

## B201

## 蛋白質における周期軌道に関する考察

○桑田 一夫 (岐阜大・医・蛋白高次)

蛋白質のダイナミクスは、基準振動解析や分子動力学法を用いて計算される。実験的考察から (例えばプリオン)、蛋白質の機能や病原性に関連する揺らぎは、極めて遅いモード (ミリ秒以上) であることが示唆されている。このような遅い領域では、蛋白質にどのような運動が生起しているのだろうか? 我々は、蛋白質の実体的な運動というものを未だ見たことがない。例えば、血清アルブミン (BSA) は、膜に入ると裏表が反転して、イオンチャンネルとなることが知られている。このことは、確率は低いが、BSA は、稀にクラゲのように反転しながら、水中を拡散していることになる。プリオンに見られるような立体構造転移が常識的に受け入れられる未来には、蛋白質のダイナミクスに関する我々のイメージはどのように変化しているだろうか? 我々はこのような観点から、蛋白質の位相空間における軌道の周期性に関する理論的考察を行った。また、そのような観点から、NMR 緩和時間をどのように解釈するか、を考察した。さらに、遅い周期軌道の特異的に検出する方法論に関し、理論的考察及び予備実験を行った。

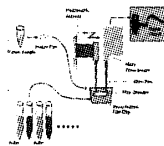
Kazuo Kuwata : Protein Zeta

## B203

## タンパク質フィルムの力学的変化を利用する相互作用検出装置の開発とその自動化

○最上 要<sup>1</sup>、青木 弘良<sup>1</sup>、李 範煥<sup>1</sup>、原 努<sup>1</sup>、山形 豊<sup>2</sup> (<sup>1</sup> (株) フューエンス、<sup>2</sup> 理研・素材材)

生体高分子のリガンドとの相互作用を検出・測定する方法としては表面プラズモン共鳴法 (SPR) や水晶発振マイクロバランス法などがよく知られている。我々はフィルム状にしたタンパク質の力学的性質が変化することを利用する新しい方法を開発し、装置の自動化を行った。まずタンパク質フィルムを作成するためにはエレクトロスプレー法を用い、グルタルアルデヒドで固定した。専用治具上のフィルムの位置はTVカメラによって自動または目視で検出され、2本のタングステン針で貫かれ、拾い上げられる。一方の針は力 (チカラ) センサーに固定され、他方はアクチュエーターにつながっている。フィルムと針はそのまま測定用チェンバーに移動される。チェンバー中では測定したい溶液を自動または手動で交換し、張力の変化を測定する。またアクチュエーターによって振動を与え、フィルムの硬さを測ることもできる。各種タンパク質についてフィルムを作成し、測定を行ったが、例えばカルモジュリンの場合、ある程度カルシウム濃度に比例した張力を発生すること、またこのフィルムはたいへん柔らかいことなどが明らかとなった。今回の発表ではSPR法等では検出が難しい、低分子の検出について報告する。



K.Mogami, H.Aoki, B.Lee, T.Hara and Y.Yamagata : Development of apparatus detecting mechanochemical interactions of biomolecules

## B202

## 膜タンパク質、膜結合ペプチド立体構造解析のための新規固体NMR測定法の開発

○西村 勝之、内藤 晶 (横浜国大院工)

生体膜と相互作用するペプチドや膜蛋白質の立体構造解析や膜に対する相対配置を決定する手段として、固体NMRは極めて有効な手段の一つである。これまで生体分子の構造解析のために様々な固体NMR測定法が考案されているが、これらは分子運動性の低い結晶のような固体試料を想定してデザインされている。このため局所運動が存在する系、または含水量の多い生体試料では大きな測定誤差を生じ、時に解釈そのものを誤らせるような結果を与える。含水量が多い試料ではラジオ波の誘電損失により深刻なラジオ波パルスのフリップ角のエラーが生じ、測定法が理論通りに適用されないためである。また局所運動がある系では観測する異方的な相互作用自身が時間平均されるため、分子運動の効果を考慮しなくては観測値の解析そのものができない。観測する相互作用の測定精度、確度の向上のためには、これら含水量が多く、局所運動性が存在する生体試料でも有効に稼動する適切な固体NMR測定法の開発が必要である。昨年筆者らは、比較的局所分子運動性の高い静止試料に適用可能な新規固体高分解能NMR感度向上法TANMA-CP(Time Averaged Nutation at Magic Angle -Cross Polarization)法の開発を行い、その有効性を立証した。本研究では試料発熱を抑制可能な弱い出力のラジオ波磁場を用いて、静止またはマジック角試料回転条件下で磁気双極子相互作用を観測可能な新規固体NMR測定法の開発を行った。観測される磁気双極子相互作用は距離情報、または静磁場に対する生体分子の配向角を求めることを可能にし、ペプチドや膜タンパク質の膜中または膜面での構造解析のための情報を与える。

K. Nishimura, and A. Naito : Methodology Developments on solid state NMR for structural characterization of membrane proteins and membrane bound peptides

## B204

## 転写因子タンパク質とDNA間相互作用における特異性の直接評価

○清水 裕一郎<sup>1</sup>、鈴木 武博<sup>1</sup>、小坂橋 龍二<sup>1</sup>、藤田 昌也<sup>2</sup>、栗原 和枝<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 東北大・多元研、<sup>2</sup> 国立遺伝研)

近年、タンパク質とDNA間の相互作用の解明に関心が高い。当研究室では、コロイドプローブ原子間力顕微鏡を用い、LB法で配向を揃えたDNAとタンパク質間の直接測定に成功している。本研究では、得られた相互作用がDNA/タンパク質間にあることを確認するため、水晶発振マイクロバランス (QCM) を用いて、LB膜で累積した各層間の結合定数を求めた。次に、塩基配列を変えたDNAを用い、相互作用直接測定とQCMによる吸着量測定から、それぞれのDNAにおける相互作用の特異性を比較した。試料は、枯草菌の転写因子のDNA結合ドメイン (Spo0A-DB) と、Spo0A-DBが特異的に結合すると考えられている0Abox(TGTCGAA)配列を持つDNA I、及びこの配列を変えたDNA II~VIを用いた。DNA表面は、疎水化したガラス表面 (1) に、アビジンを吸着させたビオチン脂質を累積し、更にビオチン修飾DNAを吸着させた。また、タンパク質表面は、ポリヒスチジン修飾Spo0A-DBを吸着させた銅イオン配位のキレート単分子膜を疎水化表面 (1) に累積した。測定は1.0 mM NaClを含む0.1 mM Tris緩衝溶液で行った。pH 7でDNA I / Spo0A-DB間には最大0.77 mN/mの接着力が観察された。QCMで測定した結合定数の比較から、他の膜間の結合はDNA I / Spo0A-DB間より強く、得られた接着力はDNA I / Spo0A-DB間のもので確認された。DNA IIからVIとSpo0A-DB間の接着力は、DNA Iよりも小さくなった。しかし、QCMによる吸着量測定では、DNA IからVIにほとんど違いが観察されず、これは、Spo0A-DBの非特異的吸着に起因すると考えられる。これらは、配向を揃えた相互作用直接測定が、生体内の特異的相互作用の新規評価法として有効であることを示している。

Y.Shimizu, T.Suzuki, R.Koitabashi, M.Fujita, and K.Kurihara : Direct Observation of Specific Interactions between Transcription Factor Protein and DNA