1P069

3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase の補酵素結合に関する遷移相速度論および熱力学解析

○片岡 佐智子¹、植田 成²、今村 茂行²、大西 正健¹、石島 純男¹、佐上 郁子¹、織田 昌幸¹ (¹ 京都府大・院農、² 旭化成ファーマ)

3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) はスクレオチド補酵素の存在下で、さまざまなステロイド基質の3 α -ヒドロキシ基、オキシ基の酸化還元反応を触媒する。*Pseudomonas* sp. B-0831 由来3 α -HSD は、単量体あたりの分子量が26k で二量体を形成している。本酵素は補酵素として、NAD(H)、NADP(H) 初め、種々のスクレオチドアナログをも利用できる点で特徴的である。また酵素の触媒活性は補酵素の種類によって大きく変化することから、補酵素結合に伴う酵素の構造変化が酵素機能に影響することが推察される。そこで本研究では、この3 α -HSD の補酵素認識機構や機能との相関を明らかにすべく、ストップフロー法を用いた遷移相速度論解析と、等温滴定型熱量計 (ITC) を用いた熱力学解析を行った。

ストップフロー解析の結果、酸化型スクレオチドである NAD⁺、NADP⁺ に対しては一段階結合であるのに対して、還元型スクレオチドである NADH は二段階結合であることが明らかとなった。このうち後者の二段階機構からは、rat liver 3 α -HSD での報告のように補酵素結合に伴う酵素の立体構造変化が示唆される。また同じ還元型スクレオチドである NADPH 結合では遷移相の変化が認められなかったことから、上記3種の補酵素とも異なる別の結合機構が示唆された。さらに得られる速度定数から算出された結合定数 (K_a) は、蛍光滴定や ITC の結果とも良い一致を示し、NAD⁺、NADP⁺ 結合で約 10^4 M⁻¹、NADH 結合で約 10^6 M⁻¹ となった。NAD⁺、NADH 両補酵素結合の ITC 測定の結果、 K_a にして約10倍の差は、主にエントロピー変化量の差に起因することが明らかになった。この結果は補酵素結合状態において、より大きな構造変化を誘起すると考えられる NADH 結合のストップフロー解析の結果と相関付けられる。

S.Kataoka, S.Ueda, S.Imamura, M.Ohnishi, S.Ishijima, I.Sagami, and M.Oda : Transient-phase kinetic and thermodynamic studies on the cofactor binding to 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase

1P071

蛍光ラベルの手法を用いた不凍タンパク質-氷結晶相互作用様式の観測

○吉田 敬幸¹、三浦 和紀²、田中 正太郎³、津田 栄^{2,4} (¹ 北大・理・生物科学、² 産総研・ゲノムファクトリー、³ 九大院・システム生命科学、⁴ 北大院・理)

不凍タンパク質は寒冷水域に生息する魚類の体内に存在するタンパク質であり、凍結温度域において体内に生成する氷結晶の表面に特異的に結合してその成長を抑制し、凍結温度を降下させる能力を持っている。不凍タンパク質は種類によって異なる氷結晶相互作用様式を有しており、それを精度良く観測する手法に興味が持たれている。現在用いられている不凍タンパク質の性能評価法として、[1] 氷結晶成長抑制時にみられる特有の氷結晶形状 (六方面錐型あるいは六方偏四角面型、一般にバイピラミダル氷結晶と呼ばれる) の顕微鏡観察、[2] 凝固点降下度測定、および [3] 氷の再結晶化 (氷結晶の拡大) 阻害観察が挙げられる。このうちバイピラミダル氷結晶の観察は不純物が混在していても可能であり、不凍タンパク質の存在を迅速に判断する為に有効な方法である。しかし、この方法では、不凍タンパク質が有する氷結晶結合様式の違いを精度良く測定することは困難である。我々は、蛍光ラベル化剤を用いて不凍タンパク質を蛍光標識し、冷却ステージを組み入れた蛍光顕微鏡を用いてバイピラミダル氷結晶を観察する方法を考案した。この方法により、注目する氷結晶の表面が蛍光を呈し、不凍タンパク質-氷結晶相互作用の様子を可視化できると期待された。タンパク質標識試薬には Fluorescein-4-isothiocyanate (FITC-I) および Sulforhodamine101 acid chloride (rhodamine) を用いた。対象としている不凍タンパク質の N 末端に塩基性アミノ酸残基に富んだ配列をつけることによりラベル化の効率を上げた。その結果、rhodamine でラベル化した不凍タンパク質の蛍光顕微鏡観察に成功した。発表では、この手法により明らかになった不凍タンパク質と氷結晶の結合様式および凝固点降下との関係について議論する。

T.Yoshida, K.Miura, S.Tanaka, S.Tsuda : Observation of the interaction manner between antifreeze proteins and ice crystal by using fluorescence labeling method

1P070

Green Fluorescent Protein (GFP) ラベル化技術を用いた不凍タンパク質-氷結晶相互作用様式の検出

○三浦 和紀¹、津田 栄^{1,2} (¹ 産総研・ゲノムファクトリー、² 北大院・理)

不凍タンパク質は、寒冷地域に生息する生物において存在が確認されている耐凍結タンパク質のひとつである。不凍タンパク質は、浸透圧を上げることなく体液の凝固点を効果的に下げ、凍結による傷害から組織を保護する働きを持っている。これまでの研究から提唱されている不凍活性発現メカニズムの概要は次のとおりである。1) 不凍タンパク質が氷核の特定の氷結晶面に特異的に結合してその成長を抑制する、2) 成長が抑制された氷結晶面に表面エネルギーの高い凸状氷結晶面が形成され、凝固点降下が発生する。しかしながら、不凍蛋白質の中には、結晶成長を抑えても凝固点降下は発生させない種類も発見されており、氷結晶成長抑制と凝固点降下の関係の詳細はいまだ不明確なままである。我々は、蛍光タンパク質である Green Fluorescent Protein (GFP) を不凍タンパク質の C 末端側につなげた融合蛋白質 (GFP-AFP) を作成し、GFP-AFP が結合した状態の氷結晶表面の観察を蛍光顕微鏡を用いて行うことで、不凍タンパク質と氷結晶との相互作用様式の解明を試みた。GFP ファミリーには、異なる蛍光特性を示す変異体が存在するので、これらを併用することにより、異なる不凍タンパク質が有する氷結晶結合能の違いや、それらの凝固点降下能との相関関係の解明が期待される。発表では、魚類由来不凍タンパク質 nfe-8 に関する GFP 融合蛋白質の発現および精製、不凍活性の確認、および、蛍光顕微鏡による氷結晶観察の結果を紹介する。さらに、nfe-8 以外の不凍蛋白質に関する実験結果とを比較検討することで、不凍タンパク質の氷結晶結合能と凝固点降下能との関係について議論したい。

K.Miura, S.Tsuda : Detection of the ice-binding manner of antifreeze proteins by using Green Fluorescent Protein (GFP) labeling technique

1P072

放電プラズマにより生成したクラスターイオンによる細菌不活化機構の解析

○西川 和男¹、八木 久晴¹、馬場 藍¹、I. Digel²、T. Demirci²、G.M. Artmann² (¹ シャープ株 電化開 C、² University of Applied Sciences Aachen)

大気圧中で交流高電圧を印加することによって形成された放電プラズマを用いて大気中の分子にエネルギーを付与すると、正極性と負極性のクラスターイオンが生成されることが知られている。さらに、これらのクラスターイオンは細菌、真菌およびウイルスの不活化効果があることも確認されている。しかしながら、これらのイオンによる不活化機構がわかっていなかった。本研究は、不活化機構の解析を目的として、イオンにより生成される活性種の同定とイオンによる細菌の脂質、蛋白質および DNA の影響を調べた。シャーレに菌液を塗布しイオン照射後、所定時間培養するとイオン未照射と比較し時間とともにその菌数の減少が見られた。そこでイオンによる生成活性種の同定はスーパーオキシドアニオン、過酸化水素およびヒドロキシラジカルの検出を行い、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素は生成されずにヒドロキシラジカルのみ生成を確認した。さらに、細菌の脂質、蛋白質および DNA にイオンが与える影響をそれぞれ確認したところ、チオバツール酸脂質は酸化による損傷を確認。細菌内の細胞蛋白質量を電気泳動法を用いて分析。その結果、蛋白質のフラグメント化が確認された。DNA の影響も電気泳動で分析。しかし、DNA には変化が見られなかった。DNA には影響を及ぼさず、細胞膜の浸透性および細胞膜蛋白質に明確な変化が見られることから、クラスターイオンの不活化機構は、放電プラズマにより生じた正と負のイオンがヒドロキシラジカルを生成し、細菌表面の膜蛋白質をフラグメント化することにより、膜機能不全が起り不活化にいたると考えられる。

K.Nishikawa, H.Yagi, A.Bamba, I.Digel, T.Demirci, G.M.Artmann : Analysis of the bacteria deactivation mechanism of cluster ions generated by plasma discharge.