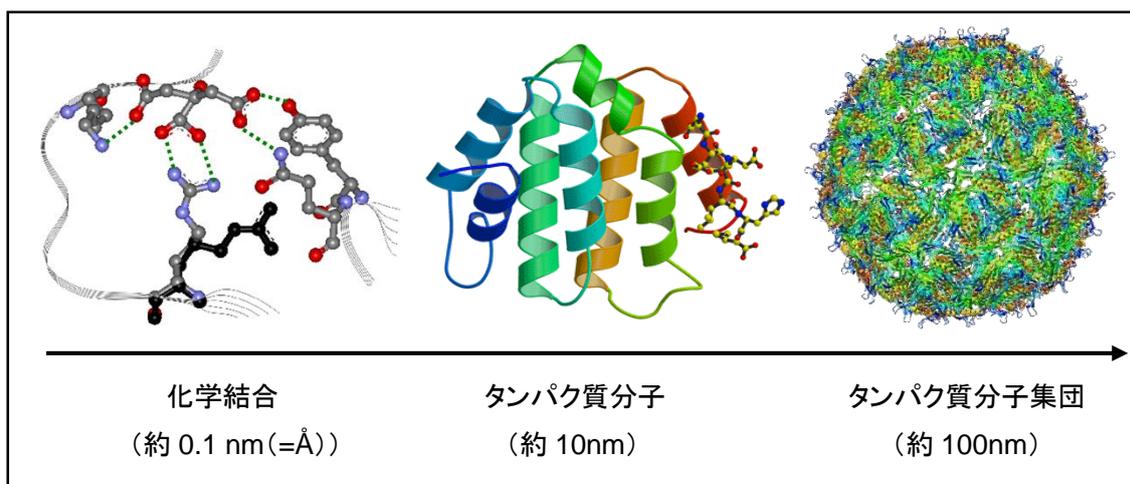
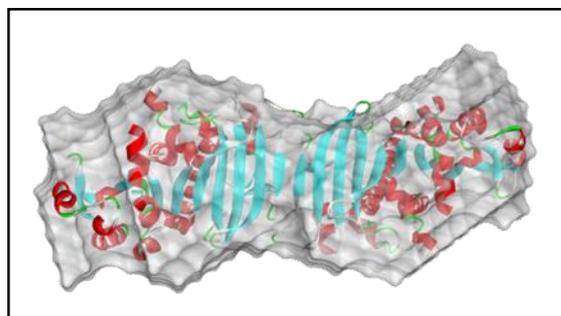


演習課題 M04: タンパク質の形を見てみよう

生命活動は、生体内に存在する様々なタンパク質が協同的に機能することによって成り立っています。構造生命科学は、この機能メカニズムをタンパク質の立体構造に基づいて明らかにしようという分野ですが、機能メカニズムを理解するためにはアミノ酸残基レベルの局所構造からタンパク質全体の概形構造まで幾つかの階層的な空間スケールに基づいて議論する事が必要になります。本演習では、タンパク質の階層構造性を理解するために、X線溶液散乱法(X線小角散乱法)を中心に、生命科学実験において非常に基礎的な幾つかの手法を用いて解析を行っていきます。



本演習課題の主題であるX線溶液散乱法はタンパク質などの生体分子を測定するための方法で、数 nm～数十 nm の空間スケールで溶液中の分子概形を知ることができます。この溶液散乱より得られる低分解能の概形モデルと結晶構造解析などから得られた高分解能構造を組み合わせたハイブリット解析と呼ばれる解析法は、広い空間スケールで分子の構造や機能を議論する目的で、近年活発に活用されています。



夏の実習では、まず、分子の局所構造や二次構造状態を観測するために、紫外可視吸収や円二色性といった分光学的測定を行います。さらに、分子の単分散度、大きさ、分子量などの評価を行うために、動的光散乱、HPLC、多角度静的光散乱などの手法を用いて解析を行います。X線溶液散乱に関しては、夏は講義とテストデータによる解析実習を行い、秋の実習で実際にフotonファクトリーのビームラインにおいて実験を行う計画です。夏の実習では、基本的に静的な条件でタンパク質分子の状態を観測していますが、秋のX線溶液散乱実験では、時間があれば分子構造変化をストップフローと呼ばれる装置を用いて時間分解測定で観測し、分子状態の時間変化を観測したいと考えています。



演習課題 M04: タンパク質の形を見てみよう

担当教員 佐藤 衛 先生(横浜市大)
上久保 裕生 先生(奈良先端大)
小島 正樹 先生(東京薬科大)
担当スタッフ 清水 伸隆(KEK)・安達 成彦(KEK)
担当 TA 原田 彩佳(総研大・D2)・相沢 恭平(電大・M2)・米澤健人(奈良先端大・D2)

生命活動は、生体内に存在する様々なタンパク質が協同的に機能することによって成り立っています。構造生命科学は、この機能メカニズムをタンパク質の立体構造に基づいて明らかにしようという分野です。しかし、機能メカニズムを理解するためには、アミノ酸残基レベルの局所構造・タンパク質全体の概形構造・タンパク質複合体の全体構造など、幾つかの階層的な空間スケールに基づいて議論する事が必要になります。本演習では、タンパク質の階層構造性を理解するために、X線溶液散乱法を中心に、生命科学実験において非常に基礎的な幾つかの手法を用いた解析を行います。

■本演習課題の全体の流れ

8月20日(水)に受け付けを済ませます。8月21日(木)は、午前中に特別講義・共通講義を受け、午後にはオリエンテーション・放射線教育講習を行った後、本演習課題がスタートします。16時からの演習は佐藤先生の講義で、タンパク質の立体構造を知る意義・立体構造決定の様々な手法・それらの手法の長所短所など、広範に渡る内容を概説していただきます。

金曜日のキャンパスツアーを挟んで、8月23日(土)からは、実際の実験に近い内容へと移行していきます。まず土曜日午後からの上久保先生の講義では、X線溶液散乱についてお話しいたします。その後、デモデータを使ったデータ処理の実習を行います。この実習は8月24日(日)の午前まで続きます。

日曜日の午後からは、タンパク質が持つ性質や構造状態を知るための分光学的な手法(UV, CD, DLS, SEC-MALS)に関する実験を行います。実験に先立って、日曜午後には小島先生に各種測定に関する原理的な講義を行っていただきます。また、実験を行う施設(放射光科学研究施設(PF)・構造生物学研究センター(SBRC))の見学ツアーを行います。8月24日(日)から25日(月)にかけて、各種測定装置を使った実験を行い、8月26日(火)の午前中から午後にかけて、発表準備(必要であれば再実験)を行うこととなります。そして最終日である8月27日(水)は、発表会(口頭およびポスター)・修了式・打ち上げが行われます。

以下に演習内容の詳細を記載します。

8月21日(木) 16:00-17:20 4号館1階セミナーホール

講義「様々なプローブを用いた構造生命科学研究(仮)」(佐藤先生)

蛋白質の構造とその蛋白質分子の持つ機能との相関を明らかにするために、原子・電子レベルの構造情報から蛋白質分子全体の概形や、蛋白質分子間の相互作用形態などの構造情報まで、すなわち、数Åから数百Åまでの広い空間範囲をX線や中性子を始めとする様々なプローブ(手法)を用

いて構造解析が行われています。ここでは、様々なプローブを用いた構造生命科学研究の過去・現状・未来に関して、最新の研究を絡めながら講義を行います。

(17時半から懇親会が開催されます)

8月23日(土) 13:30-15:30 PF 実験準備棟 2階輪講室

講義「光散乱・小角散乱に関する基礎(仮)」(上久保先生)

本演習 M04 のメインテーマである小角散乱法(X線・中性子)に関して、基礎理論から最新の解析法まで実際の研究例も交えながら講義を行います。また、夏の実習で実験を行う動的・静的光散乱に関しても触れていきますが、比較的近い情報が得られる小角散乱との違いを確認してもらいます。

8月23日(土) 15:30-18:00 PF 実験準備棟 2階輪講室

X線溶液散乱デモデータの処理(上久保先生・TA)

(18時半までに夕食となります。18時半からは、キャリアビルディング(共通講義・パネルディスカッション)が行われます)

8月24日(日) 10:45-12:30 PF 実験準備棟 2階輪講室

X線溶液散乱デモデータの処理つづき(上久保先生・TA)

夏の実習では、放射光ビームを使った実験実習ができないため、事前に取得された実際のデータを用いて解析実習を行います。秋の実習では、放射光ビームラインにて実際にデータを収集し、取得したデータの処理をこの解析実習に基づいて実際に行います。

(A) 標準試料タンパク質のデータを用いたデータ解析実習

1次元化されたデータから、ab-initio 分子モデリングまでの解析を行う

① バックグラウンドを差引いて散乱曲線を求める

解析 1: ギニエ Plot、Kratky Plot

② 濃度シリーズデータから 0 濃度散乱曲線を求める [使用するプログラム: primus]

解析 2: P(r)関数の計算

解析 3: ab-initio 分子モデリング計算

③ モデルの重ね合わせ

④ 分子モデル表示ソフトでの確認 [使用するプログラム: Pymol, Rasmol, Chimera など]

⑤ PDB ファイルから理論散乱曲線の計算

(B) データの見方:凝集、粒子間干渉効果のあるデータ

① ギニエ Plot を実行し、解析が難しい状態を実際に体験

(C) 他のタンパク質のデータを用いた解析

① 別試料のデータを用いて一連のデータ解析を自分で試してみる

8月24日(日) 13:30-15:30 PF 実験準備棟 2階輪講室

講義「生体分子の精製・解析のための各種手法の基礎(仮)」(小島先生)

夏の実習では、実験室にある各種分光装置やゲル濾過クロマトグラフィーといった様々な装置を利用して、蛋白質分子の構造状態を観測します。この講義では、これらの装置の基礎から実用例に関して説明します。

8月24日(日) 15:30-18:00 構造生物実験準備棟

UV・CD・DLS・SEC-MALSを用いた試料測定(小島先生・TA)

こちらで準備した何種類かのタンパク質について、それらが何であるか明かされない状態で様々な分光学的測定を行います。その上で、どのような性質を持つタンパク質であるかを考察します。具体的には、分子の局所構造や二次構造状態を観測するための手法である紫外可視吸収測定(UV)・円二色性スペクトル測定(CD)といった分光学的測定を行います。また、分子の単分散度、大きさ、分子量などの評価を行う手法である、動的光散乱(DLS)・ゲル濾過クロマトグラフィー(SEC)・多角度静的光散乱(MALS)などを用いて解析を行います。なお、24日の実験は下記の通りに進行する予定です。

- ・SEC-MALS: 装置の立ち上げとカラムの平衡化を開始します
- ・UV: 目的に応じた測定モードや波長を使って紫外吸収を測定します
- ・CD: 円二色性スペクトルを測定し、二次構造状態を推定します

これらの実験を通して、単一の手法のみだと、明らかにできることと明らかにできないことがあることを理解してもらうこととなります。どのような実験手法も単独では万能ではなく、それぞれの手法には、適用範囲や長所・短所があります。そのため科学研究の世界では、様々な手法を組み合わせることで自然現象の背後にある法則を解き明かしていくこととなります。本演習での実験を通して、このような「実際の実験」の楽しさと歯痒さを肌で感じとって下さい。

8月25日(日) 9:00-18:00 構造生物実験準備棟

UV・CD・DLS・SEC-MALSを用いた試料測定(小島先生・TA)

前日から引き続いて、下記の通りに実験を進行する予定です。

- ・DLS: 散乱強度の時間変化から自己相関係数を算出し、粒子径などを算出します
- ・SEC-MALS: 多角度における光散乱の測定から、粒子径などを算出します

時間に余裕がある場合は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動や質量分析計などによるタンパク質の分析も試みます。

8月26日(月) 9:00-18:00 構造生物実験準備棟 or PF 実験準備棟 2階輪講室

発表準備または再実験(小島先生・TA)

翌日の発表会に向けて、スライド発表の準備とポスター発表用のポスター作成を行います。スライドは発表時間に合わせた枚数を準備し、同時に発表原稿も用意します。発表を行うには、これまでの演習内容をよく理解することが重要なので、全員でよく話し合って理解を深めて下さい。安易に納得した振りをせず、ディスカッションを通して自分の中で咀嚼することが重要です。必要に応じて、文献調査や再実験が必要になるかもしれません。これらと同時にポスター発表にもちいるポスター(A0サイズ)も準備してもらうこととなります。

8月27日(火) 9:00-18:00 研究本館小林ホール&ロビー

発表会・ポスター発表・修了式

いよいよ最終日です。演習を通して学んだ内容を思う存分に発表して下さい。

[参考図書]

基礎生化学実験法シリーズ(第3巻 第I分冊:検出・構造解析法)・東京化学同人
バイオ高性能機器・新技術利用マニュアル・共立出版
入門 構造生物学・共立出版
実験化学講座 10 回折 7章・丸善
新・生物物理の最前線・講談社ブルーバックス(B-1348)
(最後の一冊は、既に発刊から10年が経っていますが、読み物として読んでみてください)

[参考サイト]

蛋白質科学会アーカイブ

蛋白質の精製

http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Purification/Purification_home.html

#003

蛋白質の物理化学的測定・解析

http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Measurement/Measurement_Home.html

#002、#008、#047