3A1345

蛋白質の圧縮率を決定する構造因子の解析

徳田 健治、○神山 匡、月向 邦彦（広島大・院理）

蛋白質の断熱圧縮率(β)は構造のコンパクトさと体積ゆらぎを直接反映する物理量であり、立体構造の個性を敏感に反映する。蛋白質の揺らぎの発現機構を解明する上で、 β を決定している構造因子を明らかにすることは非常に重要である。近年のX線結晶構造データ(PDB)の蓄積により、蛋白質の内部空隙であるCavityや溶媒露出表面積(ASA)をはじめ、種々の構造パラメータを算出、比較することが可能となってきた。本研究では β 既知の蛋白質27種類について、立体構造データから得られた各種構造パラメータや一次構造と β の相関を通して、圧縮率に及ぼす構造因子について考察した。

蛋白質の β に対して分子内のCavityは正に寄与するが、27種類の蛋白質のCavityを統計解析した結果、多くのCavityはModuleのような構造単位の間隙に位置すること、大きなCavityほど β を高める効果が大きい(約100 Å³以上のサイズでは一定値に収束すること、Cavityの平均の圧縮率は約450 × 10⁻⁶(1/bar)であることが明らかとなった。一方、単位質量当たりのASAが増すにつれて β は減少する傾向にあり、水和が β に対して負の寄与を持つことと符合する。しかし、その相関が悪いことから($r=-0.243$)、種々の蛋白質の β の違いは水和によるものではなく、主としてCavity(原子のパッキング状態)の差異によりもたらされているものと考えられる。 α -Helixと β -Sheet含量の総和と β の間には高い正の相関($r=0.792$)があり、二次構造ユニットは不完全なパッキングを通してダイナミックドメインとして作用しているものと思われる。 β は単位質量当たりのジスルフィド結合の数が多いほど小さく($r=-0.823$)、ジスルフィド結合は揺らぎを抑制する方向に作用していることがわかった。発表時にはこれらの解析結果に加え、20種のアミノ酸との単相関解析、重回帰分析による β の予測などについても報告する予定である。

T. Tokuda, T. Kamiyama and K. Gekko : Structural factors determining the compressibility of proteins

3A1415

Detection of Two Conformers of a Mutant Carbonic Anhydrase by Force Microscopy

○Alam Mohammad Taufiq, Ikai Atsushi (Faculty of Bio-science, Tokyo Institute of Technology)

Two conformers of a mutated bovine carbonic anhydrase II, having 259 amino acid residues, were detected by the force mode of atomic force microscope. Genetically engineered CAB (named CAB.Glu254Cys) was prepared by adding an extra cysteine residue at its N-terminus and replacing Glu254 with Cys to sandwich the protein molecule between a silanized surface of silicon wafer and a functionalized tip of an atomic force microscope (AFM). The genetically replaced Cys254 is located upstream of the knot structure, so that the protein could be stretched without forming a "knot". Two distinct types of force-extension curves were observed when the protein was stretched by using the force mode of AFM, one representing a native-like and the other a softer conformation compared with the native conformation. The force curve representing the mechanical property of the latter conformation of CAB was not affected by the addition of the specific inhibitor, p-aminomethylbenzenesulfonamide, indicating its inability to bind with the inhibitor. The circular dichroism, fluorescence spectroscopy and affinity chromatographic data showed that the soft conformation has similar optical properties to those of the native CAB but lacks the active site. The present result suggests that the AFM can identify the two conformers of CAB by mechanical means. The result presented here is a novel and meaningful application of AFM in the detection and characterization of mechanically distinguishable conformers in molecular scale.

M.T. Alam and A. Ikai : Detection of Two Conformers of a Mutant Carbonic Anhydrase by Force Microscopy

3A1400

タンパク質延伸のナノ力学

○猪飼 篤（東工大・院・生命理工）

我々はポリペプチド鎖やタンパク質をその両端を含むいろいろな位置から引っ張るという実験を通じて単一タンパク質分子の力学的特性の一端を垣間見てきた。方法として原子間力顕微鏡の探針-基板間に試料を共有結合架橋剤を用いてサンドイッチしてから探針-基板間距離を増すことにより間の分子を延伸する。試料としてポリグルタミン酸、炭酸デヒドラーゼ、カルモジュリン、GF P他を使用している。特にN-末端とC-末端から延伸したポリグルタミン酸は全長にいたるまで非線形ではあるが構造転移のないバネとして振舞うことがわかった。全長までの延伸において分子に蓄積される「ゆがみエネルギー」はヘリックス型、ランダムコイル形でそれぞれ、約100 kJ/mol/residueと20 kJ/mol/residueであった。炭酸デヒドラーゼをC-末端のknot構造が出来ないように延伸すると全長の70%までの延伸で架橋構造が破壊されるまで張力は単調増加し、この時点で蓄積されるゆがみエネルギーは約130 kJ/mol/residueであり、この値はGF Pの場合も大きくは異ならない。立体構造をうまく生成できていない炭酸デヒドラーゼ分子種では、全長の半分程度までの延伸は容易に進むが、全長までの延伸を行うには、平均40 kJ/mol/residueの仕事が必要となる。この値は水中における非特異的な残基間相互作用の大きさに相当する。またknot構造を保持したまま延伸すると、10 nm以下の延伸でランダムコイルへの構造転移がおきる。これらの数値は常温、水中でタンパク質立体構造を力学的に破壊するには大きな仕事を必要とすることを示唆しており、シャペロニンやタンパク質分解システムにおいて提唱されているポリペプチド鎖の線形展開を定量的に理解する上で参考となるであろう。また今後、ポリペプチド鎖やタンパク質の弾性的性質を利用した分子機械の設計も定量的に行えるようになるであろう。

A Ikai : Nano-Mechanics of Protein Stretching

3A1430

AFMを用いたペプチドの1分子操作

○武田 晴治¹、Ptak Arkadiusz¹、中村 史¹、三宅 淳¹、影島賢巳²、Jarvis Suzanne²、徳本 洋志²（¹工技院・融合研・バイオ、²工技院・融合研・アトム）

【序】生体内の現象を分子レベルで解明しようとするとき、1分子レベルの操作、測定解析が求められるときがある。蛋白質、ペプチドの構造はNMR、X線結晶構造解析、CDスペクトル等様々な方法で検討されている。これらの方法から1分子レベルの構造の揺らぎ、変化等の情報を得ることは容易ではない。そこで、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて1分子レベルでのペプチドの構造及び特性について検討した。まず、 α ヘリックス構造をとるペプチドを引き伸ばし、得られるフォースカーブの形状および引き伸ばしに必要な仕事からペプチド構造について検討した。

【方法】K₃₀CのペプチドのN末端にThioctic acidを結合させたもの(TKC)を合成し、金基板上にTKCとThioctic acidからなる自己組織化単分子膜(SAM膜)を作製した。金でコーティングしたAFM探針をSAM膜に接触させ、金基板と探針の間にTKC1分子を金-チオール結合により結合させた。様々な条件で溶液中、探針とSAM膜の距離を離していく過程で針にかかる力を測定しフォースカーブを得た。【結果及び考察】poly-KはpH11以上で α ヘリックス構造をとることが知られている。pH11の緩衝液中でフォースカーブを測定したところ、 α ヘリックスを形成している水素結合が切断されたと考えられる点が複数観測された。この結果は、Lantzらにより報告されたフォースカーブ¹⁾と類似している。8M尿素存在下で測定したところ、このような点は観測されず、引き伸ばしに必要な仕事も大きく減少した。このことは、ペプチドの構造が変性していることを示唆している。また、pH、塩強度等が変化したときの結果についても調べ、AFMを用いた1分子レベルの操作、解析の可能性について検討する。

1) Mark A. Lantz *et al.* Chem. Phys. Lett. 315 (1999) 61-68.

S. Takeda, A. Ptak, C. Nakamura, J. Miyake, M. Kageshima, M. A. Lantz, S. P. Jarvis, H. Tokumoto : Stretching a single-peptide molecule under various conditions using AFM