2L1600

AFMによるGroELと変性タンパク質の相互作用計測

○関口 博史¹、荒川 秀雄¹、田口 英樹²、伊藤 武史³、粉川 良平³、猪飼 篤¹（¹東工大 生命理工、²東工大・資源研、³島津製作所）

シャペロニン GroELは、変性タンパク質と特異的に相互作用し、ATP 依存的にそのフォールディングを助けるタンパク質としてよく知られている。しかし、どのような作用機構によって変性タンパク質を認識・結合して折り畳みを助けるのか等、不明な点が残っている。近年、原子間力顕微鏡は、単に顕微鏡として使われるのではなく、生体分子間の特異的相互作用力を計測するために利用されてきている。ただし、生体分子の機能を損なうことなく基板、あるいは探針へ固定する方法が大きな問題であることもわかってきた。我々は GroEL と変性タンパク質の一分子間相互作用力を原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定によって測定し、その機構の解明を試みている。同時に、固定方法の最適化や測定方法の改良も進めてきた。GroELはシラン化したガラス基板に PEG（ポリエチレングリコール）を介して共有結合で固定し（2重ドーナツ構造の GroEL を基板に対して垂直固定できるような変異体 E315C を作製した）、変性タンパク質も同様の方法で探針に固定した。予備実験として PEG のみでの測定を行い、そのフォースカーブはランダムコイルに近いものであることがわかった。次に、GroEL を固定し、変性タンパク質としてブタ・ペプシン（中性条件下で変性している）を用いて実験した。しかし、通常のフォースカーブ測定では、探針を基板に押しつけることによる影響が大きく、特異的相互作用をうまく計測できなかった。GroEL がつぶれてしまったり、探針と基板が直接相互作用を持つ（吸着する）、等の可能性が考えられる。そこで、非接触的な計測方法ができるようにソフトウェアを改良し、実験を進めている。本発表では、これらの固定条件、計測条件の最適化と、力測定による GroEL の機能解析について議論する

H.Sekiguchi, H.Arakawa, H.Taguchi, T.Itoh, R.Kokawa and A.Ikai : AFM Measurement of the Interaction between GroEL and Denatured Protein

2L1630

多光子励起蛍光相関分光法の紫外色素計測への応用

○西村 吾朗、金城 政孝（北大・電子研）

【概要】蛍光相関分光法 (FCS) に、多光子励起法を組み合わせることにより、紫外の色素、特に生体に内在する 芳香族アミノ酸や NADH と言った色素の計測に応用することが目的である。最初に紫外の色素の一例として微環境プローブである 1.8-ANS を用い装置の評価を行った。またトリプトファンを含むリポソームの測定を試みた。

【方法】倒立型蛍光顕微鏡に Ti:Sapphire レーザーからのパルス光 (790nm 約 100fs <100mW) を入射し試料に集光した。蛍光は、干渉フィルターで目的の波長を選択したのちに光電子増倍管で検出しデジタル相関器により処理を行った。試料としては、リン脂質リポソームを用い、1.8-ANS によりラベルされたものと、トリプトファンを含んだものを用いた。【結果】リン脂質リポソームにラベルする ANS の濃度を変化させながら蛍光相関関数を測定した。ANS の濃度の増加により、蛍光強度が直線的に増加し、相関関数は一定の曲線になった。この相関関数の変化は、低い ANS 濃度ではリポソームの一部しかラベルされず蛍光で見える粒子の数が少ないため濃度に依存するが、濃度が上がるとすべてのリポソームがラベルされるために一定の相関関数になるものと説明される。これらの結果から、このシステムではリポソーム当たり約 2 個の ANS 分子が結合したもので測定が信頼できることがわかった。トリプトファン溶液の蛍光についてこのようなシステムで測定可能か確かめた。1mM の溶液の場合、3 光子励起による蛍光が十分観察できることがわかった。現在トリプトファン溶液を包むベシクル系を用い、どの程度の感度で測定が可能なのか確かめる実験を行っている。【まとめ】紫外部の色素 1.8-ANS とリポソームを用いた蛍光相関測定を行い、単一分子レベルのラベルを検出することができた。また、トリプトファンの蛍光の測定が可能であることを示した。

G.Nishimura and M.Kinjo : Multi photon excitation fluorescence correlation spectroscopy - measurement of dye molecules in UV region.

2L1615

A F Mによるタンパク質単分子のナノ粘弾性測定

○三井 圭太^{1,2}、荒川 秀雄¹、中村 史夫²、中嶋 健²、原 正彦²、猪飼 篤¹（¹東工大・生命理工、²理研・フロンティア）

タンパク質は生体組織のほとんどの機能を制御する分子であり、分子生物学の初期からその機能と形状の密接な関係が示されてきました。また、一次構造であるポリペプチド鎖から無数にあるコンフォメーションの中の特定の形に一義的にフォールディングするメカニズムは長年の問題となっており、フォールディングに至る経路の探求が続けられてきました。本研究は以前より原子間力顕微鏡 (AFM) の分子解像度、生理活性溶液中での測定、力の測定系である事を依りどころとして、この問題解決に分子の集団の平均的な状態を扱うのではなく、単分子測定を導入し測定をおこなっています。単分子の力学物性測定には、試料となるタンパク質を基板と AFM の探針の間に挟み込み固定する必要があります。本研究では結合として Au-S の強い吸着力を利用しました。基板は金の単結晶面を使う事で、常に一樣かつ原子レベルで平坦な表面を用意し、これに金コートした探針と SH 基を導入したタンパク質を用いて、系を単純化しました。これはタンパク質以外からの力学物性を極力除くのが本研究の基本的戦略としてあるからです。この方法で再現性の高いフォースカーブが得られることを近年の年会で報告してきました。昨年から、理論面からもタンパク質を含む高分子との関連から、ナノレベルの粘弾性の測定が求められ、この目的のために AFM のビエゾコントローラーとその制御ソフトを用意し、特にマクロな粘弾性測定と同様な正弦曲線の入力を可能にしています。この測定中、ある適当な伸長距離において、通常であればエネルギーの散逸が完全に起きたとしても 90 度の位相差が現れるのに対し、一見分子のストレスに対する応答が 180 度位相がずれて測定されるという一般的な粘弾性理論では説明のつかない挙動が観察されました。その現象を説明するモデルとして局所的なリフォールディングを提示しましたが、今回このモデルを導入した数値シミュレーションによりこの現象が再現できたことを報告します。

K. Mitsui, H. Arakawa, F. Nakamura, K. Nakajima, M. Hara, A. Ikai : AFM nano Rheology study of single protein

2L1645

蛍光相関分光法を用いたイカ神経軸索内輸送の測定

○武都 拓也^{1,2}、田村 守²、金城 政孝²（¹北大・院理・生命科学、²北大・電子研・超分子分光）

【緒言】蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, 以下 FCS) は、単一分子検出法として生物学や分析化学の分野で最近注目を集めている。その原理は、微小領域内での蛍光分子のブラウン運動によるゆらぎを自己相関関数によって解析する事で、実際には分子の数や拡散定数などの情報が求まる。さらには分子間相互作用などについても知ることが可能である。これまで *in vitro* での FCS の測定が多かったが、光の持つ非侵襲的な性質を利用する事で、生体を生きたまま細胞内の相互作用の解析にも有効であると思われる。そこで本研究では、ヤリイカの神経軸索の中での蛍光分子の輸送について測定した。この軸索内輸送は輸送速度などは判明しているが、輸送機構はまだ完全に解明されていない。我々は今回、FCS がこの輸送機構を簡便に解明する測定手段として有用であるか検討した。

【実験方法】人工海水下でヤリイカ軸索神経 (約 400~500 μ m) を取り出し、そこにローダミンラベルされた 4 残基のペプチドを injection して蛍光相関分光装置 (ConfoCor, Zeiss) で細胞中の分子の挙動を計測した。

【結果・考察】自己相関関数から蛍光分子の数や測定領域内の拡散時間が測定できた。その結果、近位端に比べて遠位端側において分子数が約 3 倍ほど増大している事が分かった。この事から軸索内輸送がはっきりと観察できていることが示された。また、遅い成分の拡散時間から分子量などを計算してみると約 2000~3000kDa の成分が観察された。これから、輸送されている際に輸送に関連した分子が輸送物質に結合していることが示唆される。また、この輸送関連タンパクが結合している分子の割合は遠位端側で多く見られた。これらの事より、FCS は軸索内輸送の輸送機構解明に有用な測定手段であると考えられる。

T.Muto, M.Tamura and M.Kinjo : Measurement of axonal transport in the squid giant axons using fluorescence correlation spectroscopy