

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成 13 年度採択研究代表者

佐々木 裕次

(Spring-8/JASRI 副主幹研究員)
(大阪大学蛋白質研究所 教授)

「X線 1 分子計測からの in-vivo 蛋白質動的構造/機能解析」

1. 研究実施の概要

蛋白質分子の動的構造情報/機能相関を詳細に解析するには、原子レベル以下の精度で in-vivo 動的1分子構造情報が安定に得られ、同時に1分子機能計測も併用可能な X 線1分子計測法が最も有効です。本法を膜蛋白質分子の in-vivo 計測へ適用し、また本法と計算科学を合体させた全く新しい蛋白質構造決定法を検討します。本研究は、敏速な蛋白質分子の構造・機能情報の取得を可能にすることで、医薬利用等とならび1分子技術、バイオ技術、そしてナノ技術との融合を目指します。

1. 1 研究実施状況

佐々木グループ:

H13年度は、老木Gや岡本Gとの本格的共同研究の開始のための準備期間と位置づけ、ナノ結晶の最適化、信号バックグラウンドの低減、ナノ結晶の生体分子へのラベル高効率化等の実現を完了し(現在論文作成中)、加えて以下の各実験系において進展があったので、ここに記する。

- (1) ナノ結晶の生体分子への標識が生体分子自身の運動にどの程度影響を及ぼしているのかを計算ではなく実際に実験する。系は生体分子を表面に固定する際の影響がほとんどないと確認されているアクチンフィラメントを用いる。フィラメント系だと、どの方向から基板表面に吸着してもその分子方位は同値なので、分子の運動状態を考える時に方位を考慮しなくてよい。この系において、ナノ結晶と生体分子との距離、ナノ結晶の電荷等の因子を検討している。同時に、生体材料の無機材料を用いたミメテックスも検討可能かどうか、無機材料(ここではナノ結晶)の運動特性を計測しながら検討する。可能となれば生体分子の一部無機ミメテック化と言う画期的系の誕生となる。
- (2) タンパク質 1 分子の分子内構造変化は、多くの研究者が行っている可視域の 1 分子計測法では不可能(エネルギー移動法でできると言われているが信頼性がない)であるので、X線 1 分子計測のデモとして最適。それで、構造変化がよく理解されている膜タンパク質分子の代表であるバクテリオロドプシン(BR)をサンプル系とした。ここまでの実験結果では、レチナールの転移由来の分子内構造変化は確認に成功し、おまけに構造変化した後数百秒もの間、その運動に余

韻が残っていることを確認した。この現象の再現性を今確認しており、合わせてこの生物学的意味を検討しているところである。この現象が再現性よく確認されれば、X線 1 分子計測の特徴である、高精度というのが明確に宣伝できるので、期待を持てる実験結果である。

- (3) タンパク質分子を人工的に作製するためには、セントラルドクマの最後のブラックボックスと言われるフォールディング過程の解明は非常に重要である。そこで、フォールディング過程の研究にすでに利用されているベータ2ミクログロブリン(b2m)を用いたフォールディング過程の 1 分子計測を開始した。数種類の変異体を作製し、一番計測しやすいサンプルを決定し、特に注目される、変性状態への遷移過程の計測を試みている。H14年前半にはデータがそろそろ予定である。

老木グループ:

本 Pro.の目標の一つである、パッチクランプ法との併用実験の準備を進めた。設備的な設置はほぼ完了し、使用するサンプル(KcsA)の数種類の変異体の作製もほぼ完了し、ナノ結晶ラベルによるチャンネルの生理特性の変化をパッチクランプ法で評価し始めた。

岡本グループ:

タンパク質分子の動的挙動を実験と計算で比較検討し、より高速の計算方法論を検討するためのサンプル検討を行った。その結果、A. Chakrabartty, T. Kortemme, and R.L. Baldwin, Protein Science 3, 843-852 (1994)で評価されているペプチドで最初の比較を行うことにした。

配列は Ac-YGKAAAKAAAKAAAKC-CONH₂ で、この配列はアルファヘリックスを作りやすい。N 末端のチロシン(Y)はペプチドの濃度を測るためにつけた。問題は時間スケールの違いをどう埋めていくかという点であるが、最初は温度因子への運動効果等の検討から入っていき、実験、計算の双方の歩み寄りを検討していく予定である。H14年初頭には、上記ペプチドの合成が完了する予定。

2. 研究実施体制

佐々木グループ

- ① 佐々木裕次(Spring-8/JASRI、副主幹研究員/大阪大学蛋白質研究所、教授)
- ② X 線1分子計測法の最適化、1分子、ナノ技術、バイオ関連技術の開発、ミメティック分子の開発を担当

老木グループ

- ① 老木成稔(福井医科大学生理第一講座、教授)
- ② 電気生理実験、ミメティック分子設計を担当

岡本グループ

- ① 岡本裕幸(岡崎国立共同研究機構分子科学研究所理論研究系、助教授)
- ② 計算科学、特に新しい立体構造決定法関連を担当