3G1530

窒素欠乏による好熱性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. MA19株の光合成系の変化

小林 正美¹、○富永 啓介¹、秋山 満知子¹、木瀬 秀夫¹、三宅 正人²、池上 勇³、白岩 義博⁴ (¹筑波大・物質、²スクリプス研、³帝京大・薬、⁴筑波大・生物)

好熱性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. MA19株は、窒素が欠乏するとチラコイド膜が萎縮し濃青色から淡緑色となり、菌体内にポリヒドロキシ脂肪酸 (PHA) を蓄積する。PHAは生分解性プラスチックとして注目されている物質である。シアノバクテリアの光化学系Iにはクロロフィル (Chl) a'が1分子、また光化学系IIにはフェオフィチン (Phe) aが2分子存在し、光電荷分離で重要な役割を担っている。すなわち、Chl a'とPhe aのChl aに対するモル比が分かれば、「系Iと系IIの比」と「アンテナサイズ」が容易に見積もれる。

そこで本研究では、窒素欠乏によりチラコイド膜が萎縮したとき、光化学系がどのようなダメージを受けているのかという知見を得ることを目的として、色素の精密分析を行った。その結果、Chl a / Phe a および Chl a / Chl a'のモル比はほとんど変化しなかった。しかもChl量もほとんど変化しなかった。このことは、チラコイド膜が萎縮しても、フェオフィチン化やエビマー化のようなクロロフィルの変性が起こっていないことを意味しており、光化学系IとIIが無傷のままであることを示唆する。これに対し、フィコビリンの消滅とカロチノイドの増加が見られた。光化学系が機能していることは、酸素発生能およびP700活性から確認した。ただ、活性はかなり低下していた。以上の結果より、窒素が欠乏するとフィコビリソームを解体して欠乏した窒素を補うことで生命を維持し、炭素をPHAとして貯蔵していると推測された。カロチノイドの増加は、光化学活性の低下に伴う励起状態のクロロフィルによる光障害を防御するためだと思われる。窒素源を添加すると、フィコビリンは速やかに生合成され、光合成能も元のレベルに戻った。

M.Kobayashi, K.Tominaga, M.Akiyama, H.Kise, M.Miyake, I.Ikegami, Y.Shiraiwa : The change of photosynthetic unit size of *Synechococcus* sp. MA19 under nitrogen-starved condition

3G1600

フェリチンによるニッケル、コバルトのナノ粒子作製

○奥田 充宏¹、山下 一郎²、吉村 英恭¹ (¹明大・理工・物理、²松下・先端研)

タンパク質フェリチンは外径13nm内径6nmの球殻タンパク質である。生体内では内部空間に水酸化鉄のコアを形成して鉄の貯蔵を行っている。インビトロでも、ある一定条件下で水酸化鉄のコア形成が可能である。このフェリチンへの鉄の取り込みを概ね説明する仮説はあるが、完全には解明されていない。鉄内包のメカニズムを解明することはバイオミネライゼーションのメカニズム解明の観点から興味深い。同時にタンパク質を用いて同一直径の無機材料ナノ粒子を作製できることは工学的応用から見ても興味がある。特に鉄以外の金属が内包できる可能性を示すことができればその応用の範囲は大きく広がる。今回このような観点から、鉄以外の金属としてニッケル、コバルトを選びこれらのコアをフェリチン内に形成することを試みた。ニッケル、コバルトの導入実験は、最終濃度が0.5mg/ml (1μM)のアポフェリチン、30 mMの硫酸ニッケルアンモニウム、または硫酸コバルトアンモニウム、100mMHEPESpH10.0の溶液を用意し、これを1晩放置した。その後遠心により不要な沈殿を除去し、アポフェリチンを透過電子顕微鏡 (TEM) で観察を行った。染色は金グルコースを用いた。金グルコースは直径がフェリチンの内部空洞へ通じるチャネルの直径0.3nmより大きい内部に浸透することが出来ず、これによる負染色により金属材料コアの有無を確認することができる。金グルコース染色では、ニッケルでは70%コバルトでは30%以上の割合でコアの形成が認められた。今後コア形成の機構を解明し、ニッケル、コバルトのコア形成確率を改善し、さらに他の金属ナノ粒子作製を目指す。

M.Okuda, I.Yamashita, H.Yoshimura : Fabrication of Nickel and Cobalt nano-particles using apoferritin

3G1545

物理的手法を用いたDNA解析

○黒澤 修¹、岡部 敬一郎¹、加畑 博幸²、鷲津 正夫² (¹(株)アドバンス、²京大・工・機械工学)

図2はPCR解析の結果である。Mはマーカー、Cはλ DNAをテンプレートとしたもの、1から6が切断回収したDNA試料である。レーン1~5 (2,3は部分的にコントラストをあげている)にはL及びRからの2本のバンドのみが増幅されている。

この結果は、ゼラチン薄膜をキャリア層として用いれば、DNA上の任意の部位を切断・回収し増幅できること示している。

1.はじめに 筆者らは、基板上に伸長固定したDNAの任意の部位を切断し、その断片を回収して解析するという、位置情報を有したDNA解析法の開発を行っている。前回、アガロース薄膜上で切断回収したDNA断片をPCR解析した結果、1)切断したDNAのみからの増幅断片が得られる、2)切断したDNA以外からの増幅断片が得られる、3)全く増幅断片が得られない、という結果であった。これは、アガロース薄膜に十分に溶解できないことが原因であった。

そこで今回は、ゼラチン薄膜を用いてDNAを切断回収した

2.実験及び結果 図1-aに示すプライマーを用いて、図1-bの位置をAFM探針で切断したDNAをPCR増幅すると、増幅断片はプライマーL,Rから増幅される2つのバンドとして得られることとなる。

O.Kurosawa, K.Okabe, H.Kabata, M.Washizu : A Novel DNA Analysis Using Physical DNA Manipulation

3G1615

原子間力顕微鏡を利用した新規インジェクションシステムの開発

○西田 周平、猪飼 篤 (東工大・生命理工)

原子間力顕微鏡 (AFM) は表面微細構造の可視化装置としてのみならず、その高い空間制御能を利用した、ナノスケール操作デバイスとしての可能性を持っている。我々は、AFM探針を利用して、細胞または細胞内小器官の限定領域に微量の生体分子を打ち込む、新規なインジェクションシステムの開発を行った。

インジェクションは、AFMカンチレバー先端にZnOウィスカを固定し、表面をAuコートしたウィスカ探針で行う。マウス繊維芽細胞に対する穿刺実験では、ウィスカ探針が細胞内に入る様子をフォースカーブから確認した。生体分子の固定は、有機合成により得られた、近紫外線に応答する光解裂性架橋剤 (図) を用いて行った。この多官能性分子はジスルフィド結合を有するので、Au-S結合を介し、容易に任意の生体分子をウィスカ探針上に固定することができる。架橋剤の光解裂能の検証する実験は、金の細線を用いて行った。蛍光色素でラベルしたタンパク質を、光解裂性架橋剤を用いて金線表面に固定した後、この金線をアガロースゲル薄膜内に穿刺した。365nmの紫外線を5分間照射した後の観察で、金線近傍のアガロースゲル中に拡散したタンパク質の蛍光を確認することができた。現在、ウィスカ探針を用いた細胞内へのタンパク質インジェクションを試みている。

図 光解裂性架橋剤

S. Nishida, A. Ikai : Novel Injection Method using Atomic Force Microscope