B786

藍色細菌の時計タンパク質 KaiC に存在する二つの ATPase モチーフのはたらき

○林 史夫、伊藤 典夫、宇津巻 竜也、岩瀬 亮、石浦 正寛 (名大・遺伝子・植物ゲノム)

多くの生物において、様々な生理現象の活性が24時間の周期で変動することが知られており、これらのリズムを司る細胞内のリズム発振分子機構が「生物時計」と呼ばれている。我々は生物時計を精巧な分子装置である「生物時計装置」と捉え、生物時計装置を構築する時計タンパク質、時計関連タンパク質の諸性質・物性を解明している。時計タンパク質 KaiC は重複構造をとり、N 末端と C 末端の二つのドメインで構成され、それぞれの領域に ATPase モチーフ (Walker 's motif A、B、予想される触媒残基) が存在する。このように、KaiC は重複構造をした Walker 型の ATPase であると考えることができる。精製した KaiC は単量体であり、この単量体型 KaiC は ATP と相互作用して可逆的に六量体型 KaiC となり、ポット状構造をとる (図)。KaiC は重複構造をとるので、垂直方向に見られるダンベル状構造が KaiC サブユニットに対応し、ダンベル構造の二つの球状部分にそれぞれ ATPase motif が存在すると推定される。それぞれの ATPase モチーフのはたらきは何であろうか。本大会ではそれぞれの ATPase モチーフのはたらきについて考察する。

F.Hayashi, N.Itoh, T.Uzumaki, R.Iwase and M.Ishiura : Roles of two ATPase motif A-containing domains in the cyanobacterial clock protein KaiC

B787

ヘモグロビン存在下におけるカタラーゼの振動反応

○秀島 武敏 (千葉大理)

半透膜を介して酵素と基質を反応させると、振動反応が起きる。酵素としてカタラーゼ、基質として過酸化水素を用いた場合、周期が10数分程度の振動となる。コンピュータシミュレーションにより、振動反応を引き起こす要因は基質の半透膜の透過速度と生成物である酸素の排出速度であることが分かっている。過酸化水素の初濃度が大きいほど透過速度が大きくなり、振動の周期を短くする。周期は時間とともに次第に長くなる。

この振動反応に生成物である酸素を消費する反応を組み合わせることによって振動の周期を調節できるのではないかと考え、微量のヘモグロビンを反応系に加えた。その結果、いままでは規則的な振動がえられなかった条件において、周期は長くなるが一定でかつ振幅のより大きな振動が観測されることがわかった。ヘモグロビン濃度を増加させていくと振幅が小さくなり、振動が消失していった。さらにヘモグロビンが存在しないときには、振動の周期は酵素濃度に無関係であったが、今回は異なった結果がえられた。たとえば酵素濃度を下げた場合周期が2-3分の振動が現れた。

この振動反応系はカタラーゼに振動系に酸素とアロステリックに結合するヘモグロビンの反応系を加えた系になっている。振動パターンの変化はアロステリック効果によるものと考えられる。このように酸素と結合する物質を添加することによってカタラーゼの振動反応を制御できると考えられる。アロステリックではない系と比較するために現在、ミオグロビン存在下によるカタラーゼの振動反応について調べている。

T.Hideshima : Oscillatory reaction of catalase in the presence of hemoglobin

B788

固定化DNA-ISFETを用いたDNA複製反応の実時間モニター

○富田 允、熊谷 英郷、飯塚 毅、伏見 譲 (埼玉大・工)

本研究の最終目的は、DNAポリメラーゼによる複製反応に伴う水素イオン濃度変化を、ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) pH センサによって実時間モニターすること [Sakurai, T. and Husimi, Y., Anal. Chem., 64, 1996-7(1992)] を基礎とする小型高速DNAシーケンサの開発にある。ISFET pH センサのゲート表面にSS結合で固定化したステムループプローブDNA (Bouy DNA) に、未知配列を含むセルフプライミング一本鎖DNAの5'末端近傍をハイブリダイゼーションさせる。そこにDNAポリメラーゼとともに4種のdNTPを順次流すことで、どの塩基を流した時にDNA伸長反応が起こるか (Pyrosequencingと同原理) をISFETからの電気的な出力として検知する。この方法は大規模並列処理に適している。(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilaneにより基板にメルカプト基を導入し、ヘアピンループ部分にチオdUをもつDNAとのジスルフィド結合によりBouy DNAを固定化した。このBouy DNAはFITC蛍光ラベルされている。蛍光光度測定により固定化DNA量を定量した。その固定化量は、上記引用文献のデータが与える理論検出限界固定化量 [10^3 molecules/ μ m²] の6倍であることがわかった。また、ISFET (新電元 (株) より贈与) ゲート表面にセルフプライミング構造を持つ一本鎖テンプレートDNAを固定化し、その複製反応をDNAポリメラーゼ (Klenow Fragment) とdNTPによって行ったところ、反応に伴う水素イオン濃度変化による電気的シグナルを観測することができた。

M.Tomita, H.Kumagai, T.Iizuka, and Y.Husimi : Real-time monitoring of DNA replication reaction with DNA immobilized ISFET

B789

赤血球連鎖形成による誘電スペクトル変化に関する境界要素法計算

○関根 克尚¹、松尾 亜弥¹、飛田 由佳里²、日比野 千春¹、浅見 耕司³ (¹金大・医・保健、²ファルコバイオシステムズ、³京大・化研)

赤血球は両面がくぼんだ円盤の形状をもつ。血液を静置すると赤血球が円盤を積み重ねたように凝集すること (連鎖形成) が知られている。入交らは以前、この連鎖形成により血球懸濁体の誘電緩和強度が増大することを実験的に見出し、誘電測定が臨床における血液検査に応用できる可能性を示した (1996)。

本研究では、境界要素法に基づいた方法を用いた理論計算を行い、連鎖形成による懸濁粒子の形状変化と血球懸濁体の誘電スペクトル変化との関係を検討した。メモリ領域と計算時間の節約のため、2次元のモデルを用い、以下の3種類を比較した：

- 単一型モデル 長方形 (長辺サイズ6、短辺2) の両短辺に半円 (直径2) を結合させた外形をもち、細胞質と細胞膜に対応する2重構造をもつ粒子。
- 連鎖型モデル 10個の単一型モデルが隙間なく長辺を接して積層した構造に対応するモデル。
- 懸濁体型モデル 10個の単一型モデルを、連鎖型モデルと同様の配向で、間をあけて並べたモデル。 (中心間隔10) 連鎖型モデルの誘電緩和強度は単一型モデルの1.4倍となった。他方、懸濁体型モデルの誘電スペクトルは単一型モデルと概ね同じであった。これらの結果は、2次元系において連鎖形成に相当する懸濁粒子の構造変化が誘電緩和強度増大を引き起こすことを示している。3次元の赤血球懸濁体でも、同様の構造変化により誘電緩和強度が増大することが強く期待できる。

K. Sekine, A. Matsuo, Y. Tobita, C. Hibino and K. Asami : Boundary-element calculations to examine the change in dielectric spectra for erythrocytes in suspension with rouleaux formation.