1K1345

放射光真空紫外円二色性分散計を利用したアミノ酸と糖の構造解析

○松尾 光一¹、福山 剛之¹、月向 邦彦^{1,2} (¹ 広大院・理、² 広大・放射光)

円二色性 (CD) は生体分子などの光学活性物質の立体構造解析に広く活用されているが、市販の CD 分散計では 190nm 以下の真空紫外領域における CD スペクトルの測定が困難である。そこで我々はこれまで、広島大学放射光科学研究センター (HiSOR/HSRC) の放射光源を利用して、水溶液中で 140nm までの CD スペクトルが測定できる真空紫外円二色性 (VUVCD) 分散計の開発を行ってきた。今回はこの VUVCD 分散計を用いて、種々のアミノ酸および糖類の VUVCD スペクトルを測定し、真空紫外領域における CD の理論的帰属を試みるとともに、本装置の有効性について検討した。

単糖類である D-Glucose、D-Mannose、D-Xylose、D-Lyxose、D-Galactose 水溶液の CD 測定を行った結果、ほとんどが 170nm 前後に正の大きなピークを持つものに対して、D-Galactose は 170nm 付近に負のピークと 180nm 付近に負の肩を持つことが観測された。また、二糖類の Maltose は 170nm 付近に正のピークを示すものに対して、Lactose では負のピークが観測された。これらのピークは糖のアセタール結合やヒドロキシル基による遷移であると考えられる。L-Alanine、L-Valine、L-Leucine、L-Isoleucine などのアミノ酸は 200nm と 180nm 付近に正のピークを示し、側鎖が大きいほどその値は大きくなった。L-Alanine の旋光度を、X 線結晶構造およびモデル化した構造をもとに時間依存密度汎関数法により計算した結果、200nm と 180nm 付近の正のピークはカルボキシル基の電子遷移によることが確認された。しかし、計算で得られた VUVCD スペクトルは実測値と大きく異なっており、アミノ酸近傍での水分子の構造の影響を考慮しなければならないことが分かった。いくつかの多糖類や蛋白質についても測定した結果、本装置はこれまで不可能であった高エネルギー遷移に基づく構造解析に有効であることがわかった。

K. Matsuo, T. Fukuyama, and K. Gekko : Structural Analysis of Amino acids and Sugars using Synchrotron Radiation Vacuum Ultra-violet Circular Dichroism Spectrophotometer

1K1415

固体および生体表面で得られるタンパク質の力学的延伸曲線の解析

○Afrin Rehana、猪飼 篤 (東工大生命理工)

The atomic force microscope (AFM) allows us to directly apply force on protein molecules with nanometer and piconewton precisions. When the AFM tip presses sample protein molecules onto a solid surface, it is possible to measure their hardness in terms of Young's modulus (E), and when the tip pulls them up, the tensile strength of protein molecules can be studied. We measured the change in hardness of protein molecule as the concentration of denaturant is increased. In 6 M guanidium chloride, sample protein gave an approximate value of E between 1-10 MPa. When this value is compared with an estimated value of E for the native protein in the range of 0.1-1 GP, the change in E upon denaturation is truly remarkable. The volume change upon denaturation is estimated to be approximately 30 times. It is possible to distinguish denatured and non-denatured molecules in the transition zone based on the hardness of individual molecules. We have also studied force curves obtained on the surface of living cells and analyzed the rupture force at the end of pulling as the force to pull out some of the membrane proteins after the formation of covalent crosslinks with the AFM tip.

Reference:

A. Ikai, R. Afrin, A. Itoh, Hans Christian Thogersen, Y. Hayashi and T. Osada: Force Measurements for Membrane Protein Manipulation, Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces, 23 (2002) 165-171.

R.Afrin, A.Ikai : Analysis of Force Curves of Proteins Obtained on Solid and Biological Surfaces

1K1400

赤外分光法によるカルシウム結合タンパク質と金属イオンとの相互作用の解析-合成カルシウム結合ペプチドによるアプローチ

○奈良 雅之¹、森井 尚之²、湯本 史明³、鍵 裕之⁴、田之倉 優³ (¹ 東医歯大・教養、² 産総研、³ 東大院・農学系、⁴ 東大院・理学系)

【序】カルシウム結合タンパク質は、Ca²⁺ との相互作用によりその機能が発現することが知られている。結合部位に相当する合成ペプチドアナログは、Ca²⁺ による機能発現機構を理解するための有用なアプローチになると考えられる。本研究ではウサギ骨格筋トロポニン C の結合部位 III の合成ペプチドアナログを用いて、赤外分光法によりペプチドと金属イオンとの相互作用を調べた。【実験】ペプチドは、PSSM8 ペプチド合成装置 (島津) を用いて固相法により合成した。FTIR 測定にはスペクトラム 2000 (パーキンエルマー) を用いた。試料 (重水溶液) を 2 枚の BaF₂ 板に挟み込み、TGS 検出器を用いて、分解 2 cm⁻¹、室温にて積算回数 200 回でデータを収集した。【結果と考察】EF ハンドモチーフ (ヘリックス-ループ-ヘリックス) に相当する 34 残基ペプチドは Ca²⁺ 負荷状態では 1552 cm⁻¹ に COO⁻ 逆対称伸縮バンドを示した。このバンドは結合部位 12 番目のグルタミン酸残基の側鎖 COO⁻ 基が Ca²⁺ と二座配位型で結合することに由来する。このバンドをマーカーとして、数種類の鎖長を変えた合成ペプチドアナログの赤外スペクトルを調べた。カルシウム結合部位には相当する 13 残基ペプチドでは、Ca²⁺ 負荷状態でもこのバンドは現れなかった。しかし、このペプチドに C 端側に 4 残基伸びた 17 残基のペプチドでは、このバンドは観測された。したがって、N 端側のヘリックスがなくてもカルシウム結合サイトは Ca²⁺ と結合するが、C 端側のヘリックスが欠けると Ca²⁺ との結合性が低下する可能性が高いと考えられる。合成ペプチドアナログと Mg²⁺ との相互作用についても合わせて報告する予定である。

M.Nara, H.Morii, F.Yumoto, H. Kagi and M.Tanokura : Analysis of the interaction between synthetic calcium binding peptides and a metal ion by infrared spectroscopy

1K1430

固体基板上的脂質 2 分子膜に特異的に結合した 20S プロテアソームの AFM による液中観察

○古池 晶¹、山田 眞平²、山崎 昌一³ (¹ 静岡大院・理工・物質科学、² 静岡大・理・生物、³ 静岡大・理・物理)

水溶液中の蛋白質の構造やその構造変化を原子間力顕微鏡 (AFM) で精度よく測定するためには、蛋白質を固体基板上に配向性よく結合させることが重要である。さらに固体基板上で 2 次元結晶を作成することができれば高分解能の構造解析も可能になると考えられる。この目的のために、固体基板上への脂質 2 分子膜の固定と、その膜表面への蛋白質の特異的な結合の研究を AFM を用いておこなった。

まず、ラングミュア-ブロッジエット法を用いて雲母基板上へ脂質 2 分子膜の構築を行い、その表面を AFM で観測した。ゲル相、液晶相に関わらず、緩衝液中で脂質 2 分子膜の表面構造が 1 nm の高さの分解能で測定でき、適当な強度をもった平滑表面であることが確認された。

次に、その脂質 2 分子膜上に蛋白質を特異的に結合させることを試みた。蛋白質としては、蛋白質分解酵素 20S プロテアソームの触媒ユニットである蛋白質複合体 20S プロテアソームをウシ赤血球から精製して用いた。種々の脂質 2 分子膜への 20S プロテアソームの結合を調べたところ、ホスファチジルイノシトール (PI) を含むステアロイル-オレオイルホスファチジルコリン (SOPC) の液晶相の脂質 2 分子膜にのみ配向性を持って結合することを見出した。その膜表面に高密度に結合した 20S プロテアソームは、2 nm の分解能で、緩衝液中で観察することができた。SOPC をはじめ、正電荷を持つ膜、負電荷を持つ膜などの脂質 2 分子膜表面への 20S プロテアソームの結合は見られなかったことから、20S プロテアソームは PI と特異的に相互作用して脂質膜に結合したと考えられる。現時点では 2 次元結晶は得られていないが、この系で緩衝液中の 20S プロテアソームの大きな構造変化の観測が可能となった。

S. furuike, S. Yamada, M. Yamazaki : 20S proteasome on supported lipid bilayers studied by in situ atomic force microscopy