3D0930

ダンベル型水溶性タンパク質のヘリックス予測

○高橋 俊哉¹、豊田 真哉¹、薄葉 恵¹、広川 貴次²、
美宅 成樹¹ (¹東京農工大学・工、²変化システム)

ダンベル型水溶性タンパク質には、ドメイン間を結ぶ水に露出したヘリックスがある。本研究では、このようなドメイン間を結ぶヘリックスの予測を試みた。

ダンベル型タンパク質の特徴として、タンパク質総電荷の絶対値が非常に高い、という特徴が挙げられる。このことは、ヘリックスの両端ドメインが同じ電荷を帯びて反発し合いタンパク質を安定化していると考えられる。また、ドメイン間を結ぶヘリックスの特徴を挙げると、疎水性残基と極性残基の軸方向の分布と角度方向の偏りが挙げられる。水に接しているヘリックスの中心領域は親水性残基が多く、疎水性残基の偏りは見られない。一方ヘリックスの両端ではドメインとの相互作用を反映して疎水性残基が多く見られると同時に、角度方向の偏りが見られる。また、界面活性剤様の残基のアミノ酸(K,R,H,E,Q)がヘリックスの中心領域に多く見られる。界面活性剤様残基とは、(1)残基の頭部にある極性基と(2)自由度のある炭素鎖構造を持った残基のことである。これらの側鎖はミセルを形成するような界面活性分子と似ており、グルタミン性残基や正電荷残基が水分子と相互作用することでヘリックス構造が安定化していることが考えられる。

以上の特徴を基にタンパク質総電荷、平均疎水性値、疎水性モーメント、界面活性剤様残基の出現頻度、ヘリックス両端ドメインの総電荷という五つのパラメータを用いて、アミノ酸配列からダンベル型水溶性タンパク質のヘリックス予測を試みた。

PDBの単量体のデータセットを用いた結果、非常に高精度でダンベル型水溶性タンパク質のヘリックスを予測することができた。

S. Takahashi¹, S. Toyoda¹, M. Usuba¹, T. Hirokawa², S. Mitaku¹ :
Prediction of helical segments in dumbbell-type soluble proteins

3D1000

アクチン線維・微小管に沿ったすべり力分布測定：力測定プローブ位置固定法の開発

○小嶋 寛明¹, Brenner Bernhard², 大岩 和弘¹ (¹通信総合研究所・生体物性、²Medical School Hannover)

近年、微小針やレーザトラップされた微小球に捕捉したモータ蛋白質一分子が蛋白質フィラメントと相互作用する際に発生する変位や力を nm、pN の精度で計測する研究が盛んに行われている。これらの測定においては、モータ蛋白質分子と蛋白質フィラメントとの相対的な位置は絶えず変化している。この位置関係を人為的に固定した際にモータ蛋白質一分子が発生するすべり力がフィラメントに沿ってどのように分布するかを調べることは、力発生の分子機構を知る上で重要である。最近になって、レーザの放射圧を利用して、探針の位置をフィードバック制御することにより、標本面と探針との間の距離を一定に保ちながら引力及び斥力の非接触計測を行う分子間力顕微鏡が開発された(Aoki et. al. (1997))。本研究では、この系を 90 度回転することにより、蛋白質フィラメントの長軸に沿って探針の位置を固定しながらすべり力の分布を測定する系の構築を目指した。実験系では、表面を金コートし、末端に探針として ZnO ウィスカーを接着したバネ定数 0.1pN/nm 程度のガラス製の板状プローブを標本面に対して垂直に設置した。プローブ先端の XY 平面内での動きは分割光ダイオードによって 0.1nm の精度で検出した。放射圧用のレーザは対物レンズから斜めに射出し、板状プローブ表面に対して 20 度の入射角で、直径約 20 μ m の範囲を照射するように設定した。これにより、プローブに対して光強度 1mW 当たり 0.5pN、最大約 15pN の力を与えることができた。さらに、分割光ダイオードで検出したプローブの位置をこのレーザヘフィールドバックすることにより、プローブの熱ゆらぎを二乗平均変位にして 0.4nm にまで抑えることに成功した。この系により、探針と蛋白質フィラメント間の位置関係を、数ナノメートルの精度で制御して力計測を行うことが可能となる。

H. Kojima, B. Brenner and K. Oiwa : Development of the position clamp nanometry for the single molecule mechanics.

3D0945

膜タンパク質予測システム SOSUI による遺伝病データベース OMIM の解析

○柯 閏聡、美宅 成樹 (東京農工大学・工)

遺伝病データベース OMIM は、今までに報告されているヒトの遺伝病をすべて納めたデータベースで、SwissProt とのリンクによって遺伝病に関係するタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。OMIM のエントリは 1999 年 6 月の時点で約 10000 件であった。そのうちアミノ酸配列へのリンクがあるものが約 4000 件であるので、そのアミノ酸配列のすべてを解析の対象とし、膜タンパク質の予測を行うことが本研究の目的である。

SOSUI は高精度で膜タンパク質と膜貫通ヘリックスの予測を行うシステムで、ホモロジーの情報は使わず、単独のアミノ酸配列に対して、高精度の予測が可能で、計算が高速であるという特徴がある。得られる情報は、注目するアミノ酸配列が膜タンパク質であるかどうかという判別と、膜貫通セグメントの領域およびその本数である。

実際に、約 4000 件の遺伝病に関連するタンパク質の解析を行った結果、34 % が膜タンパク質であった。この割合は単細胞生物での 25 % よりかなり多い値である。また、膜貫通ヘリックスの本数分布を調べると、7 本膜貫通型の膜タンパク質が顕著なピークを示していた。そして、SOSUI によって 7 本膜貫通型の膜タンパク質の機能をデータベースから調べてみると 90 % は受容体であった。SOSUI による膜貫通ヘリックスの本数予測は少なめに出る傾向があるので、6 本型膜タンパク質中の受容体の割合を見ると、60 % 以上であった。遺伝病の原因遺伝子が非常に多いことが分かる。今後遺伝病に関連する各受容体のヘリックス配置の予測を行う予定である。

Ke Run-cong, S. Mitaku, : Analysis of amino acid sequences from OMIM by membrane protein prediction system SOSUI

3D1015

タンパク質間長距離相互作用の高感度力検出

○曾和 義幸¹、青木 高明^{2,3}、喜多村 和郎²、武藤 悦子⁴、柳田 敏雄^{1,2,3} (¹阪大・基礎工、²科技振・1 分子過程 Pj、³阪大・医、⁴科技振・さがし)

生体分子間に働く微小な相互作用を非接触的に検出するために、我々は市販の AFM に (1)0.1pN/nm 程度の自作カンチレバー、(2)光フィードバックシステム という 2 つの技術を導入することで、サブピコニュートンの力検出感度を持ち、カンチレバーのゆらぎ制御を可能にする非接触分子間力顕微鏡を開発してきた。これまでに、この顕微鏡を用いて生体分子の静電的な状態を pN 程度の力の変化として検出できることを示した (昨年度年会青木ら、曾和らポスター発表)。

今回我々は、この顕微鏡に蛍光観察用の光学系を導入した。安藤らの装置を参考に AFM のスキャナ部分を大口径チューブスキャナに交換し、ステージを一新することでスキャナ内に対物レンズを通し、蛍光像の観察を可能にした。これにより、蛍光標識をした目的の生体分子と探針との間の距離を制御しながら、pN 程度の力を検出するシステムを構築することができた。

この装置を用いて、我々はタンパク質間に働く長距離相互作用を高感度力検出し、分子間認識のメカニズムを考察することを目標としている。モータータンパク質の一種であるキネシン分子が微小管の上を運動する様子を観察すると、溶液中のキネシンは微小管にブラウン運動による衝突のみで結合するのではなく、数百 nm も離れたところから引き込まれるようにして結合する現象がしばしば観察される。これはキネシンと微小管の間に長距離相互作用が働くことを示唆しており、我々はこの両者の間に働く長距離力を上述の実験系で高感度検出したいと考えている。これまでに、探針にキネシン分子を、基板表面には微小管を固定して、両者が運動活性を保った状態にあることを確認しており、現在キネシンと微小管表面の間の距離を nm の精度で制御しながら、相互作用の検出を行っている。

Y.Sowa,T.Aoki,K.Kitamura,E.Muto and T.Yanagida : High-sensitive measurement of long-range interaction forces between proteins.