2K1700

核共鳴非弾性散乱によるミオグロビン鉄の振動スペクトル

○原見 太幹¹、北尾 真司²、春木 理恵²、三井 隆也¹、小林 康浩²、瀬戸 誠² (¹ 原研 放射光科学研究センター、² 京大 原子炉実験所)

ミオグロビンは分子量約18 kDのヘム蛋白質で、酸素分子を可逆的に蓄積する。153個のアミノ酸は折り畳まれ、1個のヘムグループを包んで8個のアルファヘリックスを作っている。酸素や一酸化炭素のような小さな配位子は空洞の遠位ヘムポケット側から鉄に可逆的に結合する。配位子は蛋白質の表面と活性中心を結ぶ立体構造の揺らぎでできる通り道を通して入ったり、そこから出たりする。蛋白分子は構造的に少しずつ違ったコンフォメーションサブ状態からなっているとすると、サブ状態間の揺らぎが温度によって活性化される。生理温度ではサブ状態間の遷移は速く行われるが、低温では特に200 K以下では各分子が違ったサブ状態に凍結される可能性が高まる。鉄原子の測定から、200 K以下では調和振動の振る舞いをするが、この温度以上では他のダイナミックな運動が始まり、Debye-Waller 因子を急激に減らし、平均2乗変位を増加することになっている。核共鳴非弾性散乱は、SPring-8のような高輝度放射光施設が完成することによって可能となった測定方法である。この方法を利用すると、平均2乗変位を示すより詳細な原子の運動スペクトルを得ることができる。メスバウアアイソトープを含む液体や固体のダイナミックスの研究に利用されている。今回、ミオグロビン溶液を試料とし、SPring-8 BL11XUにおいて核共鳴非弾性散乱実験を行った。Si(511)とSi(975)からなる高分解能モノクロメータ(2.5meVバンド幅)を使用した。エネルギーは弾性散乱の周り±60meVの範囲で測定した。結果の詳細は発表で述べる。

T.Harami,S.Kitao,R.Haruki,T.Mitsui,Y.Kobayashi and M.Seto : Vibrational spectra of myoglobin iron by nuclear resonant inelastic scattering

2L1330

細胞サイズリポソームはその形成時にDNAを濃縮するか？

○佐藤 祐子^{1,2}、野村 M. 慎一郎³、吉川 研一² (¹ 名大院・環境・物質環境構造、² 京大院・理・物理、³ 東京医歯大・生体材料研)

[緒言] 原始の海で生成した核酸や蛋白質などの高分子が膜に包まれて現在のような生物の姿になるためには、どのような環境条件が必要だったのだろうか？ 演者らは、原始生命がDNAを核として自発的に膜に包まれた細胞様構造を形成したという可能性を考え、細胞サイズリポソームとT4DNAを用い、リポソーム形成時におけるDNA濃縮の効果について調べた。また、二価カチオンであるMg²⁺を用い、濃縮係数がどのように変化するかを検証した。

[方法] 細胞サイズリポソームは、リン脂質の乾燥フィルムをDNA水溶液で静置水和して調製し、リポソーム形成の際のDNA封入の割合について調べた。蛍光顕微鏡観察において、直径1 μm以上のリポソームの数と、内部にDNAを含有するリポソームの数、また、リポソームの内部に存在するDNAの数をカウントした。全溶液の体積とリポソーム内部の体積を概算し、DNA分子のバルク溶液中の濃度と計測されたリポソーム内部溶液中のDNA分子数との比からDNAの濃縮係数を求めた。

[結果] 中性リン脂質 L-α-Phosphatidyl-DL-Choline, Dioleoyl [DOPC] リポソームの場合、Mg²⁺存在下でのDNAの濃縮係数は17であった。このことは、リポソームの外側よりもリポソームの内側に17倍多くDNAが存在することを示している。また、Mg²⁺存在下でのDNAの濃縮係数は、Mg²⁺非存在下と比較して約60倍高くなることがわかった。さらに、アニオン性リン脂質リポソームで同様の実験を行った結果、DNA濃縮が起こりにくいことがわかった。以上より、リポソームが自発的に細胞サイズの閉鎖空間を形成する際、溶液中の高分子をカチオンを介して濃縮し、取り込む可能性が示唆された。このことは高分子-低分子の自己集合過程から生細胞系へとつながる道程として期待される。

Y.Sato, S.-i.M.Nomura, K.Yoshikawa, : Spontaneous Formation of Cell sized Liposome Entrapping DNA

2K1715

ヘムオキシゲナーゼは如何にして酸素と一酸化炭素を識別するか？

○杉島 正一¹、坂本 寛²、野口 正人²、福山 恵一¹ (¹ 阪大院・理・生物科学、² 久留米大・医・医化)

ヘムオキシゲナーゼ(HO)はNADPH-チトクロムP450還元酵素からの還元力と酸素分子を用いて、ヘムのα-meso炭素を部位特異的に酸化し、ヘムをビリベルジンIX α、一酸化炭素、鉄に分解する。一酸化炭素は有機溶媒中のヘムに対して酸素分子の数万倍の親和性を持ち、ヘモグロビンやミオグロビン中のヘムに対しては数百から数十倍程度の親和性を持つ。それに対して、HO中のヘムに対する一酸化炭素の親和性は酸素分子の数倍程度と低く抑えられており、HO特有の配位子の識別機構が考えられる。また、HO-ヘム複合体に対する酸素分子の結合反応は一相であるのに対して、一酸化炭素の結合反応は二相性であるという特徴がある。

我々はHO中のヘムに対する一酸化炭素の結合抑制機構を明らかにするために、HO-ヘム複合体に対して一酸化炭素およびシアンを結合させ、それらの立体構造をそれぞれ1.9 Å、2.0 Å分解能で決定した。その結果、一酸化炭素やシアンはヘム面に対してほぼ垂直に配位し、ヘムは軸配位子を結合した状態でα-meso炭素方向へ約0.8 Å、遠位側ヘリックスは逆方向に約0.9 Å移動していた。この構造変化は垂直に結合した配位子と遠位側ヘリックス間の立体障害を避けるために起こると考えられる。事実、酸素分子と同様にヘム面に対して平行に結合するアジドが結合した場合には、このような構造変化は見られなかった。また、このような構造変化に伴い、HOとヘムとの間の静電相互作用が弱まっていた。これらの結果からHOは一酸化炭素と酸素分子をヘムとの結合角によって認識し、一酸化炭素のヘムへの親和性を抑制し、また一酸化炭素を二段階で結合すると考えられる。

M.Sugishima, H.Sakamoto, M.Noguchi and K.Fukuyama : How does heme oxygenase discriminate carbon monoxide from dioxygen?

2L1345

秩序液体相の膜の巨大リポソームの生成とその特性

○山下 裕子¹、田中 智樹²、山崎 昌一¹ (¹ 静岡大・理・物理、² 静大院・理工・物質科学)

Liquid-ordered phase (*lo* phase) of lipid membranes, which is an intermediate phase between liquid-crystalline phase and gel phase, has attracted much attraction in both biological and biophysical aspects. In this report, we have prepared giant liposomes of lipid membranes in the *lo* phase and investigated their properties. At first, we succeeded in forming giant liposomes from dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC)/cholesterol membranes and also sphingomyelin(SM)/cholesterol membranes in the *lo* phase in water at 20-32 °C. Using these giant liposomes, we investigated interaction of methyl-beta-cyclodextrin (MbCD) with DPPC/cholesterol and SM/cholesterol membranes in the *lo* phase, and found that MbCD induced several shape changes of these giant liposomes. The analysis of these shape changes indicates that MbCD can extract cholesterol directly from the *lo* phase membrane. We have also investigated temperature dependence of diameter of giant liposomes of the DPPC/cholesterol and SM/cholesterol membranes in the *lo* phase from 50 to 25 °C. There were almost no change in the diameter, supporting that the membranes of these giant liposomes are in the *lo* phase. Applying the new method developed by us (1), we have succeeded in preparing giant liposomes of DPPC/cholesterol in aqueous solution containing high salt concentration. These new findings on giant liposomes of the *lo* phase membranes give us a new insight on physical property and function of the *lo* phase membranes and rafts.

(1)Yamashita et al., BBA, 1561, 129-134, 2002

Y.Yamashita, T.Tanaka and M.Yamazaki : Formation of Giant Liposomes of Liquid-Ordered Phase Membrane and their Physical Properties