1K1445

転写因子タンパク質と DNA 間の特異的相互作用の直接測定

○清水 裕一郎¹、鈴木 武博¹、小板橋 龍二¹、藤田 昌也²、栗原 和枝¹ (¹ 東北大多元研、² 国立遺伝研)

【緒言】 近年、タンパク質と DNA 間の相互作用の解明に関心が寄せられている。転写時、枯草菌において、転写因子である Spo0A は、OAbos と呼ばれる DNA 塩基配列 (TGTCGAA) と相互作用することが予想されている。そこで本研究では、Spo0A の DNA 結合ドメイン (Spo0A-DB) と OAbos 塩基配列の DNA 間の相互作用をコロイドプローブ原子間力顕微鏡 (AFM) により直接測定した。また、異なる塩基配列の DNA についても同様に測定し、比較検討した。【実験】

AFM のカンチレバー上の疎水化したガラス球上に、アビジンを吸着させたビオチン脂質を累積し、更にビオチン修飾 DNA を吸着させた。また対面する試料として、ポリヒスチジン修飾 Spo0A-DB を吸着させた銅イオンを配位させたキレート単分子膜を疎水化したガラス基板上に累積した。AFM を用いて、1.0 mM NaCl を含む 0.1 mM Tris 緩衝溶液中で pH を変化させて表面力測定を行った。【結果と考察】 引き離し時、Spo0A-DB / DNA 間で、pH 5~8 において接着力が観測された。その接着力は塩基配列の違いにより、大きさに違いが出た。例えば pH6 における接着力の最大値は、OAbos と同一の塩基配列を持つ DNA は 0.77 mN/m、OAbos の塩基配列を 1 塩基だけ変えた DNA は 0.43 mN/m、4 塩基変えた DNA は 0.21 mN/m の接着力が観測された。他の pH においても、大きさは違うが傾向は全く同じであった。これは、接着力の直接測定により、塩基配列の違いを識別可能なことを示し、Spo0A-DB は OAbos を認識して特異的に結合していることを示した。

Y.Shimizu, T.Suzuki, R.Koitaabashi, M.Fujita, and K.Kurihara : Direct measurement of specific interactions between transcription factor protein and DNA.

1K1515

単粒子解析における空間相関法を用いた 3 次元再構成法の考察

○上野 豊、佐藤 主税 (産総研・脳神経)

粒子の向きがランダムな試料から電子顕微鏡で単粒子解析をする方法として angular-reconstitution 法が開発されている。しかしながら、粒子の対称性が低い場合には、コモンライン定理をよりどころにした 3 次元再構成が難しいという問題点がある。このため、新しい解析手法として空間相関法の適用について検討を行っている。空間相関法は、Kam によって提案された統計的手法で、粒子の 3 次元密度関数を球面調和関数で展開した動径分布関数の組によって構造を表現すると、空間相関関数が簡素な関係となることを利用している。これまでにヒト乳頭腫ウイルスの単粒子解析における 3 次元再構成の例が報告された。しかしながら、正 20 面体の構造解析では従来法による解析が先行し、この手法の有用性が十分検討されなかった。一方、今回注目している問題は、対象性が未知な粒子の 3 次元再構成であるため、最終的な解析結果は従来法を用いるとしても、対象性の決定に有効な統計手法となる期待がある。そこで、より堅実な手順を検討する。ピックアップした単粒子画像をフーリエ変換し、積算して得られる空間相関関数は、投影角の推定に依存しない観測量となる。この段階で、主成分となる球面調和関数の次数から、粒子の対称性を判断できる期待がある。また、3 次元再構成においては、従来法によって投影角を推定して得た 3 次元モデルの空間相関関数と比較し、一致度の良いモデルを採用することで、対称性の低い粒子でも確実な 3 次元再構成が期待できる。現在、モデル構造を用いた計算機シミュレーションを行っている。

Y.Ueno and C.Sato : Single particle analysis using spatial correlations for symmetry determinations and low symmetry particles

1K1500

酵素-基質複合体における特異的相互作用の直接測定と基質結合部位の評価

○鈴木 武博、張 元偉、古山 種俊、栗原 和枝 (東北大・多元研)

【目的】 分子間相互作用は生体機能の発現に重要であり、その具体的な解明に、直接測定は重要な情報を与えられられる。しかしながら従来、タンパク質の相互作用の研究は、抗原-抗体など非常に例が限られていた。そこで本研究では、単独では酵素触媒機能を持たないが、基質 FPP と Mg2+ 存在下のみで会合して酵素機能を発現する、ヘプタプレニルリリン酸合成酵素のサブユニット I 及び II を、ガラス表面に固定化し、コロイドプローブ原子間力顕微鏡によりサブユニット表面間に働く力を直接測定した。さらに、吸着測定により FPP 結合部位の検討を行った。【実験】 疎水化したガラス表面に銅イオンを配位させたキレート単分子膜を累積し、ポリヒスチジン修飾タンパク質 (サブユニット I 及び II) を吸着させ、測定試料とした。測定は、0.1 mM Tris 緩衝溶液 (NaCl 1 mM, FPP 15 μ M を含む) 中で、Mg2+ 濃度を変化させて測定を行なった。また、QCM を用いたサブユニット膜への FPP の吸着を測定した。【結果・考察】 サブユニット I-II 表面間の相互作用測定において、Mg2+ または FPP を加えた溶液条件では、接近、引き離し時共に斥力であった。しかし、溶液に Mg2+ と FPP を共に加えたときのみ、引き離し時にタンパク質に特有な接着力が観測された。一方、同一サブユニット表面間では、全ての条件で斥力しか観測されなかった。これは、サブユニット I 及び II が、Mg2+ と FPP が存在しているときの酵素反応が進行することに対応し、基質存在下でのサブユニット I-II 間の特異的な相互作用を直接測定できた。さらに、この接着力の大きさは Mg2+ 濃度に依存し、酵素活性とほぼ対応した。また、QCM により、FPP はサブユニット II に Mg2+ が存在する場合にのみ吸着することを確認している。

T.Suzuki,Y.Zhang,T.Koyama and K.Kurihara : Direct Measurement of Specific Interaction between Enzyme-substrate Complexes and Characterization of Substrate Binding-Site

1K1545

マイクロアレイ及び 3 D-E P 解析のためのスライスゲル電気泳動の開発

○森 正輝、西垣 功一 (埼玉大・工・機能材料)

試料の「微量多重並列処理」や「多段階解析」は、研究の種類によらず益々重要になっている。この目的のために種々なアプローチが考えられるが、筆者らは汎用性の高い方法として、スライスゲル電気泳動法を開発したので発表します。この方式ではゲルの調製は三次元的立体を一旦 1mm 厚程度のスライスとして分解した状態で作成する。この方式の有利さは、基本的には、ゲルの物性として高分子に対する高い拡散抵抗性に由来している。例を挙げれば、(1) 予め分離層の一部のスライスゲルに対して i) トラッピング層、ii) フィルタリング層、iii) 反応層などの属性を持たせて泳動することで、泳動試料に対して「作用」を仕掛けることが可能となる。(2) またこの系は (m $\times$ n) ドットのマイクロアレイでの反応産物をそのまま平面状態で一斉に泳動し、ハイスループットに処理できる。(3) 分離後、目的とする試料を含む層のスライスゲルを容易に取り出し次段の処理にまわすことができる。これらを適宜組み合わせ利用することで、これまでにない多様な分離・解析の用途が拓けると考えられる。また、当然、従来のスラブゲルによる 2 次元展開産物をさらに第三の分離原理により 3 次元分析する道 (3D-EP) を開いていることにもなる。さらに言うならばスライスゲル自体がそのまま反応容器として用いうる利便性は大きい。これらの特徴を引き出した実験を具体的に示す予定である。

M. Mori and K. Nishigaki : Development of slice-gel electrophoresis : A devise auxiliary to 3D-EP/microarray