヘム鉄タンパク質である。また、銅含有タンパク質アズリンと共に生体内での電子伝達の機能を持ち、アズリンとの間には電子の授受があるとされることから、アズリン、シトクロム c 複合系でのシミュレーションは興味深い。我々はこれまでに酸化型アズリンに対する分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、その結果からアズリン反応活性部位付近は溶媒中では 2 種類の安定構造を持つことなどを見出した [2]。そこで、本研究ではまずシトクロム c 単体系での MD シミュレーションを行った後に、アズリン、シトクロム c 複合系での MD シミュレーションを行うことで、これら複合系の特徴を考察することを目的とし、研究を進めた。本研究では、X 線構造解析によって決定された *Pseudomonas aeruginosa* 由来の還元型シトクロム c₅₅₁ の構造 (PDBID:451C)[1] を用い、溶媒中での MD シミュレーションを行った。力場には Amber03 力場を使用し、活性部位付近の力場及び電荷については活性中心とその配位残基からなるクラスターモデルに対する密度汎関数計算 (UB3LYP/6-31G**) から決定したものを使用した。シトクロム c 単体系および、アズリン、シトクロム c 複合系、それぞれの系での自由エネルギーを見積もり、シトクロム c 単体系から複合系への自由エネルギー変化、また、複合系での MD シミュレーションの初期配置を変えることによる自由エネルギーへの影響の比較などを通し複合系の安定性を考察した。その他、シトクロム c₅₅₁ の対する酸化還元電位等の解析は現在行なっており、発表ではこれらも合わせて報告する。

[1] Y. Matsuura et al., J. Mol. Biol., 389-409, (1982) 156

[2] A. Sugiyama et al., Int. J. Quantum. Chem., in press, (2005)

A. Sugiyama, Y. Takamatsu, K. Nishikawa, H. Nagao, K. Nishikawa : Molecular dynamics study of structural stability of Cytochrome c₅₅₁

3P159

大脳皮質ニューロン移動に「パネの力」が使われる可能性：神経前駆細胞の突起はよじれかつ引っ張られている

○宮田 卓樹 (名大院・医学系・細胞生物)

私は、脳組織の建築原理を理解することを目指し、前駆細胞が保有する三次元的形態および極性に注目してライブ観察を行っている。散発的に蛍光 (脂溶性色素 DiI) 標識を施した胎生 13-15 日目マウス大脳皮質原基 (0.1-0.3 mm 厚) のスライス培養により、これまでに (1) 前駆細胞が脳室面で分裂する際に突起 (0.1-0.3 mm 長、脳室面から脳膜面まで達する) を娘細胞のうちの片方に譲渡する、(2) 脳室面で誕生する娘細胞のうちやがて前駆細胞体トリートリー (ventricular zone = VZ) から去るべき細胞たち (ニューロンとニューロン作り専門の前駆細胞) がそのような脳膜側突起を相続することが珍しくない、(3) 脳膜側突起を相続した VZ 離脱予定娘細胞たちは初めその核を相続突起に潜り込ませるとともに脳室側の突起を形成しながら細胞体を脳室面から遠ざけるので彼らの母細胞 (が細胞周期の間期にある時) と同じ双極型をしているが、数時間ないし 10 時間ほどで脳室側突起を虚脱させて単極型 (脳膜面にのみつながる) に変わり VZ を去る、と分かった。今回、この突起相続娘細胞の「双極型→単極型」変化に際して相続突起部分にヘアピンループ様の突出部やコイル状の構造が頻繁に出現することをまず示す。シリコンチューブやプラスチックフィルムなどを用いたシミュレーションを通じて、「前駆細胞および双極型状態の VZ 離脱予定娘細胞の脳膜側突起部分がよじれかつ受動的に伸長されており、この物理的作用が脳室側突起の虚脱によって解放される時にコイルなどの特徴的形態変化が生じる。つまり VZ 離脱予定娘細胞は、脳膜側突起の構造 (核挿入用トンネル的) のみならず突起の横弾性に依存する『ねじりパネ』の復元力をその細胞体移動の駆動力として相続している」との仮説を持つに至った。突起切断実験、細胞骨格阻害実験、前駆細胞の突起新生の観察を行っている。

T.Miyata : Springiness caused by twisting and a stretch of neural progenitors' processes may help migration of process-inheriting daughter neurons

3P158

NeuroD2 発現制御系を用いた ES 細胞から神経細胞への分化制御の研究

○杉本 安隆、古野 忠秀、中西 守 (名市大院・薬)

NeuroD2 は神経細胞への分化に伴って発現する転写因子で、神経の成熟と生存に関与している。現在、ES 細胞を神経細胞へ分化させるには、ES 細胞を凝集させて胚様体を形成させた後、レチノイン酸を添加する方法が主流である。しかし、胚様体は三胚葉構造を形成するため、レチノイン酸によって分化誘導したときに中胚葉や内胚葉由来の細胞が混入するという問題点があった。最近、EC 細胞に NeuroD2 を過剰発現させると、細胞を凝集させることなく、また、レチノイン酸を用いることなく EC 細胞が神経細胞へ効率よく分化することが報告され、NeuroD2 が神経分化誘導活性をもつことが示唆された。NeuroD2 をはじめ発生、分化に関与する遺伝子の発現は発生の進行に伴い時間的、量的に複雑に制御され、正常な個体形成に寄与している。そこで NeuroD2 の発現時期、発現量を制御すれば ES 細胞を胚様体を経由せずにより効率的に神経細胞へ分化させることができるのではないかと考え、NeuroD2 の発現制御系 (Tet-On System) を構築し効率的に神経細胞へ分化させることを試みた。

これまでのところ NeuroD2 を ES 細胞へ過剰発現させると、NeuroD2 の発現に伴い神経細胞のマーカー蛋白質である MAP2 の発現量が増加することが分かり、胚様体を経由せずに ES 細胞を神経細胞へ分化誘導することが可能であることが分かった。現在 Tet-On System を利用して、NeuroD2 の発現を厳格に制御できる ES 細胞を構築している。本発表では NeuroD2 の発現時期及び発現量と神経細胞への分化の相関関係を報告する予定である。

Y.Sugimoto, T.Furuno and M.Nakanishi : The relation between the expression of NeuroD2 and the differentiation into neuron in embryonic stem cells

3P160

分子動力学シミュレーションで観る F₁-ATPase・β サブユニットの構造の性質

○中尾 正治^{1,2}、洲上 壮太郎^{1,2}、木寺 詔紀¹、池口 満徳^{1,2}
(¹横浜市大・院国際総合科学・生体超分子、²CREST・科学技術振興機構)

F₁-ATPase の β サブユニットは、その構造変化が F₁ モーターの機能の核となっているため、原子レベルで詳細かつ具体的な研究が行われている。以前の研究で、基質非存在下で open 構造をとったウシ・ミトコンドリア由来の β サブユニット単体について、12.5 ns の分子動力学シミュレーションが行われた結果、基質が存在しなくても open 構造から自発的に closed 構造へと構造変化する様子が観測された¹。一方、好熱菌由来の β サブユニット単体の構造を溶液 NMR によって解析したところ、基質非存在下では open 構造を安定にすることが明らかになった²。

我々は、両者の結果の相違の原因を検証するために、好熱菌由来、およびウシ・ミトコンドリア由来の F₁-ATPase の両方について、基質が結合しておらず、open 構造をとっている β サブユニット単体を初期構造として、水を陽に含んだ長時間の全原子分子動力学シミュレーションを行った。分子動力学プログラムとして当研究室で開発された MARBLE を使用し、力場は主鎖 2 面角の成分が改良されたポテンシャル、CHARMM22 CMAP を用いた。また静電気力は Particle Mesh Ewald 法を用いた。以上の条件で等温等圧 (NPT) アンサンブルで前述の計算より十分長い 100 ns のシミュレーションをそれぞれについて行い、得られたトラジェクトリを基にして、それぞれの β サブユニットの構造変化について、詳細な解析を行った。その結果、100 ns のシミュレーションを通して、open 構造から closed 構造への自発的な移行は起こらないことが確認できた。解析の詳細については当日発表する。

¹Bockmann et al., *Biophys. J.*, **85**, 1482-1491 (2003)

²Yagi et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16632-16638 (2004)

M. Nakao, S. Fuchigami, A. Kidera and M. Ikeguchi : Molecular dynamic simulations of isolated beta-subunit of F₁-ATP synthase