

フィブロネクチン分子由来インテグリン 機能抑制性ペプチドの相互作用部位の予測

近藤 洋介[†] 権 娟大^{††} 宮崎 智^{††}

フィブロネクチンは細胞機能発現のための足場を構築するタンパク質であるが、フィブロネクチンの 22-mer のフラグメント FNIII14 は足場への接着を媒介する分子インテグリンの機能を抑制する。最近、タンパク質翻訳伸長因子 eEF1A (Eukaryotic Elongation Factor 1A) が FNIII14 の細胞膜受容体であることが示唆された。eEF1A は細胞質でペプチド鎖伸長に関わる因子であり、細胞膜上での機能はあまり知られていない。細胞膜上での eEF1A の機能を解明すれば、細胞接着を介した細胞制御機構の全容解明のための基礎を提供できるかもしれない。そこで、本研究では、FNIII14-eEF1A 相互作用部位の決定を目的とする。相互作用残基特定のため、eEF1A のアミノ酸残基全てに対して変異実験を行うことは効率的でない。そこで、本研究では、計算化学的手法と配列進化解析手法を組み合わせ、FNIII14-eEF1A 相互作用部位を予測する。予測の結果、FNIII14-eEF1A 相互作用残基の候補が得られた。

Interaction site prediction of a peptide which derives from fibronectin and inhibits integrin

Yosuke Kondo[†], Yeondae Kwon^{††} and Satoru Miyazaki^{††}

Fibronectin (FN) constructs an anchorage for expression of cellular functions but a 22-mer fragment of FN, termed FNIII14, inhibits integrin-mediated cell adhesion to FN. Recently, eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) is suggested as a membrane receptor for FNIII14. Although a primary function of eEF1A is to elongate peptide chains in cytoplasm, the function in cellular membrane is not familiar. If we shed light on the function of eEF1A in cellular membrane, exhaustive elucidation of a basic mechanism of cellular control mediated by cell adhesion will be able to expect. In this work, our aim is to decide the FNIII14-eEF1A interaction site. It is not efficient to experiment all residues to specify the interaction site by amino acid mutational analysis. Then, we predict the FNIII14-eEF1A interaction site by a combinational method of computational chemistry and sequence evolutionary analysis. As experimental results, we narrowed down the residues of the FNIII14-eEF1A interaction site.

1. 背景・目的

細胞の増殖、分化、移動、生死および遺伝子発現などの機能発現は、細胞外マトリックス (Extracellular Matrix, 以下 ECM) への接着により調節されている[1]. 固形組織を構成するほとんど全ての正常細胞は、ECM から脱着すると増殖休止期に入るか死に至る。ECM は細胞の機能発現の足場を提供し、細胞-ECM 間の接着による細胞制御は足場依存性制御と呼ばれる。細胞膜には足場への接着を制御する受容体、インテグリンがある。細胞がインテグリンを介して ECM と結合すると、インテグリンの細胞内ドメインでは細胞骨格系が構築されると共に、シグナル分子の活性化が起こる[2]. インテグリン下流のシグナル分子群が活性化すると、増殖因子により生じるシグナルと協調し、細胞の生存および増殖に繋がるシグナルへと変換される。インテグリンは ECM と結合することでコンフォメーションを変化させ、ECM に対して親和性の異なる活性化状態をとることが知られているが、インテグリンの活性調節機構には未だ不明な点が多い[3].

フィブロネクチン (Fibronectin, 以下 FN) は多くの細胞に対して接着の足場を提供する代表的な ECM タンパク質である[4]. FN は 3 種類ある繰り返し単位で構成され、それぞれの単位毎に配列の N 末端から順番に番号が付けられる。7-10, 12-14 番目の FN タイプ III リピートの 3 次元立体構造が解明され、FN のインテグリン結合部位の立体構造が明らかにされている[5].

近年、FN にはインテグリン結合部位に加えて、インテグリン活性を抑制する機能部位も存在することが明らかにされた[6]. 14 番目の FN タイプ III リピート中に存在する YTIYVIAL 配列を含む 22-mer のペプチド FNIII14 (TEATITGLEPGTEYTIYVIALC) は、インテグリン活性化の阻害によりインテグリンシグナルを遮断する。FNIII14 は、アポトーシス誘導作用、悪性腫瘍細胞の転移抑制作用があり、細胞の病態生理に大きな影響を与える[7][8]. 接着を介した細胞制御機構を統一的に理解するため、接着の負の調節因子である FNIII14 の作用発現機序の解明は極めて重要である。

いくつかの研究結果から、FNIII14 の作用発現は細胞膜上に存在する受容体を介していると推測されていた。最近、FNIII14 結合性膜タンパク質の内部配列が決定された結果、タンパク質翻訳伸長因子 eEF1A (Eukaryotic Elongation Factor 1A) であることが示唆された。eEF1A は、タンパク質の翻訳過程において、GTP (Guanine Triphosphate) 依存的にアミノアシル tRNA をリボソームの acceptor 部位に運搬する役割を担う[9]. tRNA の運搬機能を持つタンパク質は、極めて保存性が高く、真正細菌、古細菌およ

[†] 東京理科大学 薬学部 薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

^{††} 東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科

Department of Medical and Life Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

び真核生物でそれぞれ EFTu, aEF1A および eEF1A と呼ばれる。高等な真核生物は、GTP 結合親和性が異なる eEF1A として eEF1A1 および eEF1A2 を持つが、両者は FNIII14 の細胞膜受容体として機能することが示唆されている。酵母 eEF1A の 3 次元立体構造が解明されており、eEF1A の 3 種類の立体構造ドメインのドメイン 1 に GTP 結合部位がある[10]。近年、eEF1A は細胞骨格系を構成するアクチンの束化に関わることなどが報告され、多機能なタンパク質であることが判明している[11]。細胞接着を介した細胞制御機構の全容解明のため、細胞膜上での eEF1A の機能解明が望まれる。

本研究では、FNIII14-eEF1A 相互作用部位の決定を目的とする。FNIII14 は C 末端側の YTIYVIAL にインテグリン機能抑制部位がある[12]。また、eEF1A はドメイン 3 に FNIII14 との相互作用部位があることが示唆されている。相互作用残基特定のため、eEF1A のドメイン 3 のアミノ酸残基全てに対して変異実験を行うことは効率的でない。そこで、本研究では、計算化学的手法と配列進化解析手法により、FNIII14 と eEF1A の相互作用部位の予測を試みた。

2. 手法

2.1 計算化学的手法

計算化学的手法である分子動力学 (Molecular Dynamics, 以下 MD) 法により、FNIII14-eEF1A 複合体の動的構造を解析する。

MD 法は、古典力学におけるニュートンの運動方程式に従った分子の運動を初期条件のもとにシミュレートする方法である。N 個の原子からなる系のニュートンの運動方程式は、

$$m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = F_i(t) \quad (i = 1, 2, \dots, N) \quad (1)$$

で表される。ここで、 m_i , r_i はそれぞれ原子 i の質量および位置ベクトル、 F_i は原子 i が他の原子から受ける力である。式 (1) を時刻 t について積分すれば、任意の時刻での原子の位置を求められるが、 $F_i(t)$ が複雑な関数の場合は r_i について解くことは困難である。そこで、式 (1) を数値解法により解く。時刻 t に対して Δt 前および後の位置 $r_i(t \pm \Delta t)$ のテイラー展開を Δt^3 まで行うと、

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + r_i(t)\Delta t + \frac{1}{2} \ddot{r}_i(t)\Delta t^2 + \frac{1}{6} \dddot{r}_i(t)\Delta t^3 + O(\Delta t^4) \quad (2.1)$$

$$r_i(t - \Delta t) = r_i(t) - r_i(t)\Delta t + \frac{1}{2} \ddot{r}_i(t)\Delta t^2 - \frac{1}{6} \dddot{r}_i(t)\Delta t^3 + O(\Delta t^4) \quad (2.2)$$

となる。式 (2.1), (2.2) の両辺を加え、式 (1) を用いると、

$$r_i(t + \Delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{1}{m_i} F_i(t)\Delta t^2 + O(\Delta t^4) \quad (3)$$

となる。式 (3) は、原子 i の、現在の位置および力、 Δt 前の位置から、 Δt 後の位置が求まることを示す。 Δt^2 までの項を用いて、予め決めておいた初期位置と速度から、式 (1), (2.1) より $r_i(t + \Delta t)$ を求める。後は逐次、式 (3) を用いて Δt ごとの原子の位置を求めることができる。MD 法では、初期位置によりその後の位置は逐次的に決まるため、N 個の原子の初期位置である初期構造を適切に決める必要がある。

F_i は分子の持つエネルギーを位置で微分することで得られる。分子のエネルギーはシュレーディンガーの波動方程式を解くことで得られるが、N が大きい場合は計算量が膨大である。そこで、原子の種類や結合様式によって決まる定数と、原子間の距離や角度などを変数とするポテンシャルエネルギー (Potential Energy, 以下 PE) 関数 V を仮定する。 F_i は V を位置で微分し、

$$F_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} V(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (4)$$

と求める。 V はいくつかの PE の総和であると考え、

$$V = V^{\text{bond}} + V^{\text{angle}} + V^{\text{dihedral}} + V^{\text{vdW}} + V^{\text{elec}} \quad (5)$$

となる。ここで、 V^{bond} , V^{angle} および V^{dihedral} は共有結合項であり、それぞれ結合、結合角および二面角による PE である。 V^{vdW} および V^{elec} は非共有結合項であり、それぞれ van der Waals (vdW) 相互作用および静電相互作用による PE である。分子間相互作用の解析のためには、非共有結合項が重要である。vdW 相互作用による PE は、

$$V^{\text{vdW}} = \sum_{i=1}^N \sum_{j<i}^N \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \quad (6)$$

の 12-6 レナードジョーンズポテンシャルにより求める。ここで、 A_{ij} および B_{ij} は原子 i, j によって決まる定数である。静電相互作用による PE は、

$$V^{\text{elec}} = \sum_{i=1}^N \sum_{j<i}^N \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right) \quad (7)$$

のクーロンポテンシャルにより求める。 q_i , q_j および ϵ はそれぞれ原子 i, j の電荷および誘電率である。式 (6), (7) の定数をアミノ酸残基の構成原子毎に与えることで、電子間反発力, vdW 力, クーロン力および水素結合などのタンパク質間の相互作用を形成する力を、原子間の距離に基づいて求めることができる。

MD 法では、原子の位置や速度の調節により、系の圧力や温度を制御できる。また、系に水分子を加えることにより、水環境中での分子の動的構造をシミュレーションすることができる。MD 法により現実の系に近い状態の分子構造のゆらぎが求まり、構造のゆらぎを統計的に扱うことにより、熱力学的な物理量が求まる。また、構造のゆらぎを数量化することで、複合体構造間の相互作用の解析が可能である。

2.2 配列進化解析手法

配列進化解析手法である進化トレース (Evolutionary Trace, 以下 ET) 法により, eEF1A の保存された残基を特定し, eEF1A の機能部位となる残基を予測する。

ET 法は, マルチプル配列アラインメント (Multiple Sequence Alignment, 以下 MSA) サイトを解析し, 保存されたサイトを特定する手法である[13]. ET 法では, タンパク質の機能部位として 2 種類のサイトを考える. 1 つ目が保存サイトで, 進化の過程で機能に差異が生じなかったサイトである. 2 つ目がクラス特異的サイトで, 進化の過程で機能に差異が生じたサイトである. クラス特異的サイトについては, 進化の過程でより長く保存されてきたサイトをより重要であると考えられる。

ET 法の手順について図 1 を用いて説明する[14].

1. 解析対象のアミノ酸配列と相同な配列の MSA を行う.
2. MSA に基づき, UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) 法により進化系統樹を作成する.
3. 進化系統樹を任意のパーティションで区切り, 配列をクラスに分ける. 配列の機能の差異がわかっている場合は, 差異の生じたところで進化系統樹を区切る. 配列の機能の差異がわからない場合は, いくつかのパーティションを用いて区切る.
4. 各々のクラスに対してコンセンサス (Consensus, 以下 CNS) 配列を求める. CNS 配列は, MSA のある 1 つのサイトについて, 全て同じ文字だった場合はその文字, 1 つ以上の異なる文字が含まれていた場合は“.”として求める. このとき, ギャップを表す“-”もアミノ酸を表す文字と同様に扱う.
5. それぞれの CNS 配列から ET 配列を求める. ET 配列は, CNS 配列のある 1 つのサイトについて, 全て同じ文字だった場合はその文字, 1 つ以上の異なる文字が含まれていた場合は“X”, 1 つ以上の“.”が含まれていた場合は“-”として求め, それぞれを, 保存サイト, クラス特異的サイト, 中立サイトとする.

上記の手順 4, 5 に関しては, パーティション毎に繰り返すことでパーティションに依存しない, クラス内では一意となりクラス間では相違があるサイトを選出する。

ET 法による解析で, 解析対象のアミノ酸配列の保存サイトおよびクラス特異的サイトの残基であるトレース残基 (Trace Residue, 以下 TR) を求めることができる. MSA を行った配列の中に, 立体構造が既知の配列が含まれていた場合は, TR の 3 次元立体構造上の位置を特定できる. TR が立体構造表面である場合は他の分子との相互作用に重要で, 特に, TR が立体構造上でクラスターを形成していた場合は相互作用部位であると予測が可能である. 一方, TR が立体構造内部である場合は立体構造を形成するために重要であると考えられる。

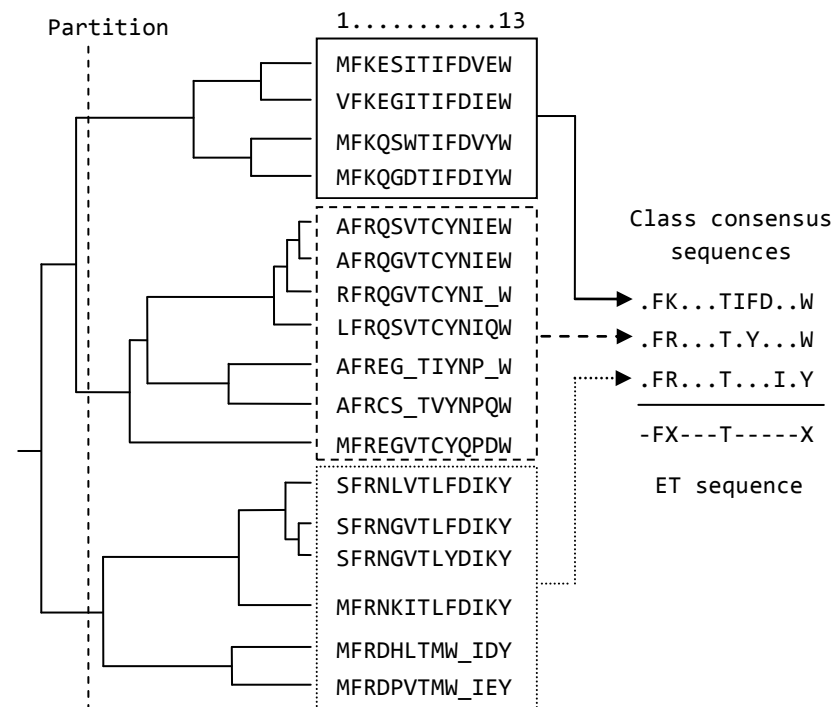


図 1 ET 法の手順

ET 法による解析では, アミノ酸配列のデータセットが必要になる. データセット中に, 解析対象のオーソログおよびパラログのアミノ酸配列を含めて解析すれば, オーソログとパラログの機能の差異を解析することが可能である. また, データセットの配列は慎重に選定する必要がある, データセットを誤ると機能部位である残基を見逃してしまう可能性がある. データセット中には, フラグメント, 偽遺伝子および挿入配列を含む配列は含めないほうが良いと考えられる. フラグメント配列があると, 実際はアミノ酸が存在するはずのサイトが MSA のときにギャップとなり, パーティションでいくつかのクラスに分けたときに正しい CNS 配列が求められない. 偽遺伝子があると, 偽遺伝子は生体内で機能していない遺伝子であるので, 機能部位の残基が変異を起こしている可能性があり, 機能部位の残基を特定できない. 挿入配列を含む配列があると, 挿入配列を含む配列は他の配列との進化距離が遠くなり, 進化系統樹が実際の系統関係を表せず, 配列の機能の差異を正しく解析できないことが考えられる。

3. 実験

3.1 初期構造

MD 法により, FNIII14-eEF1A の相互作用を解析するには, FNIII14-eEF1A 複合体の初期構造が必要である. 初期構造は以下の手順で求めた.

1. FNIII14, eEF1A それぞれの立体構造予測

FNIII14 は, PDB (Protein Data Bank) に登録されている FN の立体構造データを編集し, FNIII14 に相当する構造を用いた. eEF1A は, ヒト eEF1A1 の構造を, 酵母 eEF1A を鋳型として, ホモロジーモデリング法により予測した. なお, 立体構造の表示, 編集および予測は Discovery Studio 2.5.5 を用いて行った[15].

2. ドッキングシミュレーションによる複合体構造予測

FNIII14-eEF1A1 複合体構造をタンパク質ドッキングアルゴリズム ZDOCK 3.0 を用いて予測した[16]. ZDOCK は分子を剛体モデルとして扱い, 高速フーリエ変換を用いて 2 分子間の並進と回転の 6 次元空間を網羅的に探索する. それぞれの分子の 3 次元構造はグリッドに分けられ, グリッド毎に値が割り当てられる. 一方の分子を固定し, 他方の分子の並進と回転をしてグリッドを重ね合わせる. 重なり合ったグリッドの値を掛け合わせるによりスコアを求める. ZDOCK のスコアリングは, 形の相補性, 脱溶媒和および静電気力に基づく. 複合体全体に対してスコアを求め, スコアが良い複合体から順番に並べる.

グリッドの数, 幅および分子の回転角をそれぞれ $128 \times 128 \times 128$, 1.2 \AA および 6° として, ZDOCK を用いたドッキングシミュレーションを行った. eEF1A1 を固定し, FNIII14 の C 末端側にあるインテグリン機能抑制部位の周囲のみをドッキング部位として, FNIII14 の並進と回転を行った. ドッキング部位を変えて 2 つの実験を行い, 実験 1 では eEF1A1 のドメイン 3 に限定し, 実験 2 では eEF1A1 のドメイン 3 とその境界領域に限定して予測した.

3. 複合体への水素原子および水分子の付加とエネルギー最小化

水環境中での FNIII14-eEF1A1 複合体の動的な構造を解析するため, 複合体に水素原子, 複合体周囲に水分子を付加した. 剛体モデルを用いて複合体構造の予測を行ったことや複合体に水素原子を付加したことにより複合体構造には構造的なひずみが含まれる. 構造的なひずみがあると, MD 法による解析で大きな反発力が働くために構造が壊れる可能性がある. 原子間の反発力を抑えるため, MD シミュレーションの前に PE 関数が極小となる構造にする. 水分子を付加した FNIII14-eEF1A1 複合体のエネルギー最小化を, AMBER 9 を用いて行った[17].

3.2 MD 法

初期構造について AMBER 9 を用いた MD 法により解析した. タンパク質の MD シミュレーションにおいて, ニュートンの運動方程式の数値解法による打ち切り誤差, 計算機による丸め誤差および最も速い運動である水素原子の伸縮運動の周期を考えると, 時間刻みは $0.5 \sim 1.0 \text{ fs}$ が適切な値であるが, 計算の効率化のため, SHAKE 法により水素原子の結合を拘束し, 時間刻みは 2.0 fs として解析を行った.

初期構造は原子の速度が 0 であるため系の温度が 0 K であり, FNIII14-eEF1A1 複合体の動的な構造を解析するには, 系の温度を上げる必要がある. 急激に温度を上げると構造が壊れる可能性があるため, 複合体は拘束し, 10 ps の MD シミュレーションの間に徐々に 300 K まで系を昇温した. 10 ps の MD シミュレーションの後には系の温度が 300 K 付近になったので, 複合体の拘束を解き, 6 ns の MD シミュレーションを行った. MD シミュレーションの最初の方の構造は, 不安定な構造であると考えられるため, 最後の 4 ns から 10 ps 毎に複合体構造を取り出し解析データとした.

FNIII14 の原子から 3.1 \AA 以内に 1 つ以上の eEF1A1 の原子が含まれていれば, その原子の属する残基が相互作用しているとみなし, 解析データの全コンフォメーション中 80% 以上で相互作用が観測できた場合に相互作用残基とみなした.

3.3 ET 法

ET 法により eEF1A を解析するために, Swiss-Prot から配列データを取得した. 次の 4 つの条件を全て満たす配列を, Swiss-Prot のアノテーションをもとに, 2011 年 9 月時点の全データ $532,146$ 配列から抽出した.

1. タンパク質名に“Elongation factor 1-alpha”を含む.
2. フラグメントでない.
3. 偽遺伝子でない.
4. 配列長が 500 以下である.

1~4 の条件で抽出し, 147 配列を取得した. ClustalW を用いて 147 配列の MSA を行い, Phylip を用いて UPGMA 法により MSA から進化系統樹を作成した. MSA と進化系統樹から ET 配列を算出するプログラムを用いて ET 配列を求めた. 進化系統樹をルートから末端節までの枝長で 10 等分するパーティション (P1~P10) を用いて, MSA をいくつかのクラスに分けた. それぞれのクラスに対して CNS 配列を求め, それぞれのパーティションに対して ET 配列を求めた. TR を, ヒト eEF1A1 の立体構造上で残基の側鎖が表面であるか内部であるかで分類し, ヒト eEF1A1 の立体構造上にマッピングした. 残基側鎖の溶媒露出が 30% 以上の場合に表面の残基とし, 30% よりも小さい場合に内部の残基とした.

4. 結果・考察

4.1 ドッキングシミュレーション

ZDOCK を用いて FNIII14-eEF1A1 複合体構造を予測し、予測結果を図2に実験1, 2に分けて示した. 図2の左側と右側は, それぞれの実験で予測された上位の複合体構造を, eEF1A1 の原子座標を用いて重ね合わせた図である. FNIII14, ドメイン1, ドメイン2およびドメイン3は, それぞれ黒色, 濃い灰色, 薄い灰色および白色で示した. 左側は eEF1A1 のドメイン3に限定して予測を行った結果で, ZDOCK 順位1, 2, 3, 6, 7および10の合計6個の複合体構造が含まれる. 右側は eEF1A1 のドメイン3とその境界領域に限定して予測を行った結果で, ZDOCK 順位1, 2, 3, 4および7の合計5個の複合体構造が含まれる. 実験1, 2のそれぞれのFNIII14はeEF1A1に対してほぼ同じ位置にあり, 実験1, 2は共に上位の複合体がほぼ同じ複合体である. 上位の複合体はスコアが良い複合体であり, ほぼ同じ複合体は eEF1A1 に対してFNIII14が少しだけ並進, 回転した構造である. このことから, FNIII14の向きがeEF1A1に対して少しだけ変化しても, ZDOCK のスコアがあまり変わらないことがわかる. したがって, 実験1, 2のそれぞれのFNIII14近傍にあるeEF1A1の構造は, FNIII14のC末端側がはまるような溝になっている構造であると考えられる.

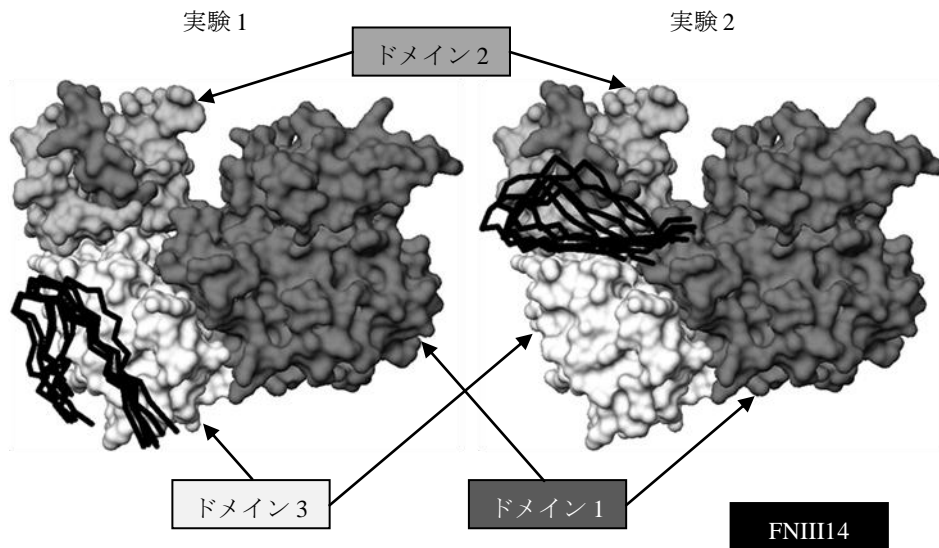


図2 ZDOCKの結果

4.2 ET法

Swiss-Prot の eEF1A の 147 配列のデータを ET 法により解析した. 図3は, 進化系統樹をルートから末端節までの枝長で10等分するパーティションの, ルートから数えて9番目にあったパーティション(P9)を用いたときの結果である. P9はMSAを, 脊椎動物, 節足動物, 線形動物, 植物などのクラスに分けるパーティションである. 図3は, P9の結果について, 保存残基, クラス特異的残基および中立残基をそれぞれ白色, 黒色および灰色でヒト eEF1A1 の立体構造上に示した. eEF1A1 は 180° 回転した構造を示し, 左側と右側をそれぞれ立体構造の前面と背面とした. TR は立体構造の前面に多く, 背面にはあまりない. 保存残基は前面の中央付近に多くあり, その周囲にクラス特異的残基がある.

eEF1A は細胞質で GTP 依存的にペプチド鎖伸長に関わり, GTP と結合して機能する. GTP の結合部位は前面のドメイン1の中央付近であり, eEF1A の GTP 結合部位の Swiss-Prot のアノテーションと eEF1A の ET 法による解析結果を比較すると, GTP 結合部位の17残基中16残基がTRであった. したがって, eEF1A の ET 法による解析結果は, eEF1A の機能既知部位である GTP 結合部位と一致する結果であり, 機能既知部位がTRに含まれていることがわかった.

図2, 3を見比べると, FNIII14の位置はTRがある部位付近であり, ZDOCK を用いて予測した FNIII14-eEF1A1 複合体の相互作用部位が, ET 法により求めた TR と重複している可能性が考えられる. そこで, FNIII14-eEF1A1 複合体の動的構造を MD 法により解析し, 構造のゆらぎの中で相互作用している残基を求めた.

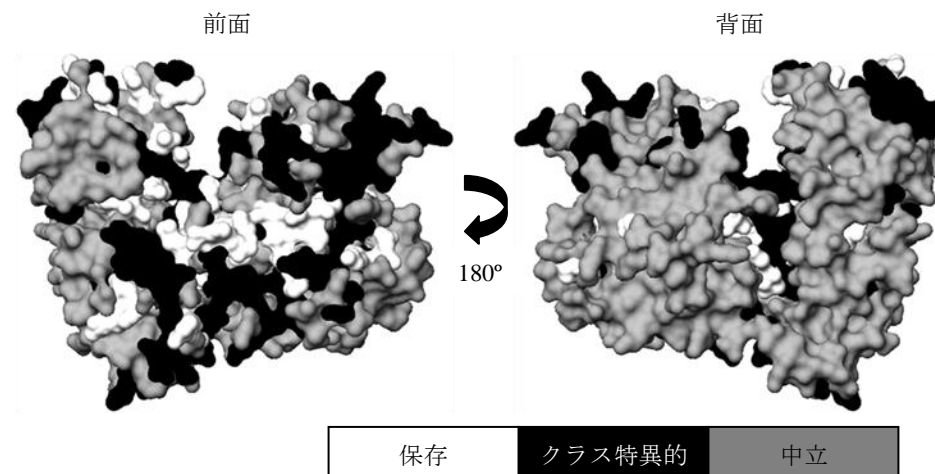


図3 ET法の結果

4.3 MD法とET法の組み合わせ

図2に示した全ての複合体について、MD法により相互作用の予測部位を求めた。実験1, 2の全ての複合体についての相互作用残基を合わせて、それぞれ予測部位1, 2とした。図4の黒色の部位が予測部位で、左側が実験1の複合体、右側が実験2の複合体から求めた予測部位である。また、実線を保存残基、点線をクラス特異的残基として、予測部位中の立体構造の表面に側鎖があるTRのアミノ酸シンボルと残基番号も示した。図4より、MD法により求めた相互作用残基の中にET法により求めたTRが含まれていることがわかる。2カ所の予測部位の両方にTRが含まれており、両方の予測部位についてMD法とET法による結果が一致した。したがって、2カ所の予測部位は共に妥当な結果を与えていると考えられる。また、MD法とET法を組み合わせ解析を行ったことにより、予測部位中のFNIII14との相互作用に関わる残基の候補が得られた。

FNIII14-eEF1A相互作用では、carboxyl基とamino基の相互作用が関わると実験的に示唆されている。そのため、FNIII14のGlu残基とeEF1AのLys残基またはArg残基が相互作用しているのではないかと考えている。実験1, 2で得られた複合体をMD法により解析した結果、実験1, 2のFNIII14のGlu残基がそれぞれeEF1A1のLys残基、Arg残基と相互作用していることがわかった。したがって、実験1, 2の複合体の相互作用残基は実験結果とも一致しており、妥当な結果ではあるが、2カ所の予測部位のどちらが相互作用部位であるかはわからない。今後、eEF1Aのアミノ酸残基の変異実験を行いたいと考えている。

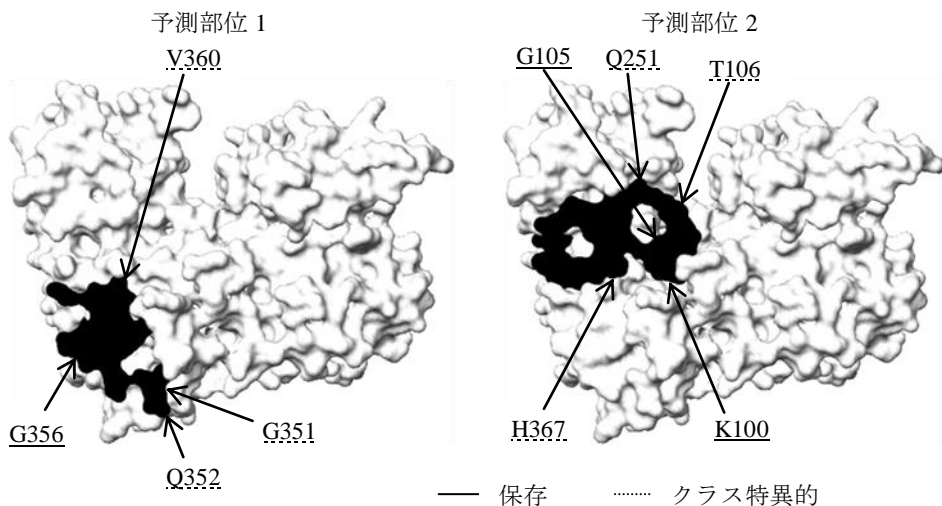


図4 MD法とET法を組み合わせた結果

謝辞 FNIII14-eEF1A 相互作用部位の情報を提供してくださった東京理科大学薬学部深井文雄教授に心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Giancotti F. G. and Ruoslahti E.: Integrin signaling, Vol.285, Science, pp.1028-1032 (1999).
- [2] Calderwood D. A., Shattil S. J. and Ginberg M. H.: Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling, Vol.275, No.30, J. Biol. Chem., pp.22607-22610 (2000).
- [3] Hynes R. O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, Vol.110, Cell, pp.673-687 (2002).
- [4] Pankov R. and Yamada K. M.: Fibronectin at a glance, Vol.115, J. Cell Sci., pp.3861-3863 (2002).
- [5] Sharma A., et al.: Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fibronectin, Vol.18, No.6, EMBO J., pp.1468-1479 (1999).
- [6] Watanabe K., et al.: Interaction with heparin and matrix metalloproteinase 2 cleavage expose a cryptic anti-adhesive site of fibronectin, Vol.39, Biochemistry, pp.7138-7144 (2000).
- [7] Fukai F., et al.: Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide, Vol.242, Experimental Cell Res., pp.92-99 (1998).
- [8] Kato R., et al.: A new type of antimetastatic peptide derived from fibronectin, Vol.8, Clinical Cancer Res., pp.2455-2462 (2002).
- [9] Ejiri S.: Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization, Vol.66, No.1, Biosci. Biotechnol. Biochem., pp.1-21 (2002).
- [10] Andersen G. R., et al.: Structural basis for nucleotide exchange and competition with tRNA in the yeast elongation factor complex eEF1A:eEF1B α , Vol.6, Molecular Cell, pp.1261-1266 (2000).
- [11] Bunai F., Ando K., Ueno H. and Numata O.: Tetrahymena eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) bundles filamentous actin through dimer formation, Vol.140, J. Biochem., pp.393-399 (2006).
- [12] Miura S., et al.: Antiadhesive sites present in the fibronectin type III-like repeats of human plasma fibronectin, Vol.30, No.5, Biol. Pharm. Bull., pp.891-897 (2007).
- [13] Lichtarge O., Bourne H. R. and Cohen F. E.: An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families, Vol.257, J. Mol. Biol., pp.342-358 (1996).
- [14] Lichtarge O. and Sowa M. E.: Evolutionary predictions of binding surfaces and interactions, Vol.12, Current Opinion Structural Biology, pp.21-27 (2002).
- [15] Accelrys, Inc.: Discovery Studio, version 2.5.5, San Diego, CA (2010).
- [16] Chen R., Li L. and Weng Z.: ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm, Vol.52, Proteins: Struct. Funct. Genet., pp.80-87 (2003).
- [17] Case D. A., et al.: ABMER 9, University of California San Francisco (2006).