3E1045

グルタミン酸受容体の活性化に対する分子振動の効果

○久保 稔¹、小田井 圭²、杉本 徹³、伊藤 悦朗¹ (¹北大・院理・生物科学、²湘北短大・電子情報、³関東学院大・工)

グルタミン酸は、中枢神経系において速い信号伝達の大部分をになっているほか、記憶・学習という脳の高次機能にも関与する神経伝達物質である。1998年に、この受容体のサブタイプの1つであるAMPA/カニン酸型受容体のリガンド結合領域の結晶構造が、カニン酸と結合した状態で明らかにされた。カニン酸はこの受容体のアゴニストであり、受容体を活性化してイオンチャネルを開かせる。一方、競合性アンタゴニストであるCNQXは、この受容体に結合するものの、それを活性化できない。本研究の目的は、グルタミン酸受容体 (AMPA/カニン酸型受容体) によるアゴニスト・アンタゴニストの分子認識過程を理論的に明らかにし、受容体タンパク質の活性化をもたらす物理的要因を見出すことである。一般的に、受容体タンパク質の結合領域にはもともと柔軟性に富む部分が存在し、それはリガンドとの特異的結合によって固定されることが、近年指摘されている。またこの動的構造変化は、アゴニストによる結合とアンタゴニストによる結合とで異なることが、これらの結合した結晶構造の違いから明らかにされている。われわれは、アゴニストの特定の振動モードが、受容体との協調的な組み合わせ、引いては活性構造への移行に重要な役割を果たしている、と予想した。このような考え方を確かめるために、これまでに、グルタミン酸、カニン酸、およびCNQXの安定構造、電子状態、振動状態を半経験的分子軌道法 (PM3法) により計算し、これら3つの分子の間で電荷分布が類似していることや、アゴニストの間でいくつかの振動モードがよく一致することをつきとめた。そこで本発表では、グルタミン酸受容体 (AMPA/カニン酸型受容体) の結合部位と、そのアゴニスト・アンタゴニストとの間の電子状態間相互作用・振動状態間相互作用を、量子化学計算に基づいて議論する。

M.Kubo, K.Odai, T.Sugimoto and E.Ito : Effect of molecular vibration on activation of glutamate receptor

3F0900

AFM 試料作成のための基板処理方法の改良

○梅村 和夫¹、石川 満¹、黒田 玲子^{1,2} (¹アトムテクノロジー研究体、²東大院・総合文化)

DNA 分子を原子間力顕微鏡で測定する場合、劈開した雲母を基板として用いることが多い。pH7 前後の溶液中では DNA も雲母基板も負に帯電しているため、無処理では DNA を雲母基板に吸着させることができない。そこで、主として二つの方法、(1) マグネシウムなど正の2価イオンを DNA 溶液に加える、(2) シラン化剤で雲母表面をアミノコートして正電荷を持たせる、のいずれかが用いられている。方法(2)では強力に DNA 分子が吸着するため、構造観察するには適しているがその反面、分子の自由度が低く、基板上で酵素反応を起こさせたり、探針による DNA 分子の操作を行うには問題がある。このため、最近では方法(1)を用いている例が多い。しかし、2価イオンは DNA の構造や酵素の活性に影響を与えるため、得られた結果の解釈には注意を要する。またイオン非存在下で AFM 測定を行いたいときは、この方法は適さない。今回我々は、方法(2)を改良し、2価イオンを用いずに DNA の雲母基板に対する吸着の度合いを制御することを試みた。すなわち、アミノコートする際に希薄なシラン水溶液、または2種類のシラン化剤の混合溶液を用い、基板表面のアミノ基の数を加減することで、DNA の吸着の度合いが制御できるのではないかと考えた。その結果、吸着する DNA 分子の数を制御することは容易にできることが分かった。また、うまく条件を選んだ場合には、スーパーコイル状態の DNA を基板表面に吸着させた後に紫外線照射することで、基板上でリラックス状態に転移させることができた。また、混合溶液によるシラン化の場合には、必ずしも溶液の混合比が基板上のアミノ基の比率にそのまま反映されないこと、シラン化後のベーキング処理の有無で大きな違いが出ることなど、薄膜作成技術の観点からも参考になるデータが得られた。

K. Umemura, M. Ishikawa, R. Kuroda : Controlled Immobilization of DNA molecules using chemical modification of mica surfaces for atomic force microscopy

3E1100

蛋白質・リガンド相互作用データベースの構築

○Selvaraj Samuel²、久保 英夫¹、上野 裕明¹、上園 みちる¹、岡本 雅子¹、安江虹²、Prabakaran Ponraj²、皿井 明倫² (¹三菱東京製薬、²理研・筑波研)

Information regarding protein-ligand interactions is accumulating at a faster pace from various experimental techniques. It is of prime importance to systematically organize these data, so that they can be analyzed to provide an understanding of the molecular basis of protein-ligand interactions. We have developed a web-based "Thermodynamic Database for Protein-ligand Interactions" for storing and analyzing protein-ligand interaction data. Methods have been developed for construction and refinement of appropriate query for data retrieval. Presently, the database consists of binding data pertaining to two classes of enzymes namely proteases and kinases that are important targets for drug design. The database is organized into four major categories namely i) Literature information, ii) Ligand information, iii) Protein information and iv) Experimental information. The database currently includes data regarding kinases about 4,700 ligands having 11,260 interaction data from 306 research papers, and data on other proteins about 1,320 ligands and 2,820 interactions. Several search options for ligand, protein and literature have been provided. For given ligand-bound protein, homology search can be performed against PDB and the resulting homologous proteins aligned, together with the information of amino acids in direct contact with the ligand. Then, the structural information of proteins is linked to 3DinSight, an integrated database for structure, function and property of biomolecules. Also links have been provided to other databases such as PUBMED and PIR. These and other salient features of the database will be presented.

S. Selvaraj, H. Kubodera, H. Ueno, M. Kamizono, M. Okamoto, J.-H. An, P. Prabakaran, A. Sarai : Development of Protein-Ligand Interaction Database

3F0915

RecA-DNA 複合体の AFM 観察

○黒田 玲子¹、梅村 和夫¹、井川 瀟子³、柴田 武彦³、石川 満¹ (¹アトムテクノロジー研究体、²東大院・総合文化、³理化学研究所)

遺伝子組換えに重要な役割を果たしている RecA タンパク質は、1本鎖、2本鎖 DNA の双方に結合してフィラメント構造を作り、3本鎖の形成を促進する。また RecA だけでフィラメント構造を取ることもある。RecA と DNA の複合体の構造観察は電子顕微鏡を用いて多く行われてきたが、フィラメント形成のキネティクスの観点からの研究は少ない。また、近年数件の原子間力顕微鏡 (AFM) 観察が報告されたが、キネティクスの研究例はなく、また電顕で観察されているフィラメントの周期構造も AFM では確認されていない。本研究では、RecA と 2 本鎖 DNA の場合について、RecA と DNA のモル比、反応時間を変えて多様なサンプルを作成し、各々 AFM 観察することでフィラメント形成のキネティクスを考察することを試みた。その結果、反応時間が短いときでもいくらかは長いフィラメントが形成されていること、全く RecA が結合していない DNA も多数存在すること、RecA の濃度が薄いときには数分以内に反応が終わってしまうことなどが判明した。また、完全にできあがった RecA-DNA フィラメントを液中観察し、AFM 探針で削り取って見たところ、一カ所が削られるとその周りもまとまって削られる傾向が認められた。分解能に関しては、市販の先鋭化探針ではフィラメントの周期構造が見えなかったが、カーボンナノチューブ探針を用いると 10nm 程度の周期構造が観察できた。RecA が表面を埋め尽くしているようなサンプルを観察する場合でも高分解能が維持され、また探針が痛みにくいことが分かった。

R. Kuroda, K. Umemura, S. Ikawa, T. Shibata, M. Ishikawa : Imaging the RecA-DNA complexes using atomic force microscopy.