1P029

アクチンは動的多形をとる

○小塚 淳¹、横田 浩章²、石井 由晴³、柳田 敏雄^{1,3,4} (¹阪大院・基礎工・システム人間、²ECOLE NORMALE SUPERIEURE, LPS、³科技振・ソフトナノマシンプロジェクト、⁴阪大院・生命機能・ナノ生体)

タンパク質の構造は自由エネルギー最小値の近傍で安定化していると考えられている一方で、準安定な構造を多数持ち、熱エネルギーによってそれらの間をゆっくり揺らいでいるとも考えられている。近年、タンパク質内のヒステリシスの存在が実験的に示唆され (Lu 1998, Ishijima 1998)、タンパク質の遅い構造揺らぎがタンパク質の機能に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。これまで我々は、アクチン分子は構造的な多状態を持ち、ミオシンとの相互作用によりその分布が変化する事を示してきた。今回我々は、従来の1分子蛍光エネルギー移動 (FRET) 顕微鏡を改良し、これまでより長い時間 (～分) アクチン1分子内 FRET を計測することでアクチンには秒オーダーの遅い構造揺らぎがあることを見いだした (光学的なシャッターを用いてドナーとアクセプターを交互に励起し、蛍光像をモニターすることでプリンキングと FRET を明確に区別した)。下図では、アクチンの構造が少なくとも3つの状態を秒オーダーの時間間隔で遷移していることを直接確認できる。今回の年会では、FRET 効率の時系列解析からアクチンの構造揺らぎの時間特性について議論する。

J. Kozuka, H. Yokota, Y. Ishii and T. Yanagida : Dynamic polymorphism of actin

1P031

1分子FRET計測の標準化

○須河 光弘¹、新井 由之²、岩根 敦子¹、柳田 敏雄^{1,3} (¹阪大院・生命機能・ナノ生体、²阪大院・基礎工・システム人間系、³JST・CREST)

現在、生体分子間の動的な相互作用を観察するのに蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が広く利用されるようになった。さらに、1分子計測と組み合わせることで、1分子の構造変化を実時間で捉えることができる。しかし、重要な問題が残されている。それは、必ずしも FRET 効率の変化が蛍光分子間距離の変化を反映するとは限らないということである。例えば、蛍光色素のプリンキング、ガラス基板との衝突、また蛍光分子の偏光といったことが原因と考えられる。このようなことは、分子の結合解離や、大きな構造変化を計測する場合にはあまり問題とはならないのだが、特に、構造ゆらぎや動的な多状態といった興味深い現象を検出する場合には蛍光の不安定性による影響を検討する必要がある。

今回、構造安定性が高いポリプロリン鎖を用いることで1分子 FRET 計測の標準化を試みた。N 末をグリシン、C 末をシステインにすることで、特異的にドナー (Cy3) とアクセプター (Cy5) を標識し、アビジン・ビオチンシステムでガラス基板上に固定した。プロリンの重合度を変えたポリプロリン鎖を用いて1分子 FRET 計測を行い、アクセプターとドナーの距離と FRET 効率の距離依存性を正確に評価する。本研究により、蛍光の不安定性によるノイズと真の FRET 効率のシグナルを正確に定量し、1分子 FRET 計測によるタンパク分子の構造ゆらぎ、動的な多状態の検出法を確立したい。

M. Sugawa, Y. Arai, A. H. Iwane and T. Yanagida : Development of a quantitative measurement system for single molecule FRET

1P030

高感度分子間力顕微鏡により検出された細胞間接着分子の新しい分子認識メカニズム

○塚崎 克和¹、喜多村 和郎²、清水 一也³、岩根 敦子¹、高井 義美³、柳田 敏雄¹ (¹阪大院・生命、²ロンドン大・ウォルフソン生物医学、³阪大院・医学)

細胞間の認識・接着形成は、個体発生や組織構築、創傷治癒など多岐にわたって生体内で重要な役割を担っている。カドヘリンとネクチンは、協調的に相互作用することによって、多様な細胞間の認識・接着形成を時・空間的に制御する生体に必須な細胞間接着分子である。これらの分子はそれぞれユニークなドメイン構造を有するが、その構造がどのように細胞間の認識に関与しているかは、明らかでない点が多い。

本研究では、我々が開発してきた高感度分子間力顕微鏡を用いることにより従来の AFM などによる力計測法では計測困難であった1分子間相互作用計測に成功した。そして、様々な引っ張り速度によるカドヘリン・ネクチンの解離を観察した。その結果、引っ張り速度依存的な相互作用特性を見いだした。さらに、従来の蛋白質相互作用モデルを拡張し、相互作用の特性距離 ($x_{cad}=0.6, 17.3$ nm, $x_{nec}=2.2, 6.5$ nm) や無負荷状態における解離速度定数 ($k_{cad}=0.021, 11$ s⁻¹, $k_{nec}=2.2, 12$ s⁻¹) を定量することに成功した。

これらより、細胞間接着分子カドヘリン・ネクチンは、複数のドメインに対応した複数の認識状態を有していることが明らかとなった。

Y. Tsukasaki, K. Kitamura, K. Shimizu, A. H. Iwane, Y. Takai, T. Yanagida : Novel stable interactions between cell adhesion molecules detected using intermolecular force microscopy at sub-piconewton resolution

1P032

蛍光タンパク質の結晶構造に基づく蛍光特性の解明

○福村 栄維子^{1,2}、菊地 晶裕²、唐澤 智司³、宮脇 敦史³、城宜嗣² (¹兵庫県立大院・理、²理研・播磨、³理研・脳センター)

蛍光タンパク質は GFP に代表されるように、生細胞内において標的タンパク質の挙動をリアルタイムで観察するためのマーカーや FRET のドナー・アクセプターなどに利用されている。蛍光タンパク質の発色団は配列中に存在する3つのアミノ酸残基が自己触媒的に環状化したものである。発光特性には、この発色団の配列のみでなく、発色団とその周辺のアミノ酸残基や水分子との相互作用が関係している。そのため、発光特性を理解するには、立体構造を明らかにすることが重要である。現在、個々の蛍光タンパク質に関しては、その立体構造と発光特性の関係が議論され、色や明るさにバリエーションを持つ変異体も使われている。しかし、目的に応じた蛍光タンパク質を自由に設計するまでには至っていない。

本研究では、蛍光タンパク質の発光特性と立体構造の関係をより系統的に解析することを目的として、新規蛍光タンパク質の X 線結晶構造解析を行っている。その一つとして、クサビライシサンゴ由来のオレンジ色蛍光タンパク質を pH9.5 の条件下で結晶化し、SPring-8 BL44B2 にて X 線回折実験を行った結果、1.8 Å の分解能で構造解析に成功した。全体構造としては、蛍光タンパク質特有の β -can 構造であった。この蛍光タンパク質は、pH6.0 の条件下でも結晶化することができた。pH 感受性の高い GFP については、pH 変化による構造の違いが報告されている。しかし、今回解析を行った蛍光タンパク質は、蛍光強度の pH 依存性が低いのが特徴である。これらの構造解析における詳細な結果は当日報告する予定である。

E. Fukumura, A. Kikuchi, S. Karasawa, A. Miyawaki and Y. Shiro : Structural study on fluorescent properties of new GFP-like proteins