3PA089

X線1分子計測法

○佐々木裕次^{1,3)}, 足立伸一²⁾, 鈴木芳生, 八木直人³⁾
 科技団さきがけ研究21¹⁾, 理研播磨²⁾, SPring-8 (JASRI)³⁾

タンパク質1分子の機能を細胞内において実時間で、かつ原子オーダーの分解で計測できれば、多くの生命現象を理解する上で極めて強力な情報が得られるであろう。可視領域の蛍光法による1分子計測の実現は、タンパク質1分子のリアルな動きを計測可能にし、細胞内においてタンパク質1分子の動きとその機能の相関を解明できるといふ夢物語を現実の世界へと引き寄せた。しかし、その到達点に達するまでには多くの問題点がある。例えば、タンパク質分子の動きを詳細に計測するには、3次的にnm以下の精度が必要となり、偏光法及びエネルギー移動法を含む可視域の1分子蛍光法でも十分とは言えない。そこで、最近、私は透過性があり、nm以下の波長を持つX線を用いた1分子計測を考案し、その原理実験に成功した。現在、同サンプル系をタンパク質系、細胞系へと進展させている。

X線1分子計測のアイデアは単純である(図1)。まず、直径数nm程度の極微良質結晶をタンパク質分子にその機能を損なわないように標識する。そして、極微結晶からのラウエ斑点を指標に、着目したタンパク質1分子(集合体)の動き(主に回転)を時分割(msからnsまで)追跡する。つまり、この新計測法:時分割ラウエ斑点追跡法で、細胞内でのリアルなタンパク質1分子の3次元動的構造情報を得ることが可能となる。今回は、計測するラウエ回折を単純化するために、多層膜のクラスターを作製し、アフィニティゲルに修飾した例と、タンパク質分子の動的挙動のデモンストレーションとして、ATP合成酵素のF1部分の運動と、ミオシンS1分子の構造変化計測の例を紹介する。

図1: X線1分子計測: 時分割ラウエ斑点追跡法の原理

Y. C. Sasaki, S. Adachi, Y. Suzuki, N. Yagi: Single molecular detection with x-rays

3PA091

ビデオ顕微鏡を用いた Gelatin ゲルのゲル-ソル転移における微視的物性の測定
 ○三橋和彦、松永俊聡(佐世保高専・電気)

[背景]近年、細胞内部又は細胞表面等の微粒子のブラウン運動を測定することで、周囲の物理的環境や構造を推察する研究がされている。その結果、主たる運動様式が単純拡散に近い系等に対しては理論的描像とほぼ一致する事が確かめられている。

しかし、媒質が多数の高分子が絡み合った溶液であったり複雑な内部構造を持つ場合に関しては、理論的にも取り扱いが困難である事もあって不明な点が多い。さらに、ビデオ顕微鏡によって揺らぎを測定することで、どの程度までマクロな物性測定と同様の結果が得られるのか、或はどこから食い違いが現れるのかさえ、今もって明らかではない。

その為、より現実の多くの生体系で物性の変化を研究する為に、光学顕微鏡による物性測定法や解析法を確立する事が早急の課題となっている。

[方針]本研究では、相転移に見られる揺らぎの変化をビデオ顕微鏡を用いて測定する。本装置は、正立型顕微鏡(OLYMPUS, BH-50)にCCDカメラ(40万画素)、VTRと恒温槽から構成されている。恒温槽は、顕微鏡の電源部を除いて断熱壁で覆う容器を製作し、測定試料付近の温度変化率を0.02°C/min.程度に抑制した。温度は、恒温槽内部に設置したヒーターで室温(20前後)から40°C前後まで変化させ、Gelatinゲルの温度相転移を制御した。

[現状]ゲル化点より高い濃度(1.5%以上)での測定では、ブラウン運動の様子は比較的小さくであった。図1-a~cに、低温(25.9°C)・中温(33.9°C)・高温(40.0°C)で測定されたポリスチレンビーズのブラウン運動(10秒間)の軌跡を示す。これらの図から、温度上昇と共にブラウン運動が激しくなる様子が分かる。さらに、本データを元に平均二乗変位(MSD)を計算した結果(図2-a~c)を見ると、時間間隔Δtが0~1[s]の範囲では直線的な傾向が強いことが分かる。これは、どの温度領域でもビーズの運動は自由拡散に近く、相転移の大まかな過程は拡散係数で追跡できる事を示唆している。実際、個々のMSDプロットの傾きから微視的拡散係数Dを求め図3の様になると、相転移の開始一終了までの一連の過程を追跡できる事が分かる。一方、ゲル化点近傍(1%未満)まで濃度を下げると、相転移開始温度や転移温度幅の減少が見られた。しかし、転移幅の減少に伴う急激な揺らぎの変化に対して、小刻みな温度変化に対応する測定が困難である事が判明した。現在、温度履歴をより精密に制御して測定を行う準備をしており、その結果も本会で報告する予定である。また、イオンの添加によっても転移温度領域等に变化が認められたが、特にゲル化点近傍濃度での影響が大きく不連続転移の様相が強くなった。これに関しても高精度な温度制御下で測定を行い、相転移近傍での揺らぎの変化を追跡する予定である。

図1. ブラウン運動の軌跡(10s)

図2. 平均二乗変位

K. Mitsuhashi, T. Matsunaga: Video Microscope Study on Gel-Sol transition of Gelatin Gel.

3PA090

ジャイロトロンを用いたミリ波・サブミリ波照射による蛋白質変性
 ○土井昭孚、寺中正人、合田文則¹⁾、高島均²⁾、立川敏明、小川勇³⁾、
 出原敏孝³⁾
 香川医大・物理、第1外科¹⁾、放射線医学²⁾、福井大・工³⁾

ジャイロトロンはミリ波からサブミリ波にわたる周波数帯の電磁波を大出力で発振する。この種の電磁波の生体に対する照射実験は皆無に等しく、その効果についてもほとんど知られていない。我々はジャイロトロンの医学的応用への基礎実験として感熱熱に及ぼす熱的効果などについて調べてきた。今回は卵白に対する効果について報告をする。

ジャイロトロンによる照射実験は福井大学工学部に設置されているF U IVtypeを用いて行った。ジャイロトロンが発振する基本モードのうち、TE₀₃およびTE₃₂の2つのモードを主として用いた。また連続発振モードとパルス発振モードの比較も行った。照射実験はジャイロトロンのウィンドウ部よりフランジで接続し、内径28mmの導波管を2つのコーナーベンドを介してつなぎ、約6.5m離れた別室において行った。照射による熱的効果としては、変色面積と変色パターンのモードによる比較や、電磁波の卵白への浸透力などについても調べた。

A. Doi, M. Teranaka, F. Gohda, H. Takashima, T. Tatsukawa, I. Ogawa, and T. Idehara: Protein denaturation by millimeter and submillimeter wave radiation using a gyrotron

3PA092

ロイシンリッチリピート蛋白質の配列解析と分子進化
 ○田中剛範、新田勝利、松嶋範男*
 (北大・院・理、札幌医大・保健医療)

ロイシンリッチリピート(LRR)は、ロイシン残基を豊富に含んだ20~30残基が一単位として繰り返されるタンDEMリピートである。LRRは、バクテリアからヒトに至るまでの多くの生物種で、100種類以上の蛋白質中に見いだされている。しかし、一般に同一の蛋白質内ではLRRの繰り返し単位同士が比較的よく類似しているが、異なる蛋白質間ではその繰り返し単位の長さや保存性の高い残基の種類・位置などが著しく異なるため、これまでLRR蛋白質の分子進化の解析はほとんど進展していなかった。最近、我々はsmall proteoglycanファミリー(ハイグリカン、デコリン、ルミカン、フィブロモジュリン等)のLRR領域が、いづれも、2種類の異なるLRR単位配列(A及びB)からなり、それらの組み合わせがLRR領域の中で高次の繰り返し単位を形成し、(ABB)_nのような超周期を示すことを見いだした。さらに、この結果を基にして、このファミリーのLRR領域の分子進化のモデルを提案した[1]。

本研究の目的は、このような解析を他のLRR蛋白質に対しても行ない、個々の蛋白質のLRR領域が祖先のLRR単位からどのような進化過程を経て形成されていったのかを明らかにすることである。進化過程を推定するのに確かな情報をより多く得る為に、我々はLRRの各繰り返し単位をそれぞれ独立に扱い、プログラムパッケージMOLPHYを用いてそれら単位配列間の相関関係を総合的・系統的に評価した。また、解析にはアミノ酸配列および塩基配列の両方を用いた。我々はこの手法を、slit蛋白質、OMGP蛋白質およびリボスクレアゼインヒターに適用した。その結果、これらの蛋白質のLRR領域においても複数のLRR単位が集合して、より高次の繰り返し単位を形成していることを明らかにした。この結果を基にしてslit蛋白質の分子進化のモデルを作成することができた。

[1] Matsushima, N., Ohyanagi, T. Tanaka, T., & Kretsinger, R. H., to be submitted.

T. Tanaka, K. Nitta, N. Matsushima: Sequence analyses and molecular evolution of leucine-rich repeat in some proteins.