3K1330

エンドソームに取り込まれた微粒子の蛍光相関分光法による観測

○吉田 直人、金城 政孝、田村 守（北大・電子研・超分子分光）

【序】近年、その優れた空間分解能（約 0.25nm）と感度の高さに着目し、蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy : FCS）の単一細胞内部における物質挙動研究への応用が試みられている。我々は現在、FCS を利用した細胞内メンブレントラフィック（小胞輸送）の研究に着手している。今回は、食作用（液相エンドサイトーシス）によって培養ウシ血管内皮細胞内のエンドソームに取り込まれた蛍光微粒子の測定を行い、得られた情報より、エンドソーム内部の環境やエンドソーム自身のダイナミクスについて分析、検討を行った結果を報告する。

【測定】培地にローダミンでラベルしたラテックス微粒子（直径 14 nm 及び 35 nm）を適量添加した。30 分後、培地に残った微粒子を洗浄除去し、FCS 測定を開始した。細胞内部（サイトゾル）に対物レンズの焦点を合わせ、微粒子の自己相関関数の測定を行った。そして、得られた自己相関関数を 2 次元モデル式を用い、最大 3 成分のフィッティングによって解析した。

【結果、考察】ほとんど全ての測定部位において、比較的速い拡散定数 (10^{-8} - 10^{-7} cm²/s) を持つ成分と遅い拡散定数 ($< 10^{-8}$ cm²/s) を持つ成分が検出された。前者は、エンドソーム内部における微粒子の拡散に由来するものと考えられ、拡散定数の平均値は純水中での値に比べ 40 - 50% であった。この結果は、エンドソーム内部の環境が水に近いことを示唆している。また、後者は、エンドソーム自身の運動に起因するものと考えているが、更に検討を進めているところである。今回の結果より、FCS が細胞内における物質ダイナミクス研究の手段として有力であることが示された。

N. Yoshida, M. Kinjo, M. Tamura : Observation of endocytosed microspheres using fluorescence correlation spectroscopy

3K1400

双方向的な自由エネルギー変換を行う確率的能動輸送モデル

○宗行 英朗¹、深海 隆明^{1,2}（¹東工大・資源研、²日本ロシエ（株）研究所 化学部）

我々はイオンポンプによる能動輸送の一般的な法則を理解するために、バクテリオロドプシンによるプロトン輸送を参考に確率的なモデルを提出した (Biophys. J. 78, 1166-1175 (2000))。このモデルでは内部に三ヶ所のイオン結合部位を持つイオンチャンネルを仮定する。そしてエネルギー化によりその結合部位のイオンに対する親和性がランダムに変化するものとし、イオンの確率的な移動を計算機によりシミュレートした。その結果、輸送されるイオンに対し、入り口側と出口側で親和性が異なるとき、中央の結合部位の親和性の変化だけで一方向性の輸送が起こることが示された。このモデルに適当なパラメーターを入れることにより、すでに知られているバクテリオロドプシンによるプロトン輸送特性を定性的に再現することが出来た。また、中央のイオン結合部位の親和性の変化（蛋白質の構造変化に対応すると考えられる）は、イオンの結合部位間の移動に比べて遅いほうが、効率よく輸送を行えること、親和性の変化の速度によって、膜電位やイオンの濃度勾配に対する輸送速度の依存性が変化すること、入り口側と出口側のイオンに対する親和性の非対称が重要な役割を果たすこと、等が示された。しかし、このモデルではエネルギーの流れは「入力によるエネルギー化」⇒「出力としてのイオンの移動」への一方向しか考慮されておらず、入力エネルギーを自由エネルギーとして捉えることも困難であった。そこで本研究では、さらにこのイオンチャンネルを二つ並列に並べ、その両チャンネルのイオン結合部位間でエネルギーが流れる、と言う形で双方向の自由エネルギー変換を扱えるように改良を試みている。このモデルは能動輸送だけでなく、方向性を持った運動一般についての隠喩的なモデルになると考えている。

E. Muneyuki and T. A. Fukami : A stochastic channel model for free energy transduction

3K1345

高時間分解能電気測定・分光測定によるハロロドプシンポンプ機能の解明

○柳沢 好美¹、大友 純²、大谷 弘之³、宗行 英朗¹（¹東工大・資源研、²（株）日立製作所・ライフサイエンス推進事業部・開発本部、³東工大・生命理工・生体分子）

ハロロドプシンは高度高塩菌のもつレチナル膜蛋白質で、光を吸収してそのエネルギーで塩化物イオン (Cl⁻) を菌体内に輸送する、単一のポリペプチドから成るイオンポンプである。ハロロドプシンの光化学反応サイクルを調べることにより、蛋白質の状態変化が追跡できる。またつい最近、結晶構造が発表され、蛋白質の中の Cl⁻ の位置が明らかになった。(M.Kolbe 2000.288.SCIENCE) 我々は、ハロロドプシン分子内の電荷移動の高時間分解能測定を行って、光化学サイクルと対比することにより、主な電荷移動が N 中間体の生成と崩壊の時に起こることを提案した。しかし、結晶構造と照らし合わせても、この電荷移動が具体的に蛋白質の中のどの部分で起こるかは、明らかでない。この点を明らかにするには、一次構造の異なったハロロドプシンによる Cl⁻ 輸送の比較や変異導入による研究が必須である。そこで本研究では、H.salinarum 由来のハロロドプシンとの比較を行う目的で、shark 株由来のハロロドプシンを含んだ膜画分を、高分子膜表面に吸着し、レーザーフラッシュで励起することにより、single turnover 中の電荷移動を測定した。その結果、salinarum 由来のハロロドプシンと同様の二種類の時定数を持つ電荷移動が観察された。ところで、ハロロドプシンは、発現系を用いた遺伝子操作は進んでおらず、世界的に見ても、ほとんど変異体の解析が行われていない。そこで本研究では、今後、結晶構造を参考に主要残基に対して変異導入を行い、その輸送活性・光化学反応サイクルへの影響について検討する予定である。

Y.Yanagisawa,J.Otomo,H.Ohtani and E.Muneyuki : Chloride transport by Halorhodopsin

3K1415

ホモロジーモデリングによる Na⁺/K⁺-ATPase の陽イオン結合部位

○小川 治夫、中迫 雅由、豊島 近（東大・分生研・蛋白質解析）

Na⁺/K⁺-ATPase は P-type ATPase を代表するイオンポンプで、細胞内外の電位調節に関与する。ATP 1 分子の消費に共役し、3 個の Na⁺ を細胞外に放出し、2 個の K⁺ を細胞内に取り込む能動輸送を行う。その原子構造は未だ提示されておらず、イオン結合様式などは明らかではない。だが、変異体実験の結果や、膜内のイオン結合部位と推測される部位のアミノ酸構成が他のポンプと類似していることから、イオン結合様式には共通性があると推測される。また、膜内構造の自由度が少ないことを考慮すれば、この部位の既知構造に基づいて、Na⁺/K⁺-ATPase でのイオン結合様式を推定できる可能性がある。

我々は、P-type ATPase である筋小胞体 Ca²⁺-ATPase に関し、Ca²⁺ 結合状態の原子構造を明らかにした。また、低温電子顕微鏡法による低分解能 (8 Å 分解能) の Ca²⁺ 非結合状態の密度図との比較から、Ca²⁺ 非結合状態の原子構造をも推定した。

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase での 2 つの状態は、Na⁺/K⁺-ATPase での Na⁺ 結合状態 (Ca²⁺ 結合状態) と K⁺ 結合状態 (Ca²⁺ 非結合状態) にそれぞれ対応すると考えられる。そこで、筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の 2 状態の原子構造を基にホモロジーモデリングを行い、Na⁺/K⁺-ATPase のイオン結合部位の構造を検討した。

H. Ogawa, M. Nakasako, C. Toyoshima : Homology modelling of the cation binding sites of the Na⁺/K⁺-ATPase