2P109

蛍光相互相関分光法による、FEN1、PCNA および 5' flap DNA の複合体形成解析

○坂田 啓司¹、内田 真希代²、金城 政孝³、森岡 弘志² (¹ JST・研究成果活用プラザ北海道、² 北大院・薬、³ 北大・電子研・超分子分光)

FEN1 (flap endonuclease 1) は、DNA の複製および塩基除去修復過程で生じる、二本鎖 DNA から枝分かれした一本鎖 DNA の 5' 末端突出 DNA (5' flap DNA) を特異的に切断する構造特異的ヌクレアーゼである。FEN1 の酵素活性は、DNA クランプとして機能する PCNA (proliferating cell nuclear antigen) の存在下で大きく増大することが知られている。FEN1-PCNA 複合体の X 線結晶構造解析の結果、FEN1 と PCNA との相互作用は明らかにされているが、FEN1、PCNA および flap DNA の 3 者複合体の形成を観測する方法を確立することは、PCNA による FEN1 の酵素活性促進メカニズムを明らかにする上で重要である。そこで、我々は B/F (Bound/Free) 分離を要せず、溶液中で複合体形成を直接観測できる測定法として、蛍光相互相関分光法 (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy, FCCS) に注目した。FCCS は、2 色のレーザーと共焦点光学系を用いて溶液試料の微小領域 ($\sim 10 < -16 > \text{L}$) 中の蛍光強度のゆらぎを観測する方法である。今回、我々は突出した 5' 端に蛍光色素 (Atto655) を標識した 5' flap DNA と EGFP を融合させた FEN1-GFP を、PCNA の存在下で混合して FCCS 解析したところ、FEN1-GFP、PCNA および flap DNA の 3 者複合体形成を直接観測することに成功した。すなわち、PCNA 濃度上昇に伴い各々の蛍光色素の自己相関時間 (拡散時間) の増加と、相互相関関数強度の増加が観察できた。今後、FEN1 や PCNA の各種変異体タンパク質を用いた解析により、PCNA による FEN1 のヌクレアーゼ活性促進機構を明らかにしたい。

H. Sakata, M. Uchida, M. Kinjo and H. Morioka : Analysis of complex formation among FEN1, PCNA and 5-prime flap DNA by Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy

2P111

X 線イメージンテンシファイア + CCD 検出器の Point Spread Function が広角の回折強度に与える影響とその補正

○稲野 大輔、杉本 泰伸、若林 克三 (阪大院・基礎工)

近年、シンクロトロン放射光を用いた X 線小角散乱実験では、X 線イメージンテンシファイア + CCD 検出器が用いられるようになってきた。この検出器にはその構造の幾何学上、様々な問題が生じるが、小角領域においては画像歪み、コントラスト、感度不均一性に対しての補正手法 [1] が開発され、測定データに施されてきた。しかし、回折強度が弱い広角領域 (散乱ベクトル $S \geq 0.04 \text{ \AA}^{-1}$) においては、上述の補正方法だけでは補正しきれないことが明らかとなった。この原因の一つとして、コントラスト補正で用いられるコントラストが、実際の値より小さく見積もられている事によると考えられる。

検出器に入射した光子は、それぞれに Point Spread Function (PSF) がたたみ込まれた形で加算されて、強度として検出される。CCD 検出器の PSF は、分布の大部分を占める鋭い peak 部分と、非常に小さいが画面全体に広く分布する floor 部分とで構成される。従来のコントラスト補正では、検出器の一方をマスクで隠し、マスク部と非マスク部で floor 部分の影響が等しいと見なして、その部分の強度曲線を補正に用いていたが、実際に乗っていると予想されるコントラストはマスク部分に比べ大きく異なることが明らかになった。これを解決する方法として、実験時に測定した PSF を各散乱パターンに直接たたみ込んで近似的なコントラストを計算し、補正に用いる事にした。この補正法を広角散乱実験に用いることで、補正用のマスクをつける必要がなくなり、今まで信頼できる強度曲線を得ることができなかった $S \geq 0.04 \text{ (\AA}^{-1})$ の領域のデータも正しく見積もることが可能になった。

[1] 伊藤和輝, 博士学位論文, 総合研究大学院大学 (1997)

D. Inano, Y. Sugimoto and K. Wakabayashi : Effect of the point spread function of XRII-CCD detector on WAXS patterns

2P110

マキシマムエントロピー法によるタンパク質結晶構造中の水素原子可視化への挑戦

○平田 邦生^{1,2}、福山 恵一³、田中 宏志⁴、高田 昌樹^{1,2} (¹ JASRI/SPRING-8、² CREST/JST、³ 阪大院・生物、⁴ 島根大・理工・物質科学)

マキシマムエントロピー法は“得られている情報”から“得られていない情報”を“最もバイアスを少なく”情報推定する統計学的な計算手法の一つである。この方法を用いると従来法のフーリエ法によって計算された電子密度を初期値 (得られている情報) にしてより高次の構造因子を推定しつつ電子密度を精密化することができる。我々はこれまで、いくつかのタンパク質結晶の構造解析データを用いてマキシマムエントロピー法による電子密度の計算とそれを用いたタンパク質結晶精密構造解析の有用性を検討してきた。今回はその中でも、この計算手法を用いた水素原子の可視化についての報告をしたい。タンパク質中の水素原子の可視化に必要な回折分解能はおよそ $1.2 \text{ \AA}$ 程度であるといわれている。現在、PDB に登録されているタンパク質結晶回折強度の分解能平均値はこの分解能をはるかに下回り、タンパク質結晶中の水素原子を X 線によって可視化することが非常に困難であることが示唆されている。しかし、アミノ酸残基や基質分子の水素化の有無などの情報はタンパク質の化学反応を考える際に重要であることが多い。我々はマキシマムエントロピー法を用いてまず $1.8 \text{ \AA}$ 分解能程度の回折強度データから水素原子を可視化する方法の確立を目指している。まず、その足がかりとしてフーリエ法でも水素原子可視化可能なデータにマキシマムエントロピー法を適用した結果、得られる電子密度の 1. 視覚的情報 2. 結晶学的な統計値の検討を行った。発表では、これらの結果と今後のこの研究の展開・展望などを報告する予定である。

K. Hirata, H. Tanaka, K. Fukuyama, M. Takata : The trials for visualization of hydrogens in the crystal structure of protein molecule by Maximum Entropy Method

2P112

真空紫外 CD 分光法によるタンパク質の二次構造予測

○松尾 光一¹、渡部 秀典²、生天目 博文¹、谷口 雅樹¹、月向 邦彦^{1,2} (¹ 広大・放射光、² 広大・理)

我々は、広島大学放射光科学研究センター (HSRC) の真空紫外円二色性 (VUVCD) 分散計により得られた構造既知な 31 種類のタンパク質 VUVCD スペクトルと二次構造解析ソフト (SELCON3) を用いることで、タンパク質の二次構造 (α -helix, β -strand, turn, random 構造) の含有率とその本数が、精度良く予測できることを確認してきた。しかし、本解析法からでは、一次構造上でどの部位が二次構造を形成しているかについての情報を得ることができない。そこで、本研究ではタンパク質の一次構造情報を二次構造解析プログラムに導入し、VUVCD スペクトルから二次構造の部位が特定できる新規の構造解析ソフトの開発を試みた。

一次構造から二次構造を予測する解析方法は、Chou-Fasman 法で用いられる各アミノ酸の二次構造 (α -helix, β -strand, random 構造) 傾向性指数を 31 種のタンパク質から計算し、また二次構造は DSSP 法により帰属した結果を用いた。各アミノ酸残基の傾向性指数のみで二次構造を帰属した結果、Chou-Fasman 法では 50 % 程度であった予測精度が、タンパク質の α -helix と β -strand の含有率の情報を加えることにより 62 % まで上昇した。また、末端効果や α -rich タンパク質における helix 構造の優位性と β -rich タンパク質における strand 構造の優位性を傾向性指数に加えた結果、さらに 65 % まで予測精度が上昇した。これらの結果は、現在報告されている 1D-2D 法の予測精度には到達していないが、VUVCD 法から得られる二次構造含有率の情報が、残基レベルでの二次構造予測に有効であることを示している。二次構造の本数や Chou-Fasman 法以外の解析方法を導入した予測結果に加え、 3_{10} -helix・poly-L-prolineII 構造・ β -strand の anti-parallel と parallel 構造の予測の可能性についても報告する予定である。

K. Matsuo, H. Watanabe, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko : Secondary-structure prediction of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy