

表面力測定を用いたタンパク質相互作用の直接評価法の確立

●栗原和枝 ◆宮原 隆

東北大学多元物質科学研究所

＜研究の目的と進め方＞

本研究は、タンパク質分子を二次元面上に配向させて並べ、その相互作用を表面力測定より評価し、タンパク質分子間の特異的、非特異的相互作用を分子レベルで研究する新しい方法論を確立し、統合的ゲノム研究に続くプロテオーム研究のための基盤研究法・解析技術を提出することを目的とする。

表面の相互作用の距離依存性を直接測定する表面力測定を中心手段とし、タンパク質間、タンパク質と基質分子間の相互作用を直接測定から評価する。本研究は、相互作用力の直接測定であること、また方法論としては一般的に大部分のタンパク質に適用可能であることに特色がある。

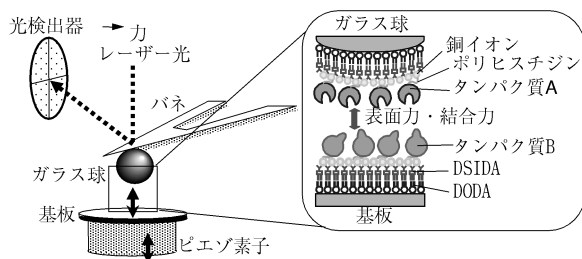


図 コロイドプローブ AFM による計測の模式図

＜研究開始時の研究計画＞

①二次元表面に組織化したタンパク質間の相互作用測定
ポリヒスチジン（His-tag）でタンパク質の特定の部位を修飾し、イミノジアセテート-Cu²⁺単分子膜（DSIDA）の表面に結合させる。その表面間の相互作用（遠距離からの力、ならびに結合力）をコロイドプローブ原子間力顕微鏡で測定する。タンパク質の表面への結合は、水晶発振子法などで確認する。既に予備的な検討を終えているRNAポリメラーゼのSigma Aユニットと転写因子であるSpo0Aについて測定を行う。

②プレニルトランスフェラーゼIIの相互作用

当酵素は単独では触媒機能を持たない2種類のタンパク質からなり、基質が存在すると酵素機能が発現する。2種のタンパク質を①と同様の手法で別々の表面に並べ、媒質水溶液中の基質（ファルネシル 2 リン酸）とMg²⁺の有無と、相互作用の変化を調べる。

＜研究期間の成果＞

(1)二次元表面に組織化したタンパク質間の相互作用測定
ポリヒスチジン修飾した、RNAポリメラーゼのSigmaAサブユニットと転写調節因子であるSpo0Aを、LB法により別々のガラス表面に配向を揃えて固定化し、それら表面間に働く相互作用をコロイドプローブ原子間力顕微鏡を用いて直接測定した。SigmaA/ Spo0A間の相互作用測定においては、同一表面間の相互作用測定より見積もった表面電荷からは説明のできない付加的な引力が観測され、SigmaA/ Spo0A間の特異的な相互作用を直接測定することに成功した。また、結合力ヒストグラムから、結

合力に複数のピークがあることを見いだした。この離散的な結合力は、SigmaA/ Spo0A間の結合部位が数箇所あることに起因していると考えている。

さらに分子認識に係わる生体分子の二次元表面への組織化法を開発し、分子認識特性を評価した（ref.1,3,4）。

(2)プレニルトランスフェラーゼIIの相互作用

この酵素は、単独では触媒機能を持たない2種類のタンパク質（サブユニットI及びII）からなり、基質（ファルネシル 2 リン酸）存在下で会合体を形成し、酵素としての機能を発現する。サブユニットI及びIIを(1)と同様にガラス表面に固定化し、媒質中の基質とMg²⁺の有無に着目し、相互作用を直接測定した。基質あるいはMg²⁺が存在するときは斥力のみが観測されたが、基質とMg²⁺が共に存在するときのみ接着力を観測した。このことより、基質とMg²⁺を介してサブユニットI及びIIが特異的に結合することを初めて直接的に明らかにした（ref.2,4）。

＜国内外での成果の位置づけ＞

生体分子の相互作用計測における独自の成果と認められ、多くの国際会議などで招待講演を依頼されている（例えばPACHIFICHEM2005など）。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

特に大きな問題はなかった。

＜今後の課題＞

方法論はできたので、本法を幅広い対象に適用し、生命現象を研究する道具として使いこなすことが課題である。実験的には接着力は結合定数から見積もられる結合エネルギーから比べると小さく、表面のすべての分子が結合対を形成しているわけではない。分子の配向固定法の工夫など、表面の分子密度から結合エネルギーをより正確に見積もる系を作ることがひとつの今後の課題である。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

- 1) 論文/プロシーディング
 1. Direct Measurement of Specific Interactions between Nucleic Acid Base Pairing, T. Harada, T. Miyahara, N. Nakashima and K. Kurihara, Japanese Journal of Polymer Science and Technology, 59, 792-799 (2002).
 2. Direct Observation of Specific Interaction between Enzyme-Substrate Complexes Using Colloidal Probe Atomic Force Microscopy, T. Suzuki, Y-W. Zhang, T. Koyama, D. Y. Sasaki and K. Kurihara, Chem. Lett., 5, 536-537 (2004).
 3. Electroconductive Langmuir-Blodgett Films Containing Carotenoid Amphiphile for Sugar Recognition, T. Miyahara and K. Kurihara, J. Am. Chem. Soc., 126, 5684-5685 (2004).
 4. Direct Demonstration of Specific Interactions in Biological Systems; DNA-Protein Interactions and enzyme Reaction, K. Kurihara, T. Suzuki and R. Ishiguro, Proceedings of 50UMS, 137 (2005).