

研究課題別評価

1 研究課題名： 水和情報を取り入れた蛋白質相互作用解析法の確立

2 研究者氏名： 伊倉 貞吉

3 研究の狙い：

蛋白質-蛋白質相互作用は、蛋白質の機能発現に必須の過程であり、その相互作用機構の解明は生物化学をはじめ周辺領域においても重要な問題となってきた。蛋白質のほとんどは細胞質等の水溶液中で機能するので、一般の分子やイオンなどと同様に常に水和しており、蛋白質間の相互作用もまた少なからず水和の影響を受けている。本研究では、このように蛋白質の機能に深く関わる水和に注目し、蛋白質間の相互作用における水和水の挙動を実験と計算機シミュレーションにより解析し、水和水を仲立ちとした蛋白質間の相互作用を解明することを目指した。また、水和情報を積極的に活用することにより、これまで定性的な議論しかできなかった相互作用予測法を定量的な評価が可能なものへと発展させられるのではないかと考え、新たな蛋白質間相互作用予測法の開発を行った。

4 研究成果：

(1) 蛋白質相互作用に伴う水和・脱水和の実験及び計算機シミュレーションによる解析

蛋白質間相互作用に伴う水和水の挙動を、バルナーゼとバルスターの相互作用をモデルとして解析した。既知の結晶構造によれば、両蛋白質とも複合体形成の前後でほとんど構造変化しないので、この系は水和状態の変化だけを解析するのに最適なモデルであると考えた。本研究では、まず、低温 X 線結晶構造解析法を用いて、バルナーゼとバルスターの複合体形成前後での相互作用界面の水和状態の比較を行った。解析の結果、バルナーゼの結合界面に存在する水和水のほとんどが複合体形成前後も保存されていること、複合体形成前の構造で温度因子が低い水分子のほうに複合体形成前後も水和している場合が多いことなどが明らかになった。また、計算機シミュレーションによる解析から、結合界面には結晶構造解析で検出された数の2倍を超える水分子が存在し、複合体形成に伴う脱水和はそのうちの 40%にも満たないことが明らかになった。水分子と蛋白質との相互作用の多くは寿命が短かったが、比較的寿命の長いものは、実験で検出された水和水と極めてよい一致を示した。さらに、水和水の中には、複合体形成後の方が複合体形成前よりも安定した水和を形成するものが多数存在することがわかった。これらの水和水は水素結合ネットワークによって蛋白質間の相互作用を仲介していた。このことは、蛋白質間相互作用における水和水分子を介した間接的な相互作用の重要性を示している。

(2) 蛋白質の結合自由エネルギーにおける水和の寄与の定量的解析

蛋白質間相互作用を解析するには、蛋白質間の直接的な相互作用だけでなく、水和水を介した間接的な相互作用も考慮する必要があることが明らかになったため、それぞれの相互作用の寄与を実験から見積もった。本研究では、相互作用界面の水和状態の変化が結合自由エネルギーに及ぼす影響を解析することにより、直接的及び間接的な相互作用のそれぞれの平均的な寄与を求めた。引き続きバルナーゼとバルスターの相互作用をモデルに、相互作用界面のアミノ酸残基に変異を導入することで水和状態を変化させた。変異に伴う結合自由エネルギーの変化は表面プラズモン共鳴法で、また、変異体の複合体構造を X 線結晶構造解析によりそれぞれ決定した。変異はバルスターの4つのアミノ酸残基(D35、D39、E76、E80)に対して導入し、それぞれをアラニンに置換した。実験データに基づきバルナーゼとバルスターの相互作用を解析すると、相互作用に対する寄与の大きな因子として蛋白質間の直接的な相互作用、水和水を介した間接的な

相互作用、水分子の相互作用界面内への侵入或いは排除の効果の 3 種類が考えられ、それぞれ一個の相互作用あたり 2.5 kcal/mol、1.0 kcal/mol、-0.5 kcal/mol(侵入)と見積もることができた。

(3) 蛋白質相互作用の定量的予測法の開発

蛋白質相互作用の定量的予測法の開発のための第一段階として、「既に相互作用をすることが知られている2つの蛋白質に対して、アミノ酸の変異に伴って相互作用がどの程度変化するかを定量的に予測する」という問いに対する回答を得ることを目標に方法論の開発を行った。ここでもバルナーゼとバルスターの相互作用をモデルとして用いた。結晶構造未知のバルスターの変異体 D39A とバルナーゼとの複合体の水和構造を予測するとともに、その予測構造に基づき野生型に対する相互作用自由エネルギー変化を-6.5 kcal/mol と見積もった。この値は、表面プラズモン共鳴法で求めた実験値-6.0 kcal/mol と 10%以内の差で一致しており、本方法論の実用性が期待できることを示していた。その後、バルスター-D39A の複合体の結晶構造を決定したところ、分子動力学シミュレーションの予測構造とよく一致していることがわかった。

5 自己評価:

これまで重要性が認識されながらも、解析の困難さゆえにほとんど手がつけられていなかった蛋白質相互作用における水和の寄与を、本研究で、限定された環境下ながらも定量化できたことの意義は大きい。これにより、蛋白質相互作用の定量的解析及び予測法の開発への可能性を見出すことができた。現状ではひとつのモデル系での成功に留まっているが、より一般的な系への対応を目指していく必要がある。

当初は、バルナーゼ、バルスター、及び、それらの複合体の X 線結晶構造解析がもっと迅速に進むと期待していたが、変異体ごとに結晶化条件や結晶の質が変わるなど、結晶化の段階で予想以上に時間を消費してしまった。方法論の一般化も計画していたのだが、そこまで手が回らなくなったことが悔やまれる。

6 研究総括の見解:

蛋白質相互作用への水和の影響は大変重要な課題であり、そこに着眼して地道に研究を進め、限定された環境下での定量化を行ったことは評価する。しかしこの分野は問題の重要性故に多くの研究者が多様な研究を展開している。その中でよい成果を挙げるためには、独自の視点をしっかり持ち、研究遂行上で現れる様々な問題を高い集中力で克服していかなければならない。いっそうの努力をして、高いレベルの成果を挙げて欲しい。

7 主な論文等:

論文

Ikura, T., Urakubo, Y., Ito, N. (2004). Water-mediated interaction at a protein-protein interface. *Chemical Physics*, 307, 111-119.

招待講演

Ikura, T. (2004) Effects of hydration on protein-protein interaction. Keihanna Conference of Molecular Biophysics, KSMB2004(Keihanna Symposium of Molecular Biophysics), "Physical Aspects of Protein Folding and Function", 6-8 January, Kyoto, Japan.

学会発表等

国際 2 件
国内 5 件

結晶構造登録 6件