1P097

非対称蛋白質電子顕微鏡画像からの効果的 3 次元再構成アルゴリズムの開発

○植山 崇¹、安永 卓生² (¹ 九工大院・情報工・情報科学、² 九工大・情報工・生命)

蛋白質の機能を解析するためには、その蛋白質の構造を知る事が必要となってくる。そこで、本研究室では電子顕微鏡を用いて蛋白質の構造解析を行ってきた。しかし、電子顕微鏡で撮影した写真は、ノイズが多くコントラストが低いことから十分な分解能の 3 次元像を得る事が困難である。現在までに、その問題を解消するための方法が数多く報告されているが、分子量 30 万以下の非対称蛋白質に対する十分な方法は報告されていない。3 次元再構成を行う上で最も問題になっているのは、切り出された 1 つ 1 つの粒子が撮影された試料の中でどの向きを向いていたのかをいかに決定するかという事である。この向き決めを行うためには、2 枚の画像のシノグラムからコモンラインを相関関数によって決定する事が最も一般的である。しかし、現在最も使用されている共相関法ではコモンラインを 1 つだけに決定する事が困難である。

そこで、我々はコモンラインを決定するための相関関数を改善する事にした。通常の共相関法は強度分布の相関関数である。そこで、強度の 1 次微分量と 2 次微分量の相関関数、さらに粒子の大きさの相関関数を新たに加えた。そして、この新規のアルゴリズムを試すために、ノイズを含まない画像を PDB のデータから作成した。そのデータを使用してアルゴリズムを試した結果、相関値を改善する事に成功した。

今後はコモンライン情報から向き決定のアルゴリズムを改良し、さらに 3 次元再構成全体のアルゴリズムをノイズに対応できるように改善していく予定である。

T.Ueyama and T.Yasunaga : Development of effective algorithms for three dimensional reconstruction from electron microscopic images of asymmetric protein

1P099

エチレンセンサータンパク質 ETR1 の大腸菌における発現系構築に向けた膜内配向性解析

○兼本 真友子^{1,2}、中村 寛夫^{1,2}、城 宜嗣^{1,2} (¹ 横浜市大院・総合理、² 理研)

ETR1 は、植物におけるエチレン受容体として同定された膜タンパク質である。現在まで ETR1 については遺伝学的解析により様々な知見が得られているが、ETR1 の具体的な構造、機能に関しては謎が多く、エチレン情報伝達機構についてのタンパク質レベルでの解析は未だ報告されていない。その理由として膜タンパク質は活性を保持した状態で単離、精製することが非常に困難であり、遺伝学的解析に比べて生化学的解析は進まない事が挙げられる。そこで本研究では、ETR1 の大腸菌における大量発現系の構築を視野に入れた膜内配向性の解析を目的とした。これは、正しい機能を持った膜タンパク質の発現には膜タンパク質が細胞膜内で正しい配向性を取ることが不可欠と考えられるためである。ETR1 のアミノ酸配列をハイドロパシープロット法にて解析した結果、ETR1 の N 末端側にあるエチレン結合ドメインには 3 つの細胞膜貫通領域が存在する事が示唆された。この予想を元に PhoA 及び LacZ を用いて ETR1 の大腸菌における配向性解析を行った。解析の結果、大腸菌細胞膜において ETR1 のエチレン結合ドメイン単独では予想された三回細胞膜貫通構造をとることは出来ない事が示された。N 末端から 2 番目の膜貫通領域に関しては、自律的に正しい配向を取ることが見出された。一方 N 末端から 3 番目の膜貫通領域の正しい配向には ETR1 の C 末親水性領域が必要である事がわかった。また、N 末端から 1 番目の膜貫通領域については、既知の膜貫通領域を N 末端に付加することで正しい配向をとらせることを可能にした。現在これらの配向性解析の結果を考慮した ETR1 の大腸菌における発現系構築を試みており、配向性解析及び発現系構築の結果について合わせて報告する予定である。

M.Kanemoto, H.Nakamura and Y.Shiro : Analysis of membrane topology of an ethylene receptor protein ETR1 for the expression in E.coli

1P098

電子顕微鏡によるタンパク質分子像の画像処理

○上野 豊¹、山本 真照²、川崎 一則¹、高橋 勝利¹、佐藤 主税¹ (¹ 産総研、² 奈良先端・情報)

電子顕微鏡による単粒子解析法は、結晶化をしない状態の構造解析が可能であるが、異なる分子や同じ分子で異なる構造をとる粒子が混在する場合には構造解析が難しくなる。そのタンパク質が本来柔軟な構造であれば避けられない。今日、多くのタンパク質の結晶構造が報告される中で、その機能を実現している構造変化についての関心が高まっている。我々は、単粒子解析法を拡張してタンパク質の構造変化を捉える、あるいは異なる配座を解析するため、画像処理によって異種の粒子を解析する手法を研究している。血清アルブミンは低分子の運搬や浸透圧調整作用のある約 70kD のタンパク質で、計測の標準分子や工学的手法によるラベリングの担体としても活用されている。結晶構造も報告され、構造変化についても X 線溶液散乱法や分光学的手法による報告があるが、生理的作用の全容は解明されていない。我々の試みた負染色法による電子顕微鏡像では、会合したり異なる構造をとる分子が見られた。分子量が小さいため単粒子解析には不利であるが、分解能が 20~30Å でよいことから、ノイズの多い高周波成分をすべてカットし、大きな粒子像もすべて無視するフィルタをかける。これによって、アルブミン分子のドメイン構造と推定されるような粒子像が見えるようになった。このようにして得られる粒子像は、一般に粒子解析と呼ばれている画像処理によって大きさや形状に基づいた異種粒子の分別が期待できる。詳細な構造解析のためには、試料調整や CTF に起因する像の強調等も考慮する必要があるが、異種粒子の存在を直感的に確認できる点が電子顕微鏡の強みである。さらにこの方法の有効性を活用した生体膜レプリカ試料像の解析も検討している。

Y.Ueno, M.Yamamoto, K.Kawasaki, K.Takahashi, C.Sato : Image processings of protein molecules in electron microscopy

1P100

MBD1-MBD とメチル化 DNA における相互作用の動的解析

○猪股 晃介¹、大木 出²、下竹 敦哉³、藤原 健一朗¹、栃尾 豪人¹、白川 昌宏¹ (¹ 横浜市大・総合理、² 生物分子工学研究所、³ 奈良先端大・バイオ)

脊椎動物に見られる唯一の生体内での化学修飾である DNA メチル化は CpG 配列中のシトシンの 5 位において起こり、クロマチン構造制御などの機構で転写調節を行う。ヒト MBD1 はメチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) を含むファミリーのうちのひとつで、DNA のメチル化部位 (メチル化 CpG 塩基対) を認識するタンパク質である。そのうち、MBD1-MBD に関してはメチル化 DNA との複合体構造も決定されている。その複合体構造は 2 回対称軸を持つ 2 本鎖メチル化 CpG 部位に対して、一分子の MBD が結合することが示されている。これは見かけ上 MBD が DNA に対して 180°異なる方向で結合する 2 津の様式が存在することを意味する NMR スペクトルの解析から、MBD とメチル化 DNA に対して 2 つの結合様式の間に化学交換があることが示された。すなわち常温・溶液中において MBD は DNA に対して、見かけ上フリップしていることが判った。この交換現象には、少なくとも以下の 2 種類の解釈が可能である。すなわち、MBD がメチル化 DNA から解離し、ランダムな向きで再結合する、という解離・再結合モデルと、MBD は DNA と何らかの会合をしながら向きを変える会合反転モデルである。我々は二つのモデルを検証するため、NMR 測定によって求められ交換速度と表面プラズモン共鳴法および水晶共振器マイクロバランス法によって得られる MBD とメチル化 DNA の結合・解離速度、さらに、と等温滴定型熱量計による熱力学的な解析も行い、比較検討した。その結果、上記 2 種の可能性のうち、会合反転モデルであることが強く示唆された。このような現象は、天然の物質間においても、さらには生体分子間においても、今までに見出された例にはなかった。生体分子間の相互作用中における交換現象としては新規に発見した現象であり、その生理機能との連関に興味がもたれる。

K.Inomata, I.Ohki, N.Shimotake, K.Fujiwara, H.Tochio, and M.Shirakawa : Dynamics of MBD1-MBD/Methylated DNA complex