

(東京工業大学フロンティア創造共同研究センター・CREST) 岡畑 恵雄

【緒言】

生体分子は ON 状態と OFF 状態といったような複数の異なる状態を取り得ることが多い。例えば、DNA は遺伝情報を保存するためヒストン・タンパク質に巻き付き折りたたまれた OFF 状態を取る一方で、その情報発現のために積極的に特定の領域を折りたたみ状態から開放し転写に必要な RNA ポリメラーゼなどのタンパク質のアクセスを可能にする ON 状態を形成する。カルシウム結合タンパク質のカルモジュリン (CaM) もまた生体内でのカルシウム・シグナリングにおいて Ca^{2+} 濃度上昇に伴って 4 つの Ca^{2+} と結合し様々な標的酵素に結合可能な ON 状態の構造となるが、 Ca^{2+} 濃度が低下すれば速やかに Ca^{2+} を解離し標的酵素とは結合しない OFF 状態の構造に変化する。本研究では DNA やタンパク質の構造が変化する際に粘弾性がどのように変化するかについて水晶発振子エネルギー散逸測定法を用いて測定することを試みた。

【実験方法】

ネットワークアナライザーを用いて水晶発振子に対して交流電場の周波数掃引を行うことで、コンダクタンス (G) の周波数応答から得られる共振曲線のピークトップを示す共振周波数 (F_s 値) とその値に対する共振曲線の半値幅の比として与えられる振動エネルギー散逸値 Dissipation Factor (D 値) を得た。アビジン固定化 27 MHz 水晶発振子セルにビオチン化した ssDNA (55 mer)、dsDNA (55 bp)、CaM を結合させ、その結合過程における ΔF_{water} 及び ΔD_{water} をモニターした。水中での測定後、基板を乾燥させて気相での ΔF_{air} を水和の影響のない質量 (Δm) として求め、 ΔF_{water} および ΔD_{water} を除することにより単位質量当たりの水和量 ($(-\Delta F_{\text{water}})/(-\Delta F_{\text{air}})-1$)、単位質量当たりのエネルギー散逸値 ($\Delta D_{\text{water}}/(-\Delta F_{\text{air}})$) を算出した。

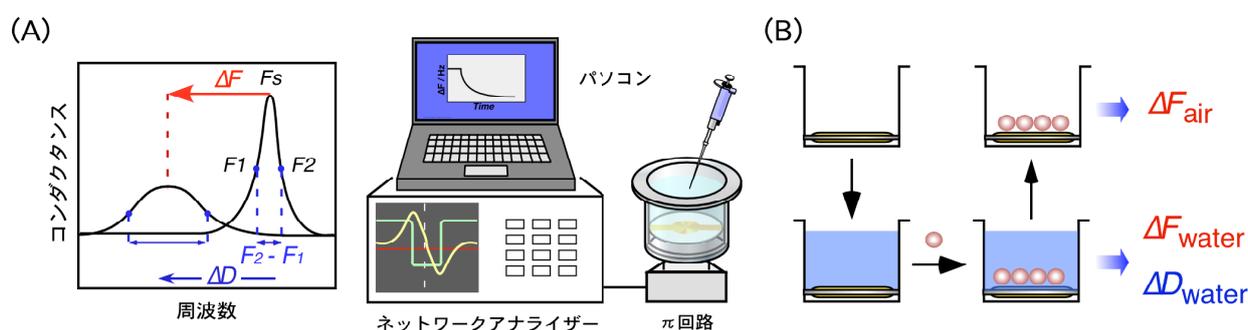


図1 (A) 周波数掃引したときに得られる共振曲線と共振周波数変化 ΔF とエネルギー散逸値変化 ΔD の関係図と装置の概略図。 F_1 , F_2 はそれぞれ最大コンダクタンスの半値を与える周波数。(B) 各パラメータの測定手順の模式図

【DNA 構造変化における水和と粘弾性変化】

ssDNA および dsDNA 固定化水晶発振子セルに対して、カチオン溶液としてヘキサアンミ

ンコバルトを終濃度 0~1.7 mM の範囲で添加したところ、いずれの場合においてもカチオンの添加により ΔF_{water} は上昇し ΔD_{water} は減少する様子が観察された。このことは、DNA が一本鎖及び二本鎖の場合においてもカチオンの添加により、脱水和を生じエネルギー散逸の少ない硬いコンパクトな構造に変化していることを示唆している。図 2 に(単位質量当たりの水和量) – (単位質量当たりのエネルギー散逸値)プロットを示した。

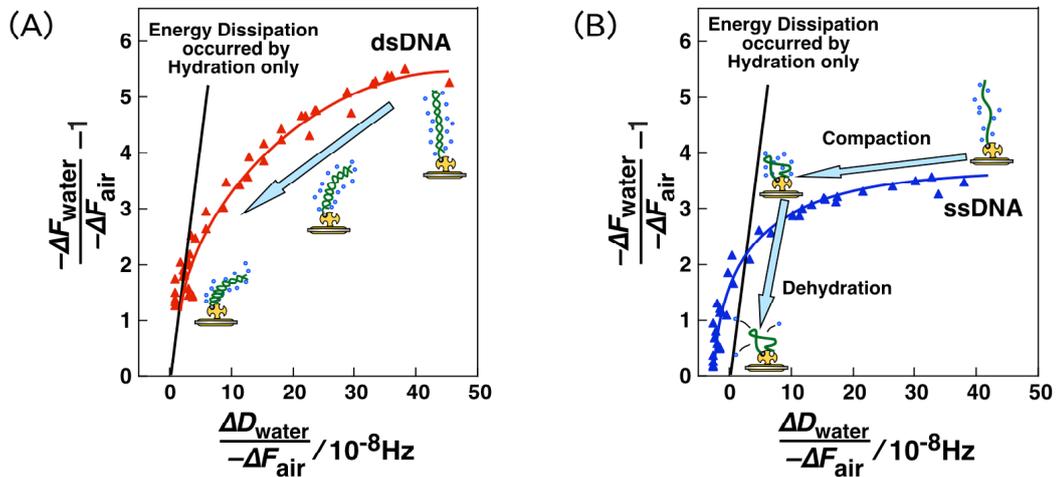


図 2 単位質量当たりのエネルギー散逸値 ($\Delta D_{\text{water}}/(-\Delta F_{\text{air}})$) に対する単位質量当たりの水和量 ($(-\Delta F_{\text{water}})/(-\Delta F_{\text{air}})-1$) のプロット。(A) 二本鎖 DNA (B) 一本鎖 DNA

二本鎖 DNA の場合では脱水和を伴いながら収縮している様子が観察できた。一方、一本鎖 DNA ではカチオン添加量が少ないとき (<0.2 mM) には収縮だけを生じ、さらにカチオン添加量が増加 (>0.2 mM) すると脱水和挙動を示すことがわかった。これらのことは、二本鎖 DNA と一本鎖 DNA ではカチオンによる収縮メカニズムが異なることを示しており、構造の自由度が高い一本鎖 DNA では水分子を含んだコンパクトな中間構造体が存在することがわかった。

【カルモジュリン構造変化における水和と粘弾性変化】

CaM 固定化水晶発振子セルに対して Ca^{2+} を終濃度 0~0.1 mM の範囲で増加させたところ、わずかな脱水和を生じながら ΔD_{water} 値は Ca^{2+} 非存在下と比較して約 1/2 まで減少した。このことは、CaM が Ca^{2+} と結合し硬い構造に変化したことを示している。DNA と比較して CaM は ΔD 値の小さな硬い構造をしているが、構造変化に伴って大きな粘弾性変化を起こしていることがわかった。こうした物性変化が生体機能に関わっている可能性は十分に考えられると思われる。

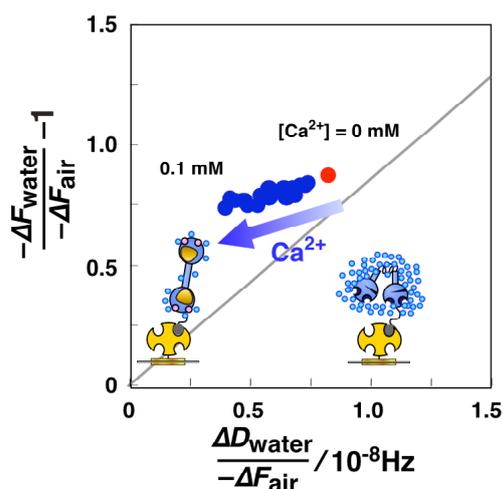


図 3 CaM の構造変化の模式図と Ca^{2+} 添加に伴う水和と粘弾性変化の様子

文献: T. Ozeki, M. Morita, H. Yoshimine, H. Furusawa and Y. Okahata, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 79-88.