3P061

反応条件の最適化によるトランスプロテインスプライシング反応効率の向上

○上岡 哲矢、惣谷 志保里、黒田 裕 (東京農工大学・生命工学)

近年、蛋白質工学の分野でその応用が注目されている反応機構の一つに、プロテインスプライシング反応がある。これはRNAのスプライシング過程に似た、蛋白質の自己触媒的切断、再結合機構であり、エキソンに当たる領域をエクステイン、イントロンにあたる領域をインテンインという。スプライシング反応には、インテンインが一繋ぎになっているものと、インテンイン部分がN末端とC末端断片に別れているものによる反応があり、前者をシス、後者をトランスプロテインスプライシングという。現在、トランスプロテインスプライシングはNMR構造解析、スクリーニングや蛋白質精製などに利用されはじめている。しかし、これらの応用には、トランスプロテインスプライシング反応効率が低く、非効率な精製過程を繰り返す行わなければならないという問題が残されている。我々は、トランスプロテインスプライシング反応効率に、反応条件とは別に各蛋白質断片の分子間相互作用が影響すると考え、その効率向上について研究を行っている。

本研究では、シアノバクテリア由来 *Synechocystis* sp. strain PCC6803 Ssp DnaE インテンインを用いた。このインテンインは、トランススプライシング反応であることから、N、C末端インテンインをそれぞれ別の大腸菌内で発現させた後 *in vitro* でスプライシング反応に利用することができる。封入体として得られた各蛋白質断片のリフォールディングと同時にスプライシング反応が起こることが判明したため、反応条件として、リフォールディング過程の透析条件を検討した。その結果、アルギニン塩酸を用いる透析法などを利用することで反応産物が従来の方法より多く得られることが明らかになった。発表では、これらの実験結果の詳細とN、C末端インテンインの分子間相互作用強化による反応効率向上について紹介する予定だ。

T. Kamioka, S. Souya and Y. Kuroda : Increased Protein Trans-splicing Reaction by Optimized Reaction Conditions

3P063

非干渉性弾性中性子散乱実験に見られる非ガウス性からの蛋白質ダイナミクス情報抽出の試み

○徳久 淳師^{1,2}、城地 保昌³、上久保 裕生¹、中川 洋²、北尾 彰朗³、片岡 幹雄¹ (1 奈良先端大・物質創成、2 原研・中性子利用研究センター、3 東大・分生研)

蛋白質が機能を発揮する際には比較的大きな構造変化を伴い、この構造変化と熱平衡状態のダイナミクスには相関がみられる。機能発現機構解明にはダイナミクスの理解が重要となる。ダイナミクスを観測する方法の一つに中性子非干渉性弾性散乱実験 (EINS) がある。散乱プロファイルの小角領域からは揺らぎ幅を見積もることができる。一方、広角領域では非ガウス性が観測される。その振る舞いにはダイナミクスの情報が含まれており、様々なモデルにより解析されてきた [Nakagawa(2004),Doster(1989)]。我々は、シミュレーションからEINSプロファイルを再現 [Fig] 非ガウス性とダイナミクスの関係の詳細を調べた。結果、動的不均一性 (原子の揺らぎ幅の分布) の寄与が大きかった。さらに振幅の大きい非調和な運動が非ガウス性に寄与していた。BPTIの場合振幅が大きな運動をする残基、即ち非ガウス性への寄与が大きな残基、と結合に伴い構造変化が起こる残基にはよい相関が見られた。以上から非ガウス性には機能に重要な運動の情報が現れているといえる。さらに現在、実験データと計算機実験から非ガウス性を考慮した解析法や実験系を模索している。詳細は年会にて報告したい。

Fig. BPTI蛋白質のMDより再現したEISFプロファイル

A. Tokuhisa, Y. Joti, H. Kamikubo, H. Nakagawa, A. Kitao, M. Kataoka : Trials of getting the information on protein dynamics from the Non-Gaussian behavior on the Elastic Incoherent Neutron Scattering profile.

3P062

動的散乱法によるアクチン分子間相互作用の測定

○神崎 紀子¹、上田 太郎²、小沼 一雄¹ (1 産総研・人間福祉工学、2 産総研・ジーンファンクション)

【目的】アクチンの核形成及び重合過程をより理解するため、アクチン分子間の相互作用を調べることは重要である。分散しているタンパク質分子間に働く力は、静電的反発力とファンデルワールス力のみを考慮した古典的 DLVO 理論、または付加的な力を加味した拡張的 DLVO 理論によって適切に説明されることが多い。アクチンの場合、重合するという特徴から、静電的反発力とファンデルワールス力の他に、重合の結合サイト間に疎水性相互作用による引力が強く働いているかどうかに興味あるところであろう。そこで本研究ではアクチン分子間に働く力を測定・解析し、凝集に関する物理量 (Hamaker 定数等) を算出する事を目的とする。【実験】本研究では分子間力を間接的に見積もるため、動的散乱法によるアクチンの拡散係数測定を行った。測定条件は G バッファー (2mM Tris, 0.2mM CaCl₂, 0.2mM ATP, 0.5mM DTT, 0.005% NaN₃, pH7.4 at 25 °C) または G バッファーに塩を加えた溶液中で行った。拡散係数のアクチン濃度依存性から分子間相互作用に関するパラメータを求め、それらを DLVO 理論で解析した。解析に必要な条件であるアクチン表面の電荷はキャピラリー電気泳動により決定した。【結果】アクチン分子間の相互作用は、バッファー中に添加される塩濃度とともに斥力優勢領域から引力領域へと変化する。この変化を古典的 DLVO 理論で解析したところ、Hamaker 係数および表面電荷に関する唯一解は得られないことが判明した。この結果は、アクチン分子間に拡張的 DLVO 理論で定義されるような付加的な力が働いていることを示唆する。解析は現在進行中であり、凝集に関する物理量の算出も含めて詳細はポスターで議論したい。本研究は (財) 日本宇宙フォーラムが推進している「宇宙環境利用に関する地上公募研究」プロジェクトの一環として行っています。

N.Kanzaki, T.Q.P.Uyeda and K.Onuma : Intermolecular interaction of actin measured by dynamic light scattering

3P064

温度ジャンプ・時間分解共鳴ラマン分光によるシトクロム c 熱変性初期過程の研究

○長野 恭朋、顧 玉宗、北川 禎三 (自然科学機構・岡崎統合バイオ)

【序】分子量 12.4 kD、104 アミノ酸残基から成る水溶性電子伝達タンパク質のウマ心臓シトクロム c (酸化型) について、Nd:YAG レーザーの第 2 高調波 532 nm を励起光源に用い、Q-バンド励起共鳴ラマンスペクトルの pH 依存性及び温度依存性を調べた。【結果と考察】中性条件下から pH を増加させると共に、特に ν_{11} については約 5 cm⁻¹ の高波数シフトが観測された。これまでの報告から、この高波数シフトはアルカリ転移と呼ばれる第 6 配位子の交換に起因すると考えられる。次に様々な pH 条件下において定常的に温度を変化させ、共鳴ラマンスペクトルの温度依存性を調べた。それぞれの pH において、60 度から 77 度の高温域で非可逆的な凝集が起こり、凝集体の生じた温度は、これまでに報告された熱変性温度とほぼ一致した。熱変性温度より低温においても、pH 7 水溶液中においては温度上昇と共に ν_{30} のバンド強度増大が観測され、この強度変化は可逆的であった。よって、 ν_{30} バンド強度は、熱変性初期過程のプロープとなり得ると思われる。本発表では、近赤外レーザー (1.56 μ m) と同期させた温度ジャンプ時間分解測定の結果についても議論する。

Y. Nagano, Y. Gu and T. Kitagawa : Temperature jump time-resolved resonance Raman study of the heat denaturation process of cytochrome c