3PA085

ウシ血清アルブミンの室温燐光と pH 依存転移状態

○甲斐義幸¹、小寺義男²、前田忠計²中央大学¹、北里大学・理²、同研究員¹

ウシ血清アルブミン(BSA)は外液の環境に応じてコンフォーメーションを変え、脂肪酸や薬物の吸着運搬などの機能をもつ。BSAのpH依存の立体構造転移には $B \leftrightarrow N(pH 8)$ 、 $N \leftrightarrow F(pH 4)$ 、 $F \leftrightarrow E(pH 3.2)$ [() 内は転移のpHの中央値]があると考えられている。これらの転移状態について、構成成分である2つのTrp残基の周辺の疎水性環境の詳細を室温燐光法(RTP法)で調べ、いくつかの知見を得た。RTP法の特徴は脱酸素溶液系でタンパク質内部に埋もれた状態の励起Trp残基のみが発する燐光の情報を得て、構造内部の疎水領域の局所的な位置および構造の揺らぎがわかることである。特にここではデジタルコリレーターを利用したRTP測定装置を用いたことで詳細な分析が可能になった。

各転移状態B、N、F、Eについて、RTPの減衰のデータから得られた複数の寿命成分(3成分、各数百マイクロ秒から数ミリ秒で固有寿命より大幅に短い)、および立ち上がり強度の違いから以下の知見を得た。

①それぞれ3つの寿命成分はTrp134、Trp212に起因し、そのいずれかが更にタンパク質の多型により2成分をもつと推測される。

②F、Eタイプでは、Nタイプよりも各成分とも寿命や強度が減少している。つまり構造がばらけて疎水領域がほとんどなくなり、熱ゆらぎが大きい。

③BタイプではNタイプに比較して短寿命成分が寿命、立ち上がり強度ともそれぞれ2倍前後に増大している。これは発光分子周囲の疎水性が強まり、より内部の位置に閉じこめられたことを意味する。

④別に、空気飽和状態でもRTPが微弱ながらも観測できた。

従って、BSA分子は全体としてはpH変化に敏感に対応する構造をとつつ、部分的にも分子表面の近くに形成された疎水性領域のpHに応じた局所的な構造変化を伴う。こうした構造の特徴がBSAの機能と深く関わっていると考えられる。

Y.Kai, Y.Kodera and T.Maeda: Room-temperature phosphorescence study of pH dependent conformation change of BSA

3PA087

ミオグロビンの振動エネルギー緩和の分子動力学

シミュレーション

○森次 圭、宮下 治、木寺 詔紀(京大院、理)

タンパク質の機能発現はその運動を伴うダイナミックな過程である。従って原子レベルで機能を理解するためにはタンパク質のダイナミクスの理解から始めなければならない。ここでは、その最も単純なモデルとしてミオグロビンの光解離を考える。

ヘムタンパク質においてヘムに結合した一酸化炭素などの光解離反応による振動励起エネルギーの緩和過程を調べた実験によると、緩和は2相性を示す。古典的な熱拡散だけでは数 ps オーダーの速い緩和は説明がつかず、タンパク質内における低い振動モードへのエネルギーの移動が関与していると考えられている。このような低振動のcollectiveな運動はタンパク質の構造変化を理解するうえでも重要である。しかし、タンパク質内のエネルギー移動の素過程は非常に速いため、現在のところ実験では確かめられていない。本研究の目的は、タンパク質内における振動モード間のカップリングの効果によって起こるエネルギー移動過程をMDシミュレーションの方法により直接見ることである。

研究の第一段階として、ここでは、静止状態のミオグロビンに対して1つの振動モードに運動エネルギーを与えた初期条件でMDシミュレーションを行い、1つのモードに局在したエネルギーが他のモードにどのように移動するかを解析した。振動モードとしては、ポテンシャルの極小構造における基準振動解析で得られたモードを用いた。それぞれのモードごとのパワースペクトルを計算することにより、モードカップリングの状態を解析した。詳細については当日発表する。

K.Moritsugu, O.Miyasita, A.Kidera: Molecular dynamics simulation of the relaxation of the excited myoglobin

3PA086

タンパク質運動の非線型効果

○宮下治、森次圭、木寺記紀、郷信広
(京都大学大学院理学研究科)

タンパク質は大きな運動自由度を持ち複雑に運動する。一方で、機能を発揮することがタンパク質の持つ役割であるから、その運動は、でたためなものではない。機能に必要な運動をするようにタンパク質の構造が作られているはずである。

複雑な運動を理解するための方法の一つに基準振動解析がある。基準振動解析は、タンパク質の運動を独立の振動運動の線形結合して表現する方法であり、平衡状態でのタンパク質の構造揺らぎを表現することができる。

さて、基準振動のモデルでは、振動は独立したものとして扱われるが、現実には振動同士が影響しあっていると考えられる。例えば、振動緩和現象は、様々な振動の間をエネルギーが移動していくことで理解されている。そこで、タンパク質運動の振動同士の相互の影響を理解することが必要であり、基準振動解析から得られる振動の間にどのような相関が見られるかを分子動力学により調べる。詳細は当日発表する。

O. Miyashita, K. Moritugu, A. Kidera, N. Go:
Non Linearity of Protein Motions

3PA088

コロイドプローブ原子間力顕微鏡によるタンパク質膜間の

相互作用の直接測定: SigmaA・Spo0A タンパク質

○濱井康宏、*藤田昌也、栗原和枝(東北大学・反応化学研究所、*国立遺伝学研究所)

タンパク質間には機能発現や高次構造の形成の際に様々な相互作用が働くことが知られている。本研究では DNA 転写時に相互作用していると考えられる SigmaA と Spo0A をポリヒスチジン (His-tag) 修飾し、表面に配向させ原子間力顕微鏡 (AFM) によりタンパク質表面間の特異的・非特異的相互作用の直接測定を行った。

測定にはコロイドプローブ AFM を使用した。試料表面の調製には dioctadecyldimethylammonium(DODA) LB 膜で疎水化したガラス表面上に、銅を配位させた distearylaminodiacetate(DSIDA-Cu²⁺)膜に His-tag タンパク質を結合させ累積した。タンパク質には RNA ポリメラーゼを構成する SigmaA と転写因子である Spo0A の C 末端を共にポリヒスチジン修飾したものをを用いた。また試料表面のタンパク質密度を水晶振動子マイクロバランス (QCM) 測定及び AFM 像から見積もった。

SigmaA-SigmaA、Spo0A-Spo0A、SigmaA-Spo0A 表面間の相互作用力を水溶液中 (NaCl 1 mM、Tris 0.1 mM) で接近及び引き離し方向において様々な pH で測定した。図には pH8 における Spo0A-Spo0A 及び SigmaA-Spo0A 間の接着力の出現頻度を示す。Spo0A-Spo0A 間に比べ SigmaA-Spo0A 間では大きな接着力が観測された。一方、SigmaA-SigmaA 間の接着力は Spo0A-Spo0A 間の接着力とはほぼ同様の小さい成分のみであった。接近時の表面力の結果と併せると、SigmaA と Spo0A の間に特異的な引力が働いていると考えられる。また接着力より結合エネルギーを見積もることができ、SigmaA と Spo0A の結合エネルギーは pH8 で -18.0 kJ/mol と見積もられた。

Y. Hamai, M. Fujita, K. Kurihara: Direct measurement of interaction of protein membranes using colloidal probe Atomic Force Microscopy.