

## 2P245

## ブルー銅蛋白質アズリンの結晶成長に関する研究

○佐藤 真紀、渡辺 博義、高妻 孝光 (茨大・理)

タンパク質の機能を理解するためには、タンパク質の分子構造を精緻に調べるのが重要であり、分光学的手法による分子構造解析および、X線結晶構造解析や中性子線結晶構造解析などによる構造解析を相補的に行うことが重要である。精密結晶構造解析には高品質の単結晶が要求されるが、結晶成長機構に基づいた蛋白質単結晶の作製のための一般的ストラテジーは未だに確立されていない。脱窒菌 *Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB11015 から得られるブルー銅蛋白質アズリンには立体構造がほぼ同一であるアズリン I とアズリン II とがある。しかし、蒸気拡散法によって得られた結晶のモルフォロジーはアズリン I が板状晶であり、アズリン II は微細針状晶となる。本研究ではアズリン I とアズリン II の結晶成長を調べモルフォロジーに影響を与える因子についての検討を行った。結晶を得るための条件設定を行うには、まず溶解度曲線を決定する必要がある。溶解度曲線は、アズリン I およびアズリン II を 4.0 M の硫酸アンモニウムで沈澱させ、得られた沈澱に一定濃度の硫酸アンモニウム溶液を加え 20℃ で 3 週間平衡化した後、溶液の吸光度を測定することにより求めた。得られた溶解度曲線からアズリン II はアズリン I よりも溶解度は低く溶液相と固相との境界も比較的幅広くなっていることが明らかとなった。溶解度曲線を基にして結晶化条件をタンパク質濃度 10~30 mg/ml、硫酸アンモニウム濃度 0.5~1.5 M の範囲に設定し、マイクロパッチ法により結晶化領域を調べ、結晶化領域のマッピングを行った結果についてもあわせて報告する。

M.Sato, H.Watanabe and T.kohzuma : Studies on the crystal growth of blue copper protein azurin I and azurin II from *Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015

## 2P247

## 高圧力下における赤血球集合のダイナミクス

○中谷 明弘、蛭間 敬、外山 吉治、坂西 明郎 (群馬大学工学部)

生体材料の多くはサスペンションであり、その分散および集合性に大きな影響を与える外部因子には温度と並び圧力がある。これら分散粒子の浮遊安定性を詳しく理解するためには、形成される集合体の大きさだけでなく集合過程のダイナミクスを知る必要がある。本研究ではレーザー透過光強度の変化から高圧力下で集合過程が測定可能な装置を製作し、赤血球の集合過程への静水圧の影響を調べ、簡単な解析を試みるとともに顕微鏡下で集合体の形態観察も行った。試料はブタ赤血球を自己血漿、フィブリノーゲンおよびデキストラン水溶液中に体積濃度 2% で懸濁した。光源は He-Ne レーザーで、受光部にはフォトダイオードを用いた。試料セルは市販の分光光度計用セルで、これに試料とともに円筒形の攪拌子を入れた。光学窓を有する压力容器に試料セルをセットし、目的の圧力に加圧した後、強磁力スターラーにて 1000 rpm の強攪拌を 60 秒間行い赤血球を完全に均一に分散させた。その後、攪拌速度を 300 rpm に下げ透過光強度の変化を 0.1 秒ごとにパソコンに記録した。赤血球の集合に伴い、透過光強度は時間とともに指数関数的に増大し、実験式  $I(t) = A_1 \{1 - \exp(-B_1 t)\} + A_2 \{1 - \exp(-B_2 t)\}$  で良く近似された。ここで  $I$  は透過光強度、 $t$  は経過時間、 $A_{1,2}$  および  $B_{1,2}$  は定数である。この曲線より求められる初期勾配は集合速度に比例し、最初圧力の増加とともに増大し、80 MPa 付近で極大を示した後、減少した。一方、160 MPa 以上の圧力では赤血球の球形化が観察され、集合体は連鎖と呼ばれる一次元的なものから不規則な三次元的集合体へと変化した。また、フィブリノーゲンおよびデキストラン水溶液中でも同様の結果が得られた。

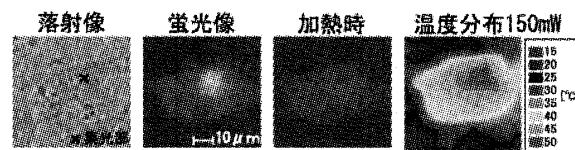
A. Nakaya, K.Hiruma, Y. Toyama, A. Sakanishi : Dynamics of erythrocyte aggregation under high pressure

## 2P246

## 単一細胞を局所加熱する赤外線レーザー顕微鏡システムの開発

○渡辺 建二郎<sup>1</sup>、弓場 俊輔<sup>2</sup>、亀井 保博<sup>2</sup>、青木 大輔<sup>1</sup>、船津 高志<sup>1</sup> (<sup>1</sup>早大院・理工・生命理工、<sup>2</sup>阪大・細胞生体工学センター)

単一細胞の微小領域のみを加熱できる赤外線レーザー顕微鏡システムを開発した。1480nm の赤外線レーザーを用いて水分子を励起し、生体試料を非侵襲的に加熱した。赤外線レーザーの出力と集光部の微小領域温度分布の関係を正確に把握するために、GFP の蛍光強度が温度に応じて変化する現象を利用した。蛍光分光光度計で様々な温度の GFP の蛍光強度を測定し、蛍光強度から温度を求めるための基準データをあらかじめ求めておく。さらに *Xenopus* A6 の微小管に GFP を発現させたものを用意しておく。*Xenopus* A6 に様々な出力 (50~250mW) で赤外線レーザーを照射し、細胞内の蛍光強度の変化を画像解析ソフトで測定した。次に求めておいた基準データから細胞内の温度分布を求めた。これにより赤外線レーザーの出力と細胞内の温度分布の関係が得られた。150mW で集光部から半径 5  $\mu$ m 以内の温度が 50℃ まで上昇し、200mW 以上になると細胞が変形して死に至ることがわかった。今後はこのシステムを用いて細胞の様々な領域での熱ショック応答について調べたい。



K.Watanabe,S.Yuba,Y.Kamei,D.Aoki and T.Funatsu : Development of IR laser microscope system which permits local heating of a living cell

## 2P248

## コラーゲン溶液のつくる空間的リズムパターンとその分子配列の原子間力顕微鏡による観察

○前田 秀篤 (産総研・分子細胞工学部門)

蒸発するコラーゲン溶液から高配列化された分子集合体が形成されることを、原子間力顕微鏡を用いて見出した。コラーゲン溶液の濃度が 0.005 mg/ml 以下では横たわっていた分子が、0.05 mg/ml 以上では上を向いて並んでいた。さらにコラーゲン分子の濃度が 5 mg/ml 以上の場合には、空間的リズムパターン (同心円状と放射状パターン) がその集合体に形成された。各々のリングは、傾いた配向コラーゲン分子から成る多層構造をとっていることが分かった。リング幅は 3-120  $\mu$ m で分子濃度の増加と共に、又パターンの中心に向かうほど増加した。放射状パターンの周期は 40-200  $\mu$ m で中心に向かって不連続的に増加した。これらのパターンの発生と分岐を示す相図を分子濃度と蒸発時間の関数として決定した。さらにそのパターンの形成プロセスも詳しく観察した。参考文献 1. H. Maeda, *Langmuir* 1999, 15, 8505. 2. H. Maeda, *Langmuir* 2000, 16, 9977.

H. Maeda : Observation of Spatially Rhythmic Patterns from Evaporating Collagen Solution Droplets