2P101

含水生体分子立体構造解析のための低発熱型新規固体NMR測定法の開発

○西村 勝之、内藤 晶 (横浜国大院・工)

NMR測定はラジオ波磁場を照射するが、含水生体試料ではラジオ波照射が試料発熱を生じる。我々は試料発熱抑制を目的に、測定法の性能を制限せずラジオ波強度を抑制可能な固体NMR測定法の開発に成功してきた。これらの測定法で用いた”Time Averaged Nutation”の原理は、任意の方向へスピンロックしたラジオ波の有効磁場方向を非等価な短い時間間隔で反転させることにより、異種核間双極子結合する観測核に、時間平均された、 ^1H 歳差周波数を感じさせる手法である。

本研究ではこの概念を拡張し、 ^1H に照射するラジオ波照射の時間と有効磁場強度の双方を変化させ、異種核間磁気双極子相互作用の復活に必要なHartmann-Hahn条件を拡張した。また本測定法はオン、オフレゾナンスのどちらの交差分極条件でも同様な扱いで、観測核に必要なラジオ波の強度を任意の値に設定可能である。この概念ではこれまで開発した測定法はパルス durationを変化させた”Duration Time Averaged Nutation(DTAN)”である。ラジオ波強度のみを変化させた”Amplitude Time Averaged Nutation(ATAN)”、およびそれら双方を変化させた”Duration and Amplitude Time Averaged Nutation(DATAN)”の各々の場合について理論的、実験的に検証した。これまで開発したDTAN法に比較して、ATANおよびDATAN法では、 ^1H 核のラジオ波強度も自動的に抑制されるので、さらに著しく低発熱になることが判明した。さらに本原理をTANSEMAに適用することによりより低発熱型の2次元双極子磁場分離法DATANSEMAの開発も行ったので報告する。

K.Nishimura, A. Naito : Development of new solid-state NMR techniques of low sample heating for characterization of hydrated biomolecules.

2P103

フュージョンタグを用いたシリカ基板上へのタンパク質固定化と相互作用測定

○山口 隆広¹、鈴木 武博¹、森川 一也²、豊島 喜則³、正田 晋一郎⁴ (¹ 東北大・多元研、² 筑波大・基礎医学、³ 関西学院大・理工、⁴ 東北大・院工)

【緒言】 タンパク質間の特異的相互作用の評価には結合部位の配向が重要である。本研究ではタンパク質をシリカ基板上に固定化する手法を開発し、RNAポリメラーゼの σ 因子であるSigBとanti-SigB因子であるRsbW間の相互作用をコロイドプローブ原子間力顕微鏡(AFM)により直接評価した。フュージョンタグとしてSigBにはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、RsbWにはマルトースバインディングプロテイン(MBP)を用いた。

【実験方法】 タンパク質は大腸菌から発現させ精製した。カバーガラスおよびガラス球表面は、はじめに-OH基生成のためプラズマ処理し、結合部位として-SH基を修飾するため3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン(MPTS)蒸気中でシラン化した。次に各タグに対応する結合部位としてグルタチオン(GSH)あるいはチオマルトシド、触媒として CuCl_2 を加えた緩衝溶液中に浸漬した。最後にGST-SigBあるいはMBP-RsbWを加えた緩衝溶液中に浸漬し固定化を完了した。調製した表面はAFMイメージングとX線光電子分光(XPS)を用いて評価した。タンパク質間の相互作用は緩衝溶液中における表面間の接近、引き離し時のフォースカーブで評価した。

【結果と考察】 MPTS表面をXPSにより分析するとMPTS由来のS(164 eV付近)のピークが現れた。またAFMイメージングより1~2 nm程度の平滑表面の形成を確認した。MPTS上にGSHを修飾した表面をXPSで分析すると、GSH由来のNのピーク(400 eV付近)が現れた。これらの結果からGSHの修飾を確認した。この表面にタンパク質を固定化した表面間の相互作用測定を行った結果を発表する。

T. Yamaguchi, T. Suzuki K. Morikawa, Y. Toyoshima, S. Syouda and K. Kurihara : Immobilization of proteins to silica substrate employing fusion tags for surface forces measurement of interaction.

2P102

転写因子タンパク質およびDNA間の特異的相互作用の直接測定

○中田 良樹¹、清水 裕一郎¹、鈴木 武博¹、藤田 昌也²、栗原 和枝¹ (¹ 東北大・多元研、² University of Houston)

【緒言】 遺伝子発現を理解する上で、DNA/タンパク質間の相互作用を理解することは重要である。枯草菌の転写因子タンパク質Spo0Aは特定の塩基配列(0Abox ; TGTCGAA)と特異的に相互作用することが知られており、我々はこの特異的相互作用の研究を行っている。本研究では、コロイドプローブ原子間力顕微鏡(AFM)により特異的相互作用の直接測定を行い、塩基配列依存性を検討した。また、相互作用測定におけるタンパク質の表面密度の影響を調べるために水晶共振マイクロバランズ(QCM)を用いていくつかの濃度での表面密度の状態を吸着量から予想し、接着力をAFM測定により比較、検討した。

【実験】 タンパク質表面は疎水化したガラス表面に銅を配位したキレート単分子膜をLB法により累積し、ポリヒスチジン修飾タンパク質を吸着させ調製した。また、DNA表面は疎水化したガラス表面にビオチン脂質を同様に累積し、アビジンを吸着させ、さらにビオチン修飾DNAを吸着させて調製した。測定には、1.0 mM NaClを含む0.1 mM Tris緩衝溶液を、pHの調整にはHC 1を用いた。

【結果と考察】 塩基配列依存性 4番目のCを変えたとき、接着力の大きさは0Aboxのときのほぼ半分になった。また、これまでの結果において2番目のGも同様の結果であったが、5番目のGを変えたときはあまり変わらなかった。また、塩基配列をすべて変えたときでは接着力は非常に小さかった。このことから2番目のGと4番目のCが特異性に大きく寄与することが分かった。

表面密度依存性 タンパク質濃度を変えて吸着させ、QCM測定により吸着状態を予想し、相互作用測定を行った。(1)単分子膜状、(2)吸着量が(1)の半分、(3)過剰吸着の吸着状態を比較すると、(1)で接着力の最大値が得られた。

Y. Nakata, Y. Shimizu, T. Suzuki, M. Fujita and K. Kurihara : Direct measurement of specific interaction between Transcription Factor Protein and DNA.

2P104

3D-RISM理論による蛋白質のリガンド結合部位予測：リゾチームにおける水分子結合部位

○今井 隆志¹、平岡 隆介¹、KOVALENKO Andriy²、平田 文男³ (¹ 立命館大・情報理工、² NINT&アルパタ大、³ 分子研)

リガンド結合(分子認識)は蛋白質の機能において最も基本的な働きである。したがって、リガンド結合部位およびその結合状態の予測は、蛋白質科学における中心的な課題であり、また、創薬への応用も期待される。これまでのリガンド結合部位予測は大きく2つに分けられる。1つは、蛋白質の1次配列から情報科学的手法によりリガンド結合部位を予測する方法であるが、この方法では、蛋白質-リガンド結合状態を原子分子レベルで予測することは不可能である。もう1つは、蛋白質とリガンドの相互作用エネルギーに基づく分子モデリングの手法によるリガンド結合部位の予測である。しかし、この方法では、計算時間の制約から大胆な近似を余儀なくされ、事前にある程度の結合部位が分かっている場合を除き、分子動力学等の通常のシミュレーションではほとんど不可能である。一方、最新の溶液の統計力学理論である3D-RISM理論では、蛋白質-リガンド-水(溶媒)間の相互作用エネルギー関数から、蛋白質周辺のリガンドおよび水分子の分布関数を直接(統計力学の関係式を解くことにより)求めることができるため、結合部位に関する事前情報はまったく必要とせず、リガンド結合部位や結合状態およびその親和性を求めることができる。本研究では、3D-RISM理論による蛋白質のリガンド結合部位予測の第一段階として、リゾチームの内部および表面における水分子の結合部位および結合状態(水和構造、水和数)の予測を行った。特に、リゾチーム内部に捕捉された水分子の位置や構造は、X線結晶解析で得られたものとほぼ同じであった。また、水和数についても、(事前情報を使った)分子動力学シミュレーションと同等の結果を得た。

T. Imai, R. Hiraoka, A. Kovalenko, and F. Hirata : Prediction of ligand-binding sites of proteins by the 3D-RISM theory: Water-binding sites of lysozyme