

377.5

K-11-2

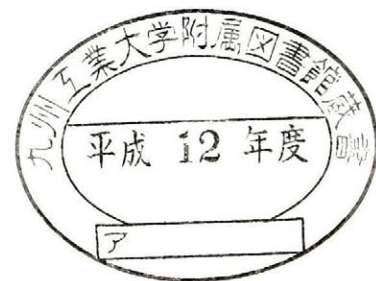
1-60

不溶性グルカン合成酵素の 1分子イメージング

平成11年度 学位論文

九州工業大学大学院
情報工学研究科 博士後期課程
情報科学専攻

加世田国与士



九州工業大学附属図書館



10380277

【目次】

要旨	5
学位論文概要	8
略語一覧	10
第1章 序	
1-1 背景1 ; グルコシルトランスフェラーゼ	
1-1-1 う蝕とミュータンス連鎖球菌	11
1-1-2 う蝕の発生	12
1-1-3 グルコシルトランスフェラーゼ (GTF)	13
1-1-4 GTF の機能領域	14
1-1-5 ショ糖分解/糖転移活性部位とデキストラン結合部位の相互作用	15
1-1-6 GTF の酵素反応速度論	16
1-1-7 GTF の高次構造	16
1-1-8 GTF-I に関するクローン	17
1-1-9 GTF-I が作るグルカンの構造	18
1-2 背景2 ; 1分子酵素学	
1-2-1 1分子科学の夜明け	19
1-2-2 蛍光色素法による1分子イメージング	19
1-2-3 1分子直視の意義	20
1-2-4 長所と短所	21
1-2-5 酵素反応の1分子イメージング	21
1-2-6 エバネッセント場を用いた1分子測定の実用例	22
1-2-7 糖鎖研究における1分子イメージングの意義	23
1-3 研究の目的	25
第2章 材料と方法	
2-1. タンパク質の精製と定量	
2-1-1 GTF-Cys 作成	26
2-1-2 GTF (GTF', GTF-Cys) 精製	28
2-1-3 DXB (4R) 精製	28
2-1-4 タンパク質定量	29

2-1-5 システイン含有量定量	29
2-2 化学修飾	
2-2-1 GTF-TMR と GTF-BIO	30
2-2-2 Dextran-TMR と Dextran-BIO	30
2-2-3 Biothynilated BSA	31
2-3 酵素活性測定	32
2-4 多分子イメージング	
2-4-1 GTF/デキストラン相互作用の蛍光顕微鏡観察	33
2-4-2 GTF/WIG 相互作用の蛍光顕微鏡観察	33
2-5 1分子イメージング	
2-5-1 試料の調製と観察	33
2-5-2 蛍光強度の経時変化	34
2-5-3 解離速度定数の決定	35
2-6 ストップフロー光散乱測定	35
第3章 原理と装置	
3-1 エバネッセント場	36
3-2 1分子イメージングのための蛍光色素	37
3-3 全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) システム	38
3-4 ストップフロー光散乱測定の解析	39
第4章 結果	
4-1 GTF/デキストラン相互作用の速度定数の決定 (多分子解析)	40
4-2 GTF-Cys と GTF-TMR 作成	40
4-3 化学修飾 GTF'およびデキストランの機能	41
4-4 多分子イメージング	42
4-5 1分子イメージング	43
第5章 考察	47

謝辞 51

参考文献 53

【要旨】

う蝕原生連鎖球菌 Cariogenetic streptococci の菌体外酵素であるグルコシルトランスフェラーゼ-I (GTF) は蔗糖を分解し、生じたグルコースをデキストラン上に α -1,3 分岐鎖として転移 (付加・伸長) し不溶性グルカンを合成する。GTF と未修飾のデキストランの相互作用は様々な物理化学的手法を用いて定量的に解析することができるが、ショ糖存在下では不溶性グルカンを合成されるため、それらの相互作用を解析することは容易ではない。そこで、全反射蛍光顕微鏡を用いた 1 分子イメージング法によりショ糖存在下での GTF/デキストランの相互作用を解析した⁽¹⁾。

GTF 分子を特異的に化学標識する為に遺伝子工学的にシステイン残基を導入した。GTF をコードするプラスミド (Abo, et al., 1991) のマルチクローニングサイトの一部を制限酵素 Xba-I で消化し、生じた 5' 突出末端を S1 ヌクレアーゼで削り落とし、平滑末端を T4 リガーゼで連結した。本処理で得たクローンの遺伝子産物 GTF-Cys を可視化するために tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMRM) で蛍光標識 (GTF-TMR)、またガラス表面下に固定化するためにビオチン化 (GTF-BIO) した。デキストラン (T10 と T500) は、過ヨウ素酸酸化処理後、2-acetamido-4-mercaptobutanoic acid hydrazide を用いて SH 基の導入を行い、蛍光標識デキストラン (T10-TMR と T500-TMR) およびビオチン化デキストラン (T500-BIO) を得た。これら化学修飾を施した GTF およびデキストランは基本的な機能を保持していた。

GTF-TMR 溶液で懸濁した Sephadex ビーズ (架橋性デキストラン) は蛍光性を示したが、GTF-TMR と非標識デキストランを用いて合成した不溶性グルカンは蛍光性を示さなかった。これは GTF はデキストランには特異的に結合するが、 α -1,3 側鎖で完全に修飾されたデキストランには、結合しないことを示している。

全反射顕微鏡 (Funatsu, et al., 1995) を用いて GTF/デキストランの相互作用を 1 分子レベルで観察した。GTF-BIO をガラス表面下に固定化し T500-TMR の 1 分子観察を行った。ショ糖非存在下では、多くの蛍光スポットが数分間 (long dwell time) 観察

された。同時に数百ミリ秒間点滅する (short dwell time) 少数のスポットも観察された。Long dwell time スポットは、多くの GTF 分子と相互作用しているデキストランを、short dwell time スポットはより少ない GTF と相互作用し、すぐに解離しているデキストランを反映していると思われる。シヨ糖存在下では観察視野に認められた蛍光スポット数は激減した。特に Long dwell time のスポット数は著しく減少し、代わりに short dwell time のスポット数の割合が増加した。これらの結果は、不溶性グルカン合成初期段階においてもシヨ糖存在下では GTF とデキストランの親和性が弱まることを意味している。

シヨ糖存在下における GTF/デキストラン親和性低下の分子機構を調べるために、過剰の非修飾デキストラン存在下で short dwell time の蛍光スポットを解析した。T500-TMR が GTF と相互作用している時間を測定して得たヒストグラムの 1 次反応プロットより、デキストランの解離速度定数を求めた。シヨ糖非存在下の $3.0 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$ に対して、シヨ糖存在下では $5.3 \pm 1.0 \text{ s}^{-1}$ と解離速度定数の増加が認められた。従って、シヨ糖存在下における GTF/デキストラン親和性低下の一部は、解離速度定数の増加に起因することが判明した。さらに結合速度 (観察視野内に現れるスポット数) は、シヨ糖非存在下で $814 \pm 68 \text{ mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ であったのに対し、シヨ糖存在下では $578 \pm 50 \text{ mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ と減少した。従って、シヨ糖は結合速度定数の低下も誘起する。T500-BIO をガラス表面にコートし、大過剰の非修飾 GTF 存在下で GTF-TMR の 1 分子観察も行った。シヨ糖非存在下における GTF の解離速度定数は $9.2 \pm 1.7 \text{ s}^{-1}$ であり、シヨ糖存在下では $13.3 \pm 1.5 \text{ s}^{-1}$ と増加した。結合速度はシヨ糖非存在下の $2053 \pm 272 \text{ mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ に対して、シヨ糖存在下では、 $749 \pm 36 \text{ mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ と減少した。1 分子観察から不溶性グルカン合成の初期段階においても、解離速度定数の増加と結合速度定数の減少の両方により GTF/デキストランの親和性が低下していることが判明した。

GTF はデキストラン上に多数の α -1,3-分岐鎖を形成する (Fukui, et al., 1982) ので、本酵素は何らかの方法である分岐サイトから別の分岐サイトに移動すると考えられ

る。本研究で確立した GTF の 1 分子イメージング法を応用すれば、GTF がデキストラン上を移動する分子機構に迫ることができる。GTF/デキストラン相互作用の 1 分子解析系の確立により GTF 研究だけでなく糖鎖研究が発展することは必至である。また、新たな 1 分子バイオシステムの開発は、次々と新しい知見を見いだしている 1 分子酵素学の発展につながる。

(1) Kaseda, K., Yokota, H., Ishii, Y., Yanagida, T., Inoue, T., Fukui, K., and Kodama, T. J. Bacteriol. in press.

【学位論文概要】

う蝕発生の重要な因子であるグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) の作用を最先端の技術を用いて解析した本研究は、新たな GTF の分子機構を見いだしたのみならず歯科医学界や糖鎖研究の発展に貢献し得るものであり多面的に意義深い。

第 1 章では、まず研究対象である GTF/デキストラン系 (1-1 節) と 1 分子観察法 (1-2 節) について解説した。1-1 節では、GTF とう蝕発生のかわりを初め、GTF の構造、機能について説明した。1-2 節では、現在の 1 分子解析技術とその意義等を記述した。特に本研究で使ったエバネッセント場を利用した全反射蛍光顕微鏡観察法については、応用の具体例を示すと共に、糖鎖研究における利用の意義についても記載した。それらをふまえて、1-3 節で研究の目的を述べた。

第 2 章の材料と方法では、研究で使用した材料の作成法を本論文を見た人が再現できるように詳細に記述した。2-1 節では、GTF の 1 次構造上の特徴や機能上の特性を利用した GTF 変異体の作成方法やそれらの精製法等について説明した。2-2 節では、GTF やデキストランを可視化や固定化するために行った化学修飾法について記述した。次に、これらの化学修飾材料を使って行った実験の方法を概説した。GTF の酵素活性を測定する独特な方法 (2-3 節)、蛍光顕微鏡を用いた GTF/デキストランの多分子イメージング法 (2-4 節) や全反射顕微鏡を用いた 1 分子イメージングの試料作成方法や解析方法について解説した (2-5 節)。1 分子直視法で得られた結果を支持するデータを与えたストップフロー光散乱測定の実験方法は 2-6 節に記載した。

第 3 章の原理と装置では、特に 1 分子イメージングに必須のエバネッセント場 (3-1 節) や蛍光色素 (3-2 節) について、また全反射顕微鏡のシステム (3-3 節) についても解説した。ストップフロー光散乱測定で得られたデータの解析法 (3-4 節) についての解説も記載した。

第 4 章の結果では、まずストップフロー光散乱法で GTF とデキストランの相互作用を解析したデータを記述した (4-1 節)。次いで、作成した GTF-Cys が化学修飾に

適しているかを評価したデータや、実際に蛍光色素で修飾した GTF-TMR について標識率等の結果を示した (4-2 節)。4-3 節では、化学修飾材料が機能を保持していることを示すデータを記述した。4-4 節では、蛍光修飾した GTF やデキストランを用いた GTF/デキストラン相互作用の多分子レベルでの蛍光顕微鏡観察結果を示した。多分子観察で GTF は α -1,3-グルカン鎖で完全に修飾されたデキストランには結合しないことが示されたが、本法ではデキストランの修飾初期段階に関する情報や詳細な分子機構に関する情報は得られない。それらを明確にするために行った 1 分子イメージングの結果を 4-5 節に記述した。1 分子イメージングは、デキストランの観察および GTF の観察の両方向から行い、それらの観察結果をもとに速度論パラメータを算出し、GTF 反応におけるショ糖の影響を速度論的に評価した。

第 5 章では、糖鎖/タンパク質相互作用研究として本研究で確立した 1 分子システムの意義や GTF 研究における意義を記述した。ついで、一連の 1 分子解析で得られたデータを総合的に検討して、これまでに知られている事実を考え合わせて GTF の作用機構を考察した。また、ショ糖が GTF/デキストラン相互作用の速度論パラメータに及ぼす要因についても考察した。現在研究が進んでいるその他の 1 分子技術を紹介し、今後 GTF の 1 分子酵素学研究で展開されるべき方向性を提案し、その意義について記述した。

【略語一覽】

BIO	: Biotin
DTNB	: 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
DXB	: Dextran binding domain
GS	: Glucan sucrose
GTF	: Glucosyltransferase
T10	: Dextran (MW, 10, 000)
T500	: Dextran (MW, 500, 000)
TIRFM	: Total internal reflection fluorescence microscopy
TMR	: Tetramethylrhodamine
TMRM	: Tetramethylrhodamine-5-maleimide
WIG	: Water-insoluble glucan

【第1章 序】

1-1 背景 1 ; グルコシルトランスフェラーゼ

1-1-1 う蝕とミュータンス連鎖球菌

う蝕は歯という人体で最も硬い組織が口腔内の連鎖球菌によって不可逆的に破壊される細菌感染症であり、”単糖・小糖類や多糖類などの炭水化物を基質として、口腔内細菌が産生した有機酸によって歯が脱灰された状態”と規定される。300種を超える口腔細菌は口腔固有のものが大部分で (Ofek and Doyle, 1994)、それらのほとんどが定住菌で唾液、舌背、および歯肉溝には、それぞれ異なる細菌叢が形成される。いずれのう蝕病巣でも分離されるのがミュータンス連鎖球菌である (Syed, et al., 1975, Hamada, 1980)。

1924年に Clarke によって最初に分離されたミュータンス連鎖球菌は、抜去歯にう蝕病変を生じさせる (Clark, 1924)。ミュータンス連鎖球菌には免疫学的特異性を異にする菌株 (a~h) の存在が知られており (Masuda, 1982, Loesche, 1986)、*S. mutans* と *S. sobrinus* の2種がヒトのう蝕発症に深くかかわっている (deSoet, et al., 1991, Okada, et al., 1995, Kohler and Bjarnason, 1987, Hirose, et al., 1993)。

ミュータンス連鎖球菌が他の口腔内常在細菌と異なる最も大きな点は、ショ糖を基質として粘着性不溶性グルカンを産生することである (Hamada, 1984)。歯質脱灰の臨界 pH 以下の酸性環境下や飢餓環境下においても酸 (主に乳酸) を産生する能力の強いことも特徴的である (Bender, et al., 1986, Ymamashita, et al., 1993, Harper and Loesche, 1984, McDermid, et al., 1986, Bowden and Hamilton, 1987, Iwami, et al., 1992, Yamada and Carlsson, 1975, Spatafora, et al., 1995)。

1-1-2 う蝕の発生 (図1)

ミュータンス連鎖球菌はショ糖非存在下でも歯面に定着するが、う蝕の発生には至らない。それはショ糖非存在下では、歯面のペリクル（唾液中の有機成分からなる0.1-1 μ mの層, Bennick and Dawes, 1985）とミュータンス連鎖球菌の菌体表層成分を介した弱い付着（初期付着）しか起こらないためである (Busscher and Weerkamp, 1987)。ペリクルに含まれミュータンス連鎖球菌に特異的に吸着する物質としては、高分子糖タンパク質 (Carlen and Olsson, 1995, Kishimoto, et al., 1989) , プロリン高含有の酸性タンパク質 (Gibbous and Hay, 1989) , リゾチーム (Roger, et al., 1994) , 分泌型 IgA (Hajishengallis, et al., 1992) , ラクトフェリン (Soukka, et al., 1994) などがある。ミュータンス連鎖球菌の表層物質の中では、フィムブリエ様タンパク質抗原 (Koga, et al., 1990), レクチン様物質 (Demuth, et al., 1990) やリポタイコ酸 (Rolla, et al., 1980) などが初期付着に関与してゐる。これらショ糖非依存性因子の付着作用はいずれも弱く、この種のメカニズムで形成された菌体集積物は物理的な刺激により歯面から容易に脱離する (Koga, et al., 1990, Gibbons, et al., 1986)。

ショ糖が供給されると、細菌表面で生成される粘着性不溶性グルカンによって細菌の歯面への吸着は強化され不可逆的な固着が起こる (Koga and Inoue, 1978)。このグルカンの合成は、ミュータンス連鎖球菌が菌体外および菌体表層に産生する複数のグルコシルトランスフェラーゼ (Kuramitsu, 1993, Mooser, 1992, Robyte, 1995, Fukushima, et al., 1982, Musaka, et al., 1986) の協同作用によって起こる。粘着性不溶性グルカンは、本菌群を初めとする酸産生細菌を歯面に固着させ、う蝕誘発性の高いプラークを形成する (Hamada, 1984, Alaluusua, et al., 1996) 。粘着性不溶性グルカンは、細菌の代謝により産生された酸の拡散を妨ぎ、酸濃度を高く保つことによってう蝕誘発性を高めている。

1-1-3 グルコシルトランスフェラーゼ (GTF)

S. sobrinus は、プライマーに影響されず高分子の水溶性グルカンを合成する GTF-S2 (S は soluble の略) と低分子の水溶性グルカンを合成する GTF-S3、プライマーにより大きく活性化を受け分岐の多い水溶性グルカンを合成する GTF-S1 と不溶性グルカンを合成する GTF-I (I は insoluble の略) の 4 種類を産生する (Abo, et al., 1991, Ferretti, et al., 1987, Gilmore, et al., 1990, Gilmore, et al., 1993, Gilpin, et al., 1985, Hanada, et al., 1991, Russell, et al., 1990, Russell, et al., 1987, Fukui, et al., 1983, Fukui, et al., 1982)。

これらグルコシルトランスフェラーゼは分子量が約 160kDa のシングルペプチドである。N 末端には、菌体外分泌のためのシグナルペプチドがある。それに続くアミノ酸約 200 個の領域は保存性は低いが、次の約 800 個の領域は保存性が高く、ショ糖分解および糖転移活性を持つ活性部位が含まれている。残りの C 末端の 500 個はデキストラン結合部位と呼ばれ、アミノ酸 50-60 個が単位の相同性の高い繰り返し配列からなる領域である (Inoue and Fukui, unpublished, Abo, et al., 1991, Ferretti, et al., 1987, Mooser, et al., 1991, Gilmore, et al., 1990, Giffard, et al., 1993, Giffard and Jacques, 1994)。その配列は *S. mutans* *Ingritt* が産生するデキストラン結合性の細胞外タンパク質 (グルカン結合タンパク質) に見られる配列 A リピート (Banas, et al., 1990) と相同性がある。

特徴的なのは、単離・精製されたグルコシルトランスフェラーゼが個々に生成する主に α -1,3-グルカン鎖から成る不溶性グルカン、および、主に α -1,6-グルカンから成る水溶性グルカンは、単独では粘着性が弱いことである。ミュータンス連鎖球菌の数種類の GTF が協同的に合成した不溶性多糖のみが強い粘着生を示す。

1-1-4 GTF の機能領域解析

本研究で用いた *S. sobrinus* の菌体外酵素である GTF-I の特徴を以下に示す。本 GTF-I も他の GTF と 1 次配列上同様の構造を有している (図 2)。Abo らは、*S. sobrinus* 6715 の染色体 DNA を制限酵素 Sau3 AI で部分消化後、その 3~5kbp の DNA 断片をプラスミド pUC18 の Bam HI 部位に挿入し、それらのプラスミドで大腸菌 JM109 を形質転換し、発現した GTF 部分ペプチドの解析を行った (Abo, et al., 1991)。その結果、GTF の C 末領域がデキストラン結合に関与していることが明らかになった。これは Mooser らが種々のタンパク質加水分解酵素を用いて GTF-I および GTF-S から得たポリペプチドの解析結果 (Mooser and Wong, 1988, Wang, et al., 1990) と一致する。更に、GTF-I' (GTF の 85-1329) をコードするプラスミド pAB2 の 3'末端を逐次に欠損する変異体の解析により、デキストラン結合には A リピート単位が 3 つ以上必要であることが示された。

シヨ糖分解/酵素活性の中心配列は DSIRVDAVD であることが化学的に決められた (Mooser, et al., 1991)。この活性中心はシヨ糖分解領域のほぼ中心に位置している (図 2)。Mooser らは *S. sobrinus* 6715 の GTF-I、GTF-S を放射能標識シヨ糖と混合後、急速変性させてグリコシル化した GTF を作成・解析した。その結果、グルコシル結合はカルボキシル基 (GTF-I では 447 番、GTF-S では 437 番の ASP) への β -アノマー結合であることが明らかになった (Mooser and Iwaoka, 1989)。また、Funane らは、*Leuconostoc mesenteroides* のデキストランスクラーゼを 1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミドと N-(1-ナフチル)エチレンジアミンで修飾し、スクラーゼ分解活性に必須なもう一つのカルボキシル基を含むペプチドを単離している (Funane, et al., 1993)。そのペプチド断片は、*S. sobrinus* GTF-I の 406-417 番目の部分に相当する (407 および 409 番の ASP が候補としてあげられる)。Kato らは、*S. mutans* GS5 株由来の GTF-I を用いて、Mooser らが決定した ASP を ASN, THR, GLU に変えたところ、いずれの変異酵素も完全に酵素活性を失っていた (Kato, et al.,

1992)。D467, D567 を他のアミノ酸に置換した変異 GTF の活性は大きく減少するものの、完全に失われることはなかった。しかし、GTF 活性のプライマー依存性や合成産物の性状に変化が見られたことは、これらの ASP の近傍が活性中心を形成していることを示唆している。

GTF-I はショ糖単独基質でも不溶性グルカンを合成する (Konishi, et al., 1999)。デキストラン結合ドメインが欠如した欠損変異体 (GS) でも不溶性グルカンの合成が認められ、デキストランはその活性に影響しない。以上の結果は、グルコシル転移を触媒する領域から構成されている GS ペプチドが α -1,3 グルカン合成能を持つこと、およびデキストラン結合領域はデキストランが結合すれば GTF-I の α -1,3 グルカン合成活性を著しく増加するが、デキストランがなければこの活性には関与しないことを示している。

1-1-5 ショ糖分解/糖転移活性部位とデキストラン結合部位の相互作用

GTF 反応における合成産物の構造やプライマー依存性の決定機構の解明が行われた。C 末端領域がデキストラン結合に関与しているから、プライマー依存性は繰り返し構造を含むドメインが決定していると推測された。*S. mutans* GS5 由来の GTF-I と GTF-S のキメラ酵素の解析が行われた結果、プライマーへの依存性は必ずしもグルカン結合領域のみに支配されないし、合成されるグルカンの結合様式も N 末端側のみでは、決定されないことが報告された (Nakano and Kuramitsu, 1992)。また、GTF-I と GTF-S で特徴的なアミノ酸残基を置換した酵素の解析が行われたが、合成産物の性状やプライマーによる活性化の度合いに、どのアミノ酸残基がどのような役割を果たしているかを特定するには至っていない (Shimamura, et al., 1994)。全体的な酵素の立体構造の中で、2つのドメインの微妙な相互作用で酵素の性質が決められていると考えられる。

1-1-6 GTF の酵素反応速度論

GTF 酵素反応のスキームは、Ping Pong Bi Bi 機構で表すことができる (図 3、Konishi, et al., 1999, Matsuno, 1997)。GTF (E) はショ糖 (g-f) を分解した後グルコシル化酵素 (Eg) となりデキストラン (D) と結合する。デキストラン上にグルコース (g) グルコースが転移したデキストラン (gD) は GTF から解離する。GTF 酵素反応の速度論パラメータを以下に示す。酵素反応速度 (v) は触媒中心活性 (k_{cat})、デキストランに対するミカエリス定数 ($K_m(D)$)、ショ糖に対するミカエリス定数 ($K_m(S)$) を用いて 1 式で表される。 $[E]_0$ は酵素全濃度、 $[S]$ はショ糖濃度、 $[D]$ はデキストラン濃度を表している。 k_{cat} 、 $K_m(D)$ 、 $K_m(S)$ は図 3 に示す速度定数を用いて、2~4 式のように表される。

$$v = k_{cat} [E]_0 [S] [D] / (K_m(D) [S] + K_m(S) [D] + [S] [D]) \quad (1)$$

$$k_{cat} = k_2 k_4 / (k_2 + k_4) \quad (2)$$

$$K_m(D) = k_2 (k_{-3} + k_4) / k_3 (k_2 + k_4) \quad (3)$$

$$K_m(S) = k_4 (k_{-1} + k_2) / k_1 (k_2 + k_4) \quad (4)$$

1-1-7 GTF の高次構造

GTF 分子の立体構造は解かれていない。急速凍結ディープエッチ・レプリカ像の電子顕微鏡法による観察から、GTF-I 分子は全体として洋なし型を有していることが明らかになった (図 4)。また、ショ糖分解・糖転移ドメインとデキストラン結合ドメインは独立して存在する。デキストラン存在下では、デキストラン結合ドメインの構造変化が認められる (Konishi, et al., 1999)。立体構造既知のタンパク質との比較により、GTF の中心部分は α/β バレル構造を有していると予測されている (MacGregor, et

al., 1996, Monchois, 1999)。また、円二色性スペクトル解析により、デキストラン結合ドメインは、主に β 構造とランダムコイルから成ることが推定された (Baba, 1999, Monchois, et al., 1999)。

1-1-8 GTF-I に関するクローン

英保ら (Abo, et al., 1991) は、イムノブロットスクリーニングにより、5つの GTF-I 変異体を得た (AB1~AB5)。pAB1 には、全 GTF-I 遺伝子が含まれ (4,776bp)、発現タンパク質は *S. sobrinus* 6715 の培養上清から単離、精製された GTF-I 酵素と同様の活性を示す。pAB2 は、GTF-I の 85 ASP から 1329 ILE まで (GTF-I) をコードするプラスミドである。pAB1 と pAB2 を用いて、さらに GS, DXB-4R, DXB-6R をコードするプラスミドが作成された (図 2)。GS は C 末端のデキストラン結合領域を欠如しており、DXB(4R) および DXB(6R) はデキストラン結合のみから成り、前者は A リピートの 4 回繰り返し、後者は 6 回繰り返しを有する。

これらの発現タンパク質は、i) システイン残基を 1 つも含まない (DXB のみ pUC18 由来のシステインを N 末端に含む) ii) 熱、酸、アルカリ、SDS、グアニジン存在下による可逆的変性を受ける。iii) 大量発現が可能であり、(500ml 培養で 30-50mg 回収) 精製も容易である、という特徴を持つ。i) は、遺伝子操作により、化学修飾の標的となるシステイン残基を任意の場所に導入できることを意味する。ii), iii) は、タンパク質の取り扱いが比較的容易で実験材料に適していることを意味する。

1-1-9 GTF-I がつくるグルカンの構造

デキストラン非存在下で合成されるグルカンの結合様式が ^{13}C -NMR で解析され (Konishi, et al., 1999, Colson, et al., 1974, Fukui, et al., 1982)、GTF-I、GS によって合成される不溶性グルカンは α -1,3 結合であることが知られている。デキストラン存在下で合成された不溶性グルカンでは、 α -1,6 のグルカン鎖 (デキストラン) に α -1,3 鎖の分岐が形成されてる。

Fukui 等は *S. sobrinus* の GTF-I を単離・精製し、GTF-I がデキストラン存在下でつくる不溶性グルカンの化学構造の解析を行い、 α -1,6-結合で繋がったグルコース鎖を骨格とし、平均で 10 残基のグルコースごとに α -1,3,6 分岐が存在し、そこから α -1,3 グルカン鎖 (平均 220 残基) が伸長していることを報告した (図 5, Fukui, et al., 1982)。

小川等の X 線回折法による報告によると、 α -1,3 グルカン鎖はほとんど完全に伸びたシート状構造を有している (Ogawa, et al., 1981)。その構造は、 β -1,4-グルカンであるセルロースと類似しており、これらのシート状構造が不溶化する原因であると考えられる。

1-2 背景 2 ; 1 分子酵素学

1-2-1 1 分子科学の夜明け

近年、生体分子の特徴を 1 分子レベルで解析する様々な技術革命が起こり、生体反応の素過程を直接解析できるようになった。蛍光標識分子の蛍光顕微鏡観察 (Morikawa and Yanagida, 1981, Yanagida, et al., 1984, Kabata, et al., 1993)、金コロイド標識や光ピンセット法による細胞膜タンパク質の運動解析 (Sako and Kusumi, 1994, Tomishige, et al., 1998, Sako and Kusumi, 1995, Sako, et al., 1998)、相関蛍光法による単一分子の大きさや形の解析 (Rigler, et al., 1993)、熱レンズ顕微鏡による分子の定量や分布測定 (Kitamoti, 1998, Miwatari, et al., 1998)、走査トンネル顕微鏡による DNA 1 分子観察 (Kawai, 1999)、原子間力顕微鏡によるフォールディング (Wang and Ikai, 1999) や分子間力計測 (Nakajima, et al., 1997)、電子顕微鏡による立体構造解析 (Katayama, et al., 1998, Katayama, 1998) などが報告されている。これらの新しい技術によって、多分子の平均を解析する溶液系の実験では知り得なかった事実が次々に見い出されている。

1-2-2 蛍光標識法による 1 分子イメージングと応用

多数の蛍光色素で標識した 1 つの生体分子の観察は、国内の研究者によって次々に達成された。生体分子の 1 分子観察は、まず DNA で成功した (Morikawa and Yanagida, 1981)。タンパク質ではアクチンフィラメントの観察 (Yanagida, et al., 1984) が最初であり、この技術はモータータンパク質研究に大きな発展をもたらした。1 分子の RNA ポリメラーゼが DNA 鎖上を滑る様子も直接観察された (Kabata, et al., 1993)。

蛍光標識法の技術は発展を続け、現在では 1 個の蛍光色素分子を”見る”ことが可能となった (Funatsu, et al., 1995)。これにより、生体分子の機能をほとんど損なわずに直接観察することができるようになった。さらに、蛍光標識した単一分子を”操る”、”

計る”技術も誕生した (Funatsu, et al., 1997, Harada, et al., 1998)。

水溶液中において生体分子 1 個が実際に機能しているところを直接イメージングする技術によって、i) 蛍光を使って生体分子 1 個をビデオレート (ビデオの速さ ; 30 画像/秒の時間分解能) で見ること、ii) ATP の結合・解離などの 1 分子イメージング、iii) 1 分子の動きのイメージング、iv) 1 分子の補足と操作、v) 分子間相互作用により 1 分子に働く力の計測、vi) ATP 分解反応と力発生の同時計測等が実現している。

1-2-3 1 分子直視の意義

生化学、分子生物学、ゲノムプロジェクト等のめざましい進歩により、多くの生体分子の実在が明らかとなった。そこには塩基配列から新しく発見された分子をはじめとして機能未知の分子が多数存在する。また、構造生物学の発展によって、多くの生体分子の構造が原子レベルで解明されて多くの問題が解決された。しかし、微細構造が解かれても、分子メカニズムが解明されないケースが多々ある。例えば、筋肉の構成タンパク質であるアクチン (Kabsch, et al., 1990)、ミオシン (Raymant, et al., 1993) は共に分子構造が解かれているが、モーター機能は未だ明確でない。1 分子技術の登場は、分子モータータンパク質研究に新展開をもたらしただけでなく、タンパク質化学界に新たな知見を与え続けている (後述)。1 分子技術は生体分子の分子機能解明に直接的で強力な証拠を提供する。それは、アクチンフィラメント 1 本のイメージング技術 (Yanagida, et al., 1984) を用いて F1-ATP 分解酵素の回転運動が直接証明され (Noji, et al., 1997)、1997 年のノーベル化学賞受賞の重要な契機となった事例に現れている。

1-2-4 長所と短所

1 分子技術は i) 分子の履歴が問題となる（滑りや回転運動を扱う）場合、ii) 化学種の定義や反応式の基本的枠組みが明確でなく、観察から出発しなければならない場合に真価を発揮する。一方、1 分子ダイナミクスは観察の為に化学修飾や固定化が必要であり、生体分子の生物活性を損ねかねないという欠点を持つ。また、多数の測定を行い統計処理が必須である。

1-2-5 酵素反応の 1 分子イメージング

1 分子酵素反応のイメージングはミオシン分子による ATP の加水分解反応で初めて成功した (Funatsu, et al., 1995, Tokunaga, et al., 1997, Iwane, et al., 1997)。イメージングは、以下のようにして行われた。i) 蛍光 ATP からの蛍光をシグナルとする。ii) ブラウン運動を味方にする。つまり、酵素反応中はヌクレオチドがガラス表面下のミオシン分子上に止まっているので蛍光 ATP からの蛍光が明瞭な輝点として見えるが、反応していないときはブラウン運動をしているので蛍光 ATP (ADP) の蛍光像は観察されない。iii) エバネッセント照明 (図 6a) による局所励起によりバックグラウンドを下げる。こうした工夫と明るく退色しにくい蛍光色素である Cy3 (Souyhwick, et al., 1990) で標識した ATP (Cy3-ATP) を用いて酵素反応の 1 分子イメージングが成功した。図 6b にミオシンモータードメイン (S1) による Cy3-ATP の 1 分子加水分解反応の観察例を示す。ガラス表面上に蛍光色素 Cy5 で標識した S1 分子を吸着させてその位置を確認し、その場所で点灯する蛍光 (ヌクレオチド) が観察された。S1 に Cy3-ATP が結合している間は蛍光の点像が観察されるが、Cy3-ATP が S1 分子上で加水分解されて Cy3-ADP になると S1 との結合が弱くなり直ちに解離するので蛍光は見えなくなる。つまり、S1 が存在する場所の点滅は ATP の加水分解反応を意味している。蛍光 ATP が結合している時間 (Dwell time) は減衰時間 9 秒の指数関数を示し、水溶液中での加水分解速度とよい一致を示す (図 6c)。

1-2-6 エバネッセント場を用いた 1 分子測定の実用例

エバネッセント場を利用した 1 分子蛍光イメージングでは、ビデオレートで化学反応を計測することができる。この技術を光ピンセット法やナノ計測技術と組み合わせれば、化学反応と力学反応を同時に計測することも可能である (Ishijima, et al., 1998)。偏光したレーザーにより形成したエバネッセント場を用いた 1 分子偏光イメージング法 (Kinoshita, 1998) や 1 分子蛍光スペクトル法 (Wazawa, 1999)、1 分子蛍光エネルギー移動法 (Ha, et al., 1999, Ishii, 1999, Yokota) など、タンパク質の物理化学的性質の解析にエバネッセント場照明が広く使われている。

1 分子イメージング法は、主に分子モーター (ミオシン、キネシン) を研究材料に発展を遂げた。ミオシンの研究では、イメージングと力計測の組み合わせにより、5.5 nm (アクチンモノマーの直径に対応) の複数ステップを行うこと (Kitamura, et al., 1999) や、分子内にエネルギーを貯蔵できる機構を有する (Ishijima, et al., 1998) ことが報告された。キネシンファミリー (NCD も含む) では、微小管上の滑り速度や Processive な運動や運動の方向性に関する一連の研究 (Case, et al., 1997, Romberg, et al., 1998, Vale, et al., 1996) がなされ、詳細な分子機構が検討されている。さらに、単頭キネシンの 1 種である KIF 1 (Okada and Hirokawa, 1999)、ある種の単頭の内腕ダイニン (Sakakibara, et al., 1999, Kikumoto, et al., 1999)、またミオシン V (Sakamoto, et al., 1999) の Processive な運動の解析にも本法が利用され、1 分子イメージング法はモータータンパク質の研究分野に必須の手技となっている。

モータータンパク質以外の生体分子にも 1 分子技術は応用されている。RNA ポリメラーゼの DNA 鎖に沿った運動も直接観察され、転写開始の分子機構解析が 1 分子レベルで行われた (Harada, et al., 1999)。特に、プロモーター領域との相互作用が検討され、RNA ポリメラーゼとの相互作用は DNA の伸展状態に影響することが明らかにされた。ATP 合成酵素である F1 ATPase の回転運動は、 γ サブユニットに蛍光標識アクチンフィラメントを付けて観察することで直接証明された (これは、エバネッセント場を用いて

いない、Noji, et al., 1997) が、偏光を用いた 1 分子偏光イメージングによっても、詳細な解析が行われている (Kinoshita, 1998, Adachi, et al., 1999)。

更に、1 分子を 2 つの異なる蛍光色素で標識して行う 1 分子蛍光エネルギー移動法を用いて、1 分子レベルでリガンド結合に伴うタンパク質の立体構造の変化や揺らぎの解析も行われている。本法により、細胞骨格タンパク質 コネクチンの天然/変性条件下の立体構造の変化 (Chu, 1999) やシトクロム C でのモルテングロビュール状態における数百ミリ秒～秒オーダーの動的構造変化 (Nishida, et al., 1999)、またアクチン (Yokota) やトロポニン (Ishii, 1999) の秒オーダーの揺らぎが見いだされている。Staphylococcal ヌクレアーゼ (Ha, et al., 1999) では、ミリ秒オーダーで DNA やインヒビター結合に伴うタンパク質立体構造のダイナミックな性質の変化が調べられた。

最近では、生きた細胞中の生体分子 1 分子イメージングも可能となった。培養上皮細胞上の EGF と EGF レセプターが 1 分子レベルで可視化され、EGF レセプターの活性化機構や 2 量体形成機構が解析されている (Sakou and Yanagida, 1999) 。核内で 1 分子の mRNA がブラウン運動している様子も可視化された (Tadakuma, et al., 1999)。

分子シャペロン Gro EL と Gro ES の相互作用の様子や GFP を用いたフォールディング過程の 1 分子解析も成功している (Ueno, et al., 1999, Yamasaki, et al., 1999)。

現在までに、タンパク質/糖鎖の相互作用を 1 分子レベルで解析した報告はない。

1-2-7 糖鎖研究における 1 分子イメージングの意義

生体情報伝達を担う様々な生理活性や構造安定性にかかわる糖鎖は、核酸、タンパク質に続く第 3 の鎖として注目されている。糖鎖結合タンパク質との相互作用の仕組みを解明することは生物学的に重要であり、医学的応用性を秘めている。タンパク質の認識部位が繰り返し存在する糖鎖においてはタンパク質/リガンド相互作用解析の特殊な系と見なすことができタンパク質化学的に興味深い。そういった系には、GTF/デキストランを初めとして、デキストラナーゼ/デキストラン (Barrett, et al., 1987)、フルクト

シルトランスフェラーゼ/フルクタン (Russell, et al., 1983)、フルクタナーゼ/フルクタン (Burne, et al., 1999)、セルラーゼ/セルロース (Linder, et al., 1999)、アミロ-(1,4→1,6)-トランスグルコシダーゼ/グリコーゲン (Bastianini and Fruschelli, 1966)、アミラーゼ/デンプン (Fujimoto, et al., 1998)、シクロアミロースグルカノトランスフェラーゼ/デンプン (Terada, et al., 1997)、キチナーゼ/キチン (Wiwat, et al., 1999)、ザイラーゼ/ザイラン (Usui, et al., 1999)、ムタナーゼ/ムタン (Guggenheim and Haller, 1972)、また一連の糖転移酵素系 (ガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素など (Mooser, 1992)) などが含まれる。いずれの場合においても、タンパク質が糖鎖を修飾し糖鎖の構造や性質が変化するため、それらの相互作用を通常の生化学的、物理化学的手法で定量的に解析することは困難である。1分子直視法はこういった系においても真価を発揮する。

糖鎖には、すでに医学的重要性が見いだされているものもあり (菌体由来 (1-3)- β -D-グルコピラナンの抗腫瘍活性、ニンジン (1,6)- α -D-グルコピラナンの血糖降下作用、N-アセチル-D-グルコサミン (キチン) の免疫活性化、創傷治癒効果など)、今後の臨床応用が期待されている。糖鎖コンジュゲートをドラッグデリバリーシステムに利用する基礎研究も行われている。また、細胞認識や生体防御には糖鎖が重要な役割を担っており、それらの分子機構の解明が盛んに行われている (Iwase, et al., 1994, Hatanaka, et al., 1997)。

これまでの糖鎖研究は主に精製、構造解析が行われ、多種の糖鎖の存在が明らかになっている。一方、糖鎖修飾に関わる多くの酵素も見いだされている。しかし、それらの分子機構の詳細はほとんど明確にされていない。今後、遺伝子工学のように、糖鎖の分解タンパク質、合成タンパク質、転移酵素等を用いて糖鎖の自由設計が可能になれば、糖鎖研究の発展やその広い応用が期待される。そのためにも、糖鎖と相互作用するタンパク質の機能を十分に理解することは、不可欠である。

1-3 研究の目的

GTF がデキストランに特異的に結合することは古くから知られているが (Fukui, et al., 1982, Abo, et al., 1991, Mooser and Wang, 1988, Wang, et al., 1990, Kato and Kuramitsu, 1990, Kato, et al., 1992)、定量的な解析は成功していない。当研究室では、様々な物理化学的手法を用いて GTF/デキストランの相互作用を定量的に解析している。その結果、ショ糖非存在下では $\sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ という結合定数で相互作用することが判明した (Kaseda, et al., unpublished, Hirata, 1998)。ショ糖存在下では不溶性グルカンが合成される為、光散乱測定やカロリメトリーなどの方法で定量的に解析することは非常に困難であるばかりでなく、装置の破損を招く可能性もある。本研究では、1分子直視法によりショ糖存在下での GTF/デキストランの相互作用を解析した。

GTF/デキストラン相互作用の1分子系が GTF 研究に新たな発展をもたらすことは必至である。GTF はデキストラン上に多数の α -1,3 分岐鎖を合成する (図 5、Fukui, et al., 1982)。これは、GTF 分子は何らかの方法である分岐サイトから別のサイトに移動することを意味している。その方法には、GTF の結合/解離の繰り返しや、デキストラン鎖に沿った滑りが考えられる。それを明確にする最善の方法は1分子直視法である。デキストランの固定化技術を駆使すれば、GTF のサイト間移行問題に迫ることができる。また、GTF は大きく分けると2つのドメインから成っており、デキストラン結合に伴うドメイン間の相対的な構造変化が観察されている (Konishi, et al., 1999)。リガンド結合に伴うタンパク質内構造変化 (タンパク質内情報伝達) の分子機構に迫る技術に1分子蛍光共鳴エネルギー移動法がある。今後、これらの解析を行う為にも、まず GTF の1分子システムを構築する必要がある。GTF/デキストラン相互作用の1分子系の確立は、糖鎖研究の先駆けともなる。また、新たな1分子バイオシステムの開発は、次々と新しい知見をもたらしている1分子酵素学の支持、発展につながる。

【第2章 材料と方法】

2-1 タンパク質の精製と定量

2-3-1 GTF-Cys 作成

GTF-I を蛍光色素標識（イメージング用）およびビオチン化（固定化用）する為に、GTF にシステイン残基を導入した。トリプシン消化後の酵素活性測定（Okamoto, 1997）および GTF 欠損変異体の解析（Abo, et al., 1991）より、GTF の N 末端および C 末端には機能に直接関与しない領域が存在することが示唆された。GTF の C 末端に遺伝子工学的 (Molecular Cloning, Current protocols in molecular biology) にシステインを導入した（図 7）。遺伝子操作に用いたプラスミド DNA は、アルカリ-SDS 法で精製した。GTF-I をコードするプラスミドが組み込まれた大腸菌 (pAB2/JM109) をアンピシリン入の LB プレートで培養し、形成したシングルコロニーを LB 培地に植菌し一晚培養後、遠心 (10,000g, 5min) で集菌した。菌体に氷冷した STE 溶液 (0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.8), 1mM EDTA, auto-clave 121 °C, 20min) を加え懸濁した。Solution I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA, ろ過滅菌) を加えて良く懸濁し 5 分間放置した。Solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) を加え溶菌した後、Solution III (5M 酢酸カリウム (pH 4.8), auto-claved) 添加により、菌体 DNA やタンパク質を凝集させ、遠心 (10,000g, 10 分, 4°C) 除去した。イソプロパノール処理後の遠心沈殿に 70%エタノールを加えて遠心した。沈殿を DNA Speed Vac (DNA110, Savant) を用いて乾燥させ TE (10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA) を加えた。アルカリ-SDS 法で得たプラスミド DNA に RNase (Takara) を加え、37°C で 1 時間インキュベーションした。フェノール・クロロホルム液を加え遠心後、上清を得た。クロロホルム液を加え遠心し（前処理を合わせてフェノール処理とする）、その上清にエタノール/酢酸ナトリウムを加えて遠心した。沈殿に 70%エタノールを加え（前処理と合わせてエタノール沈殿処理とする）、遠心後の沈殿を乾燥し、TE を加えて精製プラスミド DNA (pAB2) とした。DNA の濃度は、吸光度測定 (260nm, 280nm) で算出

した。

pAB2 (4 μ g) に制限酵素 Xba-I (30unit, Takara) を加え、0.01%BSA, 0.1% Triton X-100, 10mM Tris (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 37°C 中で 2 時間消化した。TE で飽和したフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加え、遠心により Xba-I を除去した。遠心上清にクロロホルム/イソアミルアルコールを加え遠心した。上清をエタノール沈殿後乾燥し、滅菌蒸留水を加えた。pAB2 が Xba-I で適切に消化されていることをアガロース (0.75%) 電気泳動で確認した。

Xba-I 処理した pAB2 (200ng) に S1 ヌクレアーゼ (2.5 unit, Takara) を加え、30mM 酢酸カリウム、250mM NaCl, 1mM ZnSO₄, 5% glycerol, 25°C 中で 30 分処理した。ヌクレアーゼ反応を 5mM EDTA および加熱 (70°C, 10 分) 処理で停止し、エタノール沈殿で回収した DNA を乾燥させ TE を加えた。

削り込みを行ったプラスミドに 0.2unit の T4 リガーゼ (Takara) を加え、40mM Tris-HCl (pH 7.6), 8mM MgCl₂, 0.8mM ATP, 4% PEG, 0.8mM DTT, 25°C 中で 1 時間反応した。フェノール処理により除タンパク質を行った後にエタノール沈殿により DNA を回収した。遠心乾燥した DNA (pAB2-Cys) に TE を加え 4°C で保存した。pAB2-Cys をエレクトロポレーション (Gene Pulser™, BIO-RAD, 1.8kV) により、大腸菌 JM109 に組み込んだ直後に、37°C で予温した SOC 培地 (2% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucose, pH7.4, auto-claved) 中で 1 時間培養した。アンピシリン入りの LB プレートに植菌し、37°C で一晩培養した。約 20 ヶのシングルコロニーを拾い LB 培地で培養後、アルカリ-SDS 法でプラスミドを精製した。大半のプラスミドはアガロース電気泳動上では元のプラスミド pAB2 とほぼ同じ移動度を示したが、Xba-I による制限切断を受けなかった (Data not shown)。QIAprep 8 (Qiagen) でプラスミドを精製し、M13 primer M4 と M13 primer RV (Takara) および Terminator Ready Reaction Mix (Perkin Elmer) を用いてサイクルシーケンスを行った後で、DNA シーケンサー (ABI PRISM™377, Applied) で DNA 配列を解析した (図 7)。

2-1-2 GTF (GTF', GTF-Cys) 精製 (Konishi, et al., 1999)

GTF (GTF-I または GTF-Cys) をコードするプラスミド (pAB2 または pAB2-Cys) で大腸菌 JM109 を形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを含む 250ml の 2 \times YT 培地 (70mg/ml BactoTryptone, 22mg/ml Yeast Extracto, 11mg/ml NaCl, 37 $^{\circ}$ C) 中で培養し、対数増殖終了時 (OD660 = 1.0) に isopropyl- β -thiogalactoside (IPTG) により誘導をかけ、2.5 時間後に遠心 (7500 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10min) で集菌後、菌体を氷冷下で超音波処理 (100W, 30sec \times 6) した。遠心 (100,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 60min) で上清を回収し粗抽出標品とした。粗抽出標品を硫酸分画 (30-50%) 後、10mM Na-phosphate (pH6.8) に対して透析し、同緩衝液で平衡化した DEAE Toyopearl 650M (Tosoh corp) カラムに吸着させ NaCl の直線濃度勾配 (0-0.4M) で溶出した。この時の最大ピークフラクションのうちショ糖分解活性が高く、SDS-PAGE/クマシーブルー染色で純度が高いものをプールして精製分画とし、10mM Na-phosphate (pH6.8) に透析し精製酵素とした。精製酵素は冷凍保存 (-80 $^{\circ}$ C) した。

2-1-3 DXB(4R) 精製 (Sawada, 1997)

DXB (4R) をコードするプラスミドで形質転換した大腸菌を GTF', GTF-Cys と同様に培養、誘導、集菌した後に氷冷し、4M Gnd-HCl 存在下で超音波処理 (100W, 30sec \times 6) した。その後、遠心 (7500 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10min) 上清を 10mM Na-phosphate (pH6.8) に透析した。遠心 (7500 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10min) 上清と沈殿を再度 4M Gnd-HCl 処理、透析した後の遠心上清を混合し粗抽出標品とした。粗抽出標品を硫酸分画 (0-50%) 後、10mM Na-phosphate (pH6.8) に透析し、同緩衝液で平衡化した Sephadex G100 樹脂に吸着させ、ビーズを 10mM Na-phosphate (pH 6.8)、引き続き 0.3M NaCl/10mM Na-phosphate (pH 6.8) で洗浄した。ビーズをカラム (1.5 \times 60cm) に詰め、0.3M NaCl/10mM Na-phosphate (pH 6.8) で洗浄した後で、4M Gnd-HCl の直線勾配で溶出した。精製分画を DTT で還元した後に、10mM Na-phosphate

(pH6.8)に透析した。HPLC (TSKgel G2000SWXL, 7.8×300mm)によるゲルろ過を行い、最大ピークフラクションのうち、SDS-PAGE/クマシーブルー染色で単一バンドとなるものを精製分画とした。精製酵素は、ディープフリーザー(-80℃)に保存した。

2-1-4 タンパク質の定量

それぞれのタンパク質の濃度は、アミノ酸組成から計算した分子吸光係数 (GTF, $2.01 \times 10^5 \text{ M cm}^{-1}$; GTF-Cys, $2.01 \times 10^5 \text{ M cm}^{-1}$; DXB, $0.47 \times 10^5 \text{ M cm}^{-1}$) を用いて、280nmの吸光度から算出した。

2-1-5 システイン含有量定量 (Ellman, 1959, Riddles, et al., 1983)

精製 GTF-Cys 標品 (純度 86%) を更にアフィニティー精製した。1mg/ml GTF-Cys を 10mM Na-phosphate(pH 6.8), 100mM NaCl, 30% (v/v) Sephadex G-100, 25℃で15分インキュベーションした後に、30分静置してSephadexビーズの沈殿を回収した。ビーズを10mM Na-phosphate (pH 6.8), 100mM NaCl (Buffer A) で3回洗浄した後で、3mg/ml デキストラン T10 を含む Buffer A で Sephadex G-100 に結合した GTF-Cys を洗い流し、30分放置後の上清をシステイン定量用の GTF-Cys (純度 96%) とした。タンパク質の純度は、デンストメトリーで決定した。

0.1M Na-phosphate (pH 8.0) 2ml に 10mM DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) 0.1ml を加え、吸光度 (412nm) を測定し OD ref とした。既知量 (2~6nmol) の GTF-Cys (0.1ml) を添加直後に吸光度を測定し、OD sample とした。(OD sample-OD ref*2.1/2.3)/14,150 により、システインの濃度を算出し、GTF-Cys との濃度比から、天然条件下でのシステイン含有率を決定した。同様の測定を 6M Gnd-HCl 存在下でも行い変性条件下でのシステイン含有量を決定した。この場合のシステイン濃度は、(OD sample-OD ref*2.1/2.3)/13,700 で求めた。GTF-Cys 溶液中に含まれる T10 は、DTNB による発色反応に影響しなかった (Data not shown)。

2-2 化学修飾

2-2-1 GTF-TMR と GTF-BIO (図 8)

50 μ M GTF-Cys を 20mM Na-phosphate (pH 7.5) 中で 150 μ M TMR-maleimide (図 9) と室温 (25°C) で 2 時間反応させ、10mM DTT で修飾反応を停止した (Molecular Probes, Product information sheet)。20mM Na-phosphate (pH 6.8) で平衡化した Toyopearl HW40-F (Tosoh Corp.) によるゲルろ過により、未反応の TMR-maleimide を取り除いた。蛍光標識された GTF 画分を回収し、遠心 (10,000 \times g, 15 分, 4°C) 後の上清を GTF-TMR として用いた。TMR のラベル率は、GTF-Cys をスタンダードとして、BIO-RAD PROTEIN ASSAY を用いたタンパク質定量 (Bradford, M. 1976) と、TMR の分子吸光係数 ($9.7 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ at 542nm, Molecular Probes) を用いた分光測定より決定した (70% 標識)。

同様に Biotin-PEAC₅-maleimide (Dojindo) による GTF-Cys の標識を行い GTF-BIO を作成した。

2-2-2 Dextran-TMR と Dextran-BIO の作成 (図 10, 11)

100mg/ml デキストラン T10 (Wr, 10,000, Amersham Pharmacia) を 120mM メタ過ヨウ素酸 (Wako) で処理 (4°C, 6 時間) した。T10 鎖中の開裂したグルコース量を分光学的 (メタ過ヨウ素酸のモル吸光係数 $\epsilon_{310\text{nm}}, 81 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) に定量し、5~10 ヶに 1 つのグルコース残基が開裂していることを確かめた。3%亜硫酸水素ナトリウム (Wako) を添加した (まず、デキストラン溶液が褐色になり、透明化するまで加えた) 後で、Milli Q に対して透析し T10-ジアルデヒド (18mg/ml) を得た (Glick, et al., 1962, James, et al., 1954)。

8mg/ml T10-ジアルデヒドを 100mM Na-acetate (pH 5.6) 中で、100mM 2-acetamide-4-mercaptobutanoic acid hydrazide (AMBH, Molecular Probes) と 25°C で 4 時間反応後、Milli Q 水に対して透析して AMBH 化 T10 (4.4mg/ml

T10-AMBH) を得た (Heitzmann and Richards, 1974, Tam, et al., 1976, Taylor and Wu, 1980)。

3.5mg/ml T10-AMBH を 20mM Na-phosphate (pH 7.5) 中で 3mM の TMR-maleimide と混合し、室温 (22°C) で 5 時間放置した後で、10mM DTT で反応を停止した。透析と Toyoperl HW40-F を用いたゲルろ過により、未反応の TMR-maleimide を除去した。

T10 に導入された TMR の量を、フェノール硫酸法 (Dubois 1956) によるデキストラン定量と TMR の分光学的定量より求めた結果、TMR 標識率は 54% だった。

デキストラン T500 (Wr, 500,000, Amersham Pharmacia) を用いて同様に T500-TMR (標識率 400%) を作成した。また、T500 を Biotin-PEAC₅-maleimide で化学修飾し T500-BIO を得た。

TMR は、少なくとも測定した溶液に存在する濃度では、発色反応 (BIO-RAD PROTEIN ASSAY および、フェノール硫酸反応) に影響しなかった (Data not shown)。

2-2-3 Biothynilated BSA

3mg/ml BSA (Sigma), 100mM NaHCO₃ (pH8.5) に DMF に溶解した OSu(AC₅)₂ (Dojindo) を 20 当量加え、室温 (23°C) で 90 分放置した。氷中で 4mM Glycine を加え、反応を停止し 10mM K-phosphate (pH 6.8) 中で透析して Biothynilated BSA を得た。

2-3 酵素活性測定 (Konishi, et al., 1999, Hanamoto, 1996)

冷凍 (-80℃) 保存しておいた GTF (GTF', GTF-Cys, GTF-TMR) を解凍後、遠心 (10,800×g, 20分, 4℃) し、その上清を用いた。デキストラン有り無しで反応溶液 (20nM GTF, 10mM MOPS, 100mM NaCl, pH7.0) を作成し、25℃で10分間インキュベーションした後に、終濃度 100mM のショ糖を添加して酵素反応を開始した。4分後に 5% SDS/0.8M Na₂CO₃ (pH10) を加えて反応を停止した。反応溶液 500 μl に対して 40 μl の飽和 KCl を添加後、遠心 (16,000×g, 15分, 4℃) により、GTF を SDS 複合体として沈殿させた。遠心上清 300 μl に 500 μl の MilliQ 水と 200 μl の ATP 溶液 (24mM ATP (Boehringer), 68mM NADP (Wako), 48mM MgCl₂, 80mM EPPS, pH10.0) を加え、吸光度 (340nm) を測定した (ODbuf)。HK/G6PDH 溶液 (68u/ml ヘキソキナーゼ (Boehringer), 34u/ml グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (Boehringer), 10mM MOPS, pH 7.0) を 15 μl 添加 10 分後に OD₃₄₀ を測定し (ODglu)、ODglu と ODbuf の差と生成した NADPH のモル吸光係数 (6220M⁻¹ cm⁻¹) より、遊離のグルコース量を求めた。更に、PGI 溶液 (470u/ml イソメラーゼ, Boehringer) を 15ul 加えて 15 分後に OD₃₄₀ を測定し ODfru とした。ODfru と ODglu の差から、遊離のフルクトース量を求めた。遊離のフルクトース量から、GTF のショ糖分解活性を、また遊離のフルクトースとグルコースの差から、グルコシル基転移活性を算出した。

2-4 多分子イメージング

2-4-1 GTF/デキストラン相互作用の蛍光顕微鏡観察

Sephadex G-100 (Cross-linked dextran, Amersham Pharmacia) を GTF-TMR と Buffer A 中 25℃ で 15 分 インキュベーションした後、ビーズに結合していない GTF-TMR を Buffer A で洗浄除去した。ビーズを蛍光顕微鏡 (Olympus BH2-RFL; 励起フィルター, G; ダイクロイックミラー, G; 吸収フィルター, O570; 対物レンズ, ×10; 接眼レンズ, ×15) 下で透過光像または蛍光像として観察し、画像を CCD カメラ (Hamamatsu) を通してパーソナルコンピュータに取り込んだ。

2-4-2 GTF/WIG 相互作用の蛍光顕微鏡観察

WIG を GTF-TMR (2 μ M)/T10 (2 μ M)/ショ糖 (100mM, Wako)、または、GTF-Cys (0.3 μ M)/T10 (2 μ M)/ショ糖 (100mM) を用いて Buffer A 中で 2 時間反応させて作成後、蛍光顕微鏡観察した。

2-5 1 分子イメージング

2-5-1 試料の調製と観察

TMR で蛍光標識した GTF およびデキストランの 1 分子観察を全反射蛍光顕微鏡 (Total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) を用いて行った。

イメージングに用いた石英スライドガラスとカバーガラスは、0.1N KOH とエタノール中で超音波処理した後に Milli Q 水で洗浄した (Harada, 1995)。試料のスライドガラスへの滴下は、ほこりの付着を避けるためクリーンベンチで行った。

T500-TMR の 1 分子観察の試料は以下のように作成した。スライドガラスにビニールの切れ端を置き、その上にカバーガラスを乗せてフローチャンバーとした (図 12)。1.5mg/ml の Biothynilated BSA (15 μ l) をフローチャンバーに加え 2 分放置した後、Buffer A (50 μ l) で 2 回洗浄した。2.5mg/ml ストレプトアビジン (10 μ l) を加えて 5

分後に Buffer A (50 μ l) で 3 回洗浄した (Itakura, et al., 1993)。1 μ M GTF-BIO (10 μ l) を添加し 5 分後に、Buffer A (50 μ l) で 2 回洗浄後、0.3nM T500-TMR (15 μ l) を添加し、5 分後に Buffer A (50ul) で 4 回洗浄した。退色防止剤 (4.5mg/ml グルコース, 216 μ g/ml グルコースオキシダーゼ, 36 μ g/ml カタラーゼ、0.5% β -メルカプトエタノール, Harada, et al., 1990) を含む Buffer A または Buffer A/100mM ショ糖 (50 μ l) を添加した (図 13a) 。同様の反応溶液を、最後に 40nM T500 存在下で作成した。また、GTF-BIO の代わりに 4R-BIO を用いた試料も作成した。

GTF-TMR 1 分子観察には、フローチャンバーをビオチン/アビジン系でコートした後に、0.5 μ M T500-BIO (10 μ l) を添加し、洗浄後に 1nM GTF-TMR (10 μ l) を加えた (図 13b) 。退色防止剤を含む BufferA または Buffer A/100mM ショ糖を添加した。最後に、57 μ M GTF' (2 μ l) を加えた試料も作成した。

アセトンで希釈した市販のマニキュアでカバーガラスの周辺を接着し、アッセイチャンバーを蛍光顕微鏡システム (図 14, Yokota, et al., 1998) にセットした。

Frequency Nd:YAG laser (wavelength, 532nm) から得た 4.4mW のビームを 200 μ m \times 200 μ m の試料面 (スライドガラス表面) に照射し全反射させた。蛍光色素 1 分子が発する蛍光を対物レンズ/SIT カメラ/イメージインテンシファイアーで検出し、テレビモニターにイメージングすると同時にビデオ録画した。

2-5-2 蛍光強度の経時変化

スライドガラス上に直接固定化した GTF-TMR および T500-TMR の退色過程をモニターした。記録したビデオ画像中のスポットの蛍光強度を、computer image processor (Avio Excel, Nippon Avionics, Tokyo, Japan) を用いてビデオレート (1/30sec⁻¹) で経時変化を記録した (Funatsu, et al., 1995)。選択した蛍光スポットの近傍の蛍光強度を背景光として差し引いた。

2-5-3 解離速度定数の決定

記録したビデオ画像をコマ送り観察し、蛍光スポットの点滅しているコマ数を数え、蛍光色素 1 分子 (GTF-TMR および T500-TMR) がスライドガラス表面に滞在している時間 (dwell time) を測定した。Dwell time のヒストグラムを作成し、その 1 次プロットより解離速度定数を求めた (図 6c, Funatsu, et al., 1995)。

2-6 ストップフロー光散乱測定 (White and Taylor, 1976, Criddle, et al., 1985)

微量ストップフロー解析システム Sx.18MV (Applied Photophysics) を用いて光散乱測定を行った。光源には 150W キセノンランプを用いた。1 ショットは、 $50 \mu\text{l}$ で、デッドタイムは、 $850 \mu\text{s}$ である。データ解析には、Marquardt アルゴリズムを使用した。

Buffer A で装置の試料通路をよく洗浄した後に、 $1 \mu\text{M}$ GTF', 10mM Na-phosphate (pH 6.8), 100mM NaCl (1ml) と $2.5 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ のデキストラン T500 溶液 (1ml) をリザーバシリンジに注入した。GTF' とデキストランの混合直後に光散乱 (330nm) を検出した (図 15)。1 回のサンプル注入で、5~6 ヶの経時変化が得られ、それらの平均データを各試料のデータとした。一連のデキストラン濃度の実験を 3 回繰り返した。光散乱の経時変化を 1 次指数関数でフィッティングして、見かけの反応速度定数 (K_{obs}) を決め、それを GTF' の結合部位濃度 ($[S]$) に対してプロットした。

【第3章 原理と装置】

3-1 エバネッセント場

光を利用した顕微鏡の分解能には限界があり（アッペの限界）、油浸法を使っても波長の半分程度という固定観念があった。しかし、これは近接した2つの分子を見分ける際の分解能であり、1分子を見るだけであれば、単一分子から発する光をその波長程度の大きさを持つ光点としてとらえることは可能である。その光点の動きを追うことにすれば、数十 nm の分解能で分子運動を追跡することが可能である。

単一分子の可視化を光学顕微鏡で達成しようとする試みの一つがエバネッセント光学 (Synge, 1928) を利用した顕微鏡である。エバネッセント場というのは、波動である光が屈折率の異なる2つの媒質の界面で反射する際に界面から外側に漏れ出す場であり、指数関数的に減衰する。入射光の波長よりも小さい領域を局所励起できるという特徴がある。代表的な例は、高屈折率の媒質（ガラス）から低屈折率の媒質（水溶液）に臨界角以上で光を入射した場合に起こる全反射という現象である (Axelrod, 1989)。このとき、低屈折率の媒質の界面近傍にエバネッセント場（図 6a）が形成される (Funatsu, et al., 1995, Funatsu, et al., 1998, Harada, et al., 1997, Sase, et al., 1995)。

エバネッセント場の特徴

(1) エバネッセント場は、界面から離れる方向に指数関数的に減衰する局所場である。界面からの距離を z 、そこでの強度を $I(z)$ とすると、(1) 式で表わすことができる。

$$I(z) = I(0) e^{-z/d} \quad (5)$$

$$d = \lambda_0 / (4 \pi \sqrt{(n^2 \sin^2 \theta - m^2)})$$

λ_0 は真空中の波長、 m は溶液の屈折率、 n はガラスの屈折率、 θ は入射角である。

全反射角以上の入射角では、 $n \sin \theta > m$ である。侵入長 d は緑色の可視光線の場合、100~200nm である。

(2) エバネッセント場のエネルギーの流れを表すポインティングベクトルの方向は、入射面とガラス面の境界線の方向を向く。

(3) エバネッセント場の偏光方向を制御することが容易である。この性質を利用して、個々の分子の向きを検出することも可能である。

(4) 電場が指数関数的に減衰するので、波長よりも短い領域を照明することができる。

(5) エバネッセント場も伝播光のように、物体による散乱を受けたり蛍光色素を励起することが可能である。散乱光や蛍光のみを伝播光として検出できるので、背景光が極めて小さく、蛍光色素 1 分子の観察が可能である。

3-2 1 分子イメージングのための蛍光色素

1 分子蛍光観察を行う為にタンパク質の蛍光標識を行う必要がある。使用する蛍光色素には以下のような特徴が要求される。

- (1) 分子吸光係数が大きい
- (2) 蛍光量子収率が高い
- (3) 安定性が良い
- (4) 蛍光寿命が長い
- (5) 溶解度が高い
- (6) 励起/蛍光の波長が可視領域である
- (7) 分子サイズができるだけ小さい

これらの条件を満たし、現在主に用いられている試薬に、Cy3, Cy5, Tetramethyl rhodamine, Alexa, Texas red がある。本研究ではこれらの内、比較的安価で、システ

インを直接標識できるようにマレイミド化されている、Tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMRM) を用いた (図 9)。

3-3 全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) システム

1 分子の蛍光色素から放出される光子数は、理論上市販の高感度カメラで可視化するのに十分である (Harada, et al., 1988)。しかし、水分子からのラマン散乱、水溶液中の微粒子からのルミネッセンス、また散乱光などは背景光となり、1 分子可視化の妨げとなる。これら背景光は、i) 全反射顕微鏡を用いて照射範囲を最小にすること、ii) 精巧な光学プローブの使用、iii) 慎重に選んだ光学フィルターを用いることで激減する。一連の工夫によって背景光は従来の 2,000 分の 1 となった。プリズム型全反射蛍光顕微鏡システムの模式図を示す (図 14, Ref. Yokota, et al., 1998)。落射型蛍光顕微鏡 (TMD300, Nikon, Japan) を用いて装置は組まれている。TMR の励起には、frequency-doubled Nd:YAG laser (YAG laser, model 140-0532-100, Light Wave Electronics, wavelength = 532nm) を用いた。平行化したレーザー光は、hemicylindrical quartz prism を通して石英製のスライドグラスに入射する。スライドグラスとプリズムの隙間は、index matching oil で満たした。入射角度は、ミラーによって変えることができる。対物レンズ (NCF PlanApo $\times 100$; numerical aperture = 1.4; Nikon, Japan) を用いて集光した蛍光は、barrier filter (BF; 580DF30, Omega Optical, USA) を通し、背景光をカットした。その後、イメージインテンシファイアー (VS4-1845, Videoscope, USA) を備えた SIT カメラ (C2400-08, Hamamatsu Photonics, Japan) でイメージングした。

3-4 ストップフロー光散乱測定解析

$E+S \rightleftharpoons ES$ (正反応, k_{on} ; 逆反応, k_{off}) で表される 1 段階反応では、緩和時間 τ (k_{obs} の逆数) は E と S の平衡濃度の和 (C_E+C_S) を用いて (6) 式で表される。

$$1/\tau = k_{on}(C_E+C_S) + k_{off} \quad (6)$$

大過剰のリガンド存在下では、見かけの一次反応速度定数 k_{obs} は単純に $[S]$ の関数として表すことができる。光散乱の経時変化から求めた見かけの反応速度定数 (k_{obs}) を GTF' の結合部位濃度 ($[S]$) に対してプロットすると両者は直線関係を示す (式 7) 。直線回帰式の傾きから酵素/基質相互作用の結合速度定数 (k_{on})、Y 切片から解離速度定数 (k_{off}) を求めることができる。また、両者の比 (k_{on}/k_{off} , 式 8) から、結合定数 (K_b) が与えられる。

$$k_{obs} = k_{on} [S] + k_{off} \quad (7)$$

$$K_b = k_{on} / k_{off} \quad (8)$$

【第4章 結果】

4-1 GTF/デキストラン相互作用の速度定数の決定 (多分子系解析)

GTF がデキストランに結合すると、i) GTF 分子同士が接近するクラスター効果と ii) GTF 分子の熱運動が抑制されるために光散乱の上昇が見られる (図 16)。GTF' とデキストラン T500 の相互作用をストップフロー光散乱測定で測定し、結合速度定数と解離速度定数を決定した。図 17 に GTF' およびデキストラン溶液を混合した直後の光散乱の経時変化を示す。高い濃度の T500 では、より早い光散乱の立ち上がり、より大きな変化量を示した。一連のデキストラン濃度で得られた光散乱の経時変化を 1 次指数関数でカーブフィットし、見かけの 1 次反応速度定数 (k_{obs}) を決定した。 k_{obs} を GTF' の結合部位濃度に対してプロットした (図 18)。結合部位の濃度は、GTF の結合ユニットを 15 グルコース残基 (デキストランの種類と濃度を変えて行った光散乱測定結果 (Kaseda, et al., unpublished) および滴定カロリメトリーの解析結果 (Hirata, 1998)) として求めた。式 (7) により、グラフの傾きから結合速度定数 $k_{on}=6.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、Y 切片から解離速度定数 $k_{off}=3.8\text{s}^{-1}$ を得た。また、 k_{on}/k_{off} より、結合定数 $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ が得られ、この値は光散乱実験 ($1.6\text{--}1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, Kaseda, et al., unpublished) やカロリメトリー ($1.5\text{--}1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, Hirata, 1998) から求められた結合定数と良い一致を示した。ショ糖存在下では、不溶性グルカンが合成されるため、定量的な解析が困難であるばかりでなく、測定セルの破損を招くので測定は行わなかった。

4-2 GTF-Cys と GTF-TMR 作成

GTF' にシステイン残基を導入すれば、マレイミド化された蛍光色素で特異的に化学修飾することができる。GTF' をコードするプラスミド pAB2 の XbaI サイトを消化し、生じた 5' 突出末端を S1 スクレアーゼで削り落とし、平滑末端を T4 リガーゼで繋ぎ合わせた。本処理で GTF' の C 末端にフレームシフトが起こり、GTF' とは無関係のアミノ酸残基 (17 残基) が加わるが、その中にシステイン残基が出現する。pAB2 にシステイン

をコードする遺伝子コドンが入っていることを DNA シーケンスによって確認した。GTF' C 末端の DNA 塩基配列とそれから推測されるアミノ酸配列を図 7 に示す。以後、システイン残基を導入した GTF' を GTF-Cys と呼ぶ。

GTF' および GTF-Cys を精製し、還元/非還元条件で SDS-PAGE を行った (図 19)。GTF-Cys の非還元条件のみに高分子量のバンドが認められた。このバンドは GTF-Cys 同士がジスルフィド結合によって生じた GTF ダイマーによるものと思われる。

GTF のデキストラン結合領域は、タンパク質加水分解酵素による消化を受けやすい (Mukasa, 1986)。精製した GTF-Cys の C 末端が消化されると、導入したシステイン残基の欠落を生じる。そこで、精製した GTF-Cys 中に存在するシステインの含有量を定量した (表 1)。96% まで精製した GTF-Cys のシステイン量をチオール検出試薬 DTNB で定量した (Ellman, 1959, Riddles, et al., 1983)。未変性条件下での 84% に対し、変性条件下 (グアニジン塩酸塩存在下) では 90% だった。これより、GTF-Cys のシステイン含有量は 94%、その反応性は 93% であり、GTF-Cys は蛍光色素標識に適していることを確認した。

GTF-Cys を TMR-maleimide で化学標識して得た GTF-TMR の吸収スペクトルを図 20 に示す。GTF-TMR には、GTF-Cys には見られない可視領域に TMR 由来のピークが認められた。可視領域のピークは、はっきりと 2 つに割れており、確かに TMR が GTF-Cys を標識していることを指示している。Bradford 試薬によるタンパク質定量と分子吸光係数を用いた TMR 定量により、TMR ラベル率は 70% であることが分かった。

4-3 化学修飾 GTF' およびデキストランの機能

化学修飾を施した GTF の酵素活性およびデキストランのアクセプター能を解糖系酵素を用いた共役反応で調べた (表 2、Konishi, et al., 1999, Hanamoto, 1996)。GTF-Cys は、デキストラン T500 による活性化を含めて GTF' と全く同様の酵素活性を有していた ($\sim 2.0 \text{ s}^{-1}$ (-デキストラン) および $\sim 24 \text{ s}^{-1}$ (+デキストラン))。GTF-Cys を

修飾した GTF-TMR, GTF-BIO のそれ自体の酵素活性 (1.0 s^{-1} および 1.7 s^{-1}) は、GTF', GTF-Cys のそれに比べて若干の低下が見られたが、依然として、デキストラン T500 による活性化が認められ (11.8 s^{-1} および 20.1 s^{-1})、基本的な酵素機能を保持していると言える。化学修飾デキストランも程度は落ちるが GTF のグルコシル転移を活性化し (T500-TMR による GTF-Cys (12.5 s^{-1}) と GTF-BIO (8.6 s^{-1}) の活性化および T500-BIO による GTF-Cys (16.0 s^{-1}) と GTF-TMR (5.8 s^{-1}) の活性化)、GTF 酵素反応のアクセプターとなることが判明した。同様の結果は、ショ糖分解活性や光散乱測定による WIG 合成活性でも得られた (Data not shown)。また、修飾した材料が元の材料と同様の酵素反応を遂行することは、以下のイメージングにおいて WIG 合成が認められたことから確認された。

4-4 多分子イメージング

GTF がデキストラン (Sephadex G-100) に特異的に強く結合することを GTF-TMR を用いて直接観察した (図 21)。GTF-TMR と Sephadex ビーズを混合後、蛍光顕微鏡観察を行った。明視野像におけるビーズと同じ位置に蛍光像では TMR による蛍光が観察された。観察された蛍光の強さは添加した GTF-TMR の濃度に依存していた (Data not shown)。GTF-TMR 処理後にビーズを可溶性のデキストラン (T10) で洗浄すると、ビーズは蛍光性を示さなかった。これらの結果は、GTF はデキストランに特異的に相互作用することを意味する。また、GTF のデキストラン相互作用のイメージングに多分子レベルで成功したと言える。

蛍光標識した GTF やデキストランを用いて合成した不溶性グルカンの蛍光顕微鏡観察を行った (図 22)。GTF-TMR と非標識デキストランを用いて合成した不溶性グルカン溶液は、溶液全体が赤色で顕微鏡観察において WIG は蛍光性を示さなかった。GTF-TMR が WIG にデキストランと同程度の親和性 ($\sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) で結合するのであれば、図 22 の左下の WIG と同程度の蛍光性を示す。図 22 下段は非標識 GTF と蛍光

標識デキストラン (T10-TMR) を用いて合成した不溶性グルカンを観察した結果を示している。図 22 上段において GTF が WIG とデキストランに同等の親和性を持つ場合に WIG 中にある TMR 量が同程度になるように蛍光標識した T10-TMR (50%標識) を用いた。この溶液は赤い WIG が沈殿し、顕微鏡観察では明視野像および蛍光像は同じパターンを示した。従って、GTF はデキストランには強く結合するが、 α -1,3 側鎖で完全に修飾されたデキストラン (WIG) には、結合しないことを示している。WIG に GTF が結合しないことは、GTF と WIG の共沈実験でも示された (Data not shown)。

4-5 1分子イメージング

TIRFM を用いて GTF およびデキストランの 1 分子観察を行った。まず、蛍光色素 TMR の退色過程を調べた。GTF-TMR および T500-TMR をスライドガラスに直接吸着させ 1 分子観察を行い、蛍光スポット強度の経時変化を調べた。図 23 (a, b) に示すように GTF-TMR 由来の蛍光スポットが観察された。矢印で示すスポットの退色過程を解析した (図 23c, d) 結果、GTF-TMR の退色は 1 ステップで起こり、観察している蛍光スポットが確かに 1 分子の GTF-TMR であることを確認した (Funatsu, et al., 1995, Iwane, et al., 1997, Tokunaga, et al., 1997)。一方、T500-TMR の退色過程は 3 ステップで起こり、T500 が数個 (平均 4 個) の TMR で標識されていることと矛盾しない。従って、T500-TMR の 1 分子観察にも成功したと言える。次に、蛍光色素の退色の速度を解析した。GTF-TMR と T500-TMR 由来の蛍光スポットが点灯している時間を測定し、退色時間のヒストグラムを作成した (図 24)。ヒストグラムの 1 次反応プロットより、退色の時定数 37.5 sec (GTF-TMR)、および 4.6 min (T500-TMR) を得た。下記に示すように、GTF/デキストランの 1 分子相互作用の時間 (数百ミリ秒) はこれらの時間より十分短いので、TMR の退色の影響は無視できる。

GTF/デキストランの相互作用を 1 分子レベルで観察した。GTF-BIO 固定化チャンパーを用いて T500-TMR の 1 分子観察を行い GTF/デキストラン相互作用を解析した

(図 13a)。シヨ糖非存在下 (図 25a) では、多くの蛍光スポットが数分間に渡り連続的に (long dwell time) 観察された。それとは別に、数百ミリ秒間点滅し、すぐに視野から消える (short dwell time) 少数のスポットも観察された。ある瞬間に観察された蛍光スポットの内、~90%が long dwell time のスポットであった。Long dwell time スポットは、多くの GTF 分子と相互作用しているデキストランに起因すると思われる (図 26a)。実際、デキストラン上の GTF 結合単位は、~15 グルコシル残基である (Kaseda, et al., unpublished) ので、デキストラン T500 1 分子には、約 200 分子の GTF 分子が相互作用し得る。一方、short dwell time を持つスポットは、ガラス表面のより少ない GTF と相互作用し、すぐに解離する T500-TMR を反映していると思われる (図 26b)。従って、基本的に GTF とデキストラン (の 1 つの結合部位) は結合・解離を繰り返していると思われる。シヨ糖存在下で同様の実験を行い、不溶性グルカン合成の初期過程をイメージングした (図 25b)。シヨ糖非存在下とは劇的に異なり、観察視野に認められた蛍光スポット数は激減した (表 3)。Long dwell time のスポット数は減少し、代わりに short dwell time のスポットの割合は増加していた。1 画面に認められた蛍光スポットの数から明らかなように、WIG 合成初期段階においてもシヨ糖存在下では GTF とデキストランの親和性が弱まることが判明した。

シヨ糖存在下における GTF/デキストラン親和性低下の分子機構を調べるために、short dwell time の蛍光スポットの解析を行った。しかし、シヨ糖非存在下では short dwell time のスポット数が少なく解析が困難であった。この問題は、非修飾のデキストランを用いることで解決できた (図 27)。過剰の非修飾デキストラン存在下では、それらが蛍光標識したデキストランとガラス表面の GTF 分子を競い合うため long dwell time の蛍光スポット数は激減し、観察視野に認められるスポットは減少した (図 28a、表 3)。その代わりに次々に short dwell time のスポットが観察視野に現れた。同じ条件のシヨ糖存在下では、観察視野に大きな変化は認められなかった (図 28b) が、注意深く観察すると、観察視野内に認められるスポット数がやや減少していた。また、short dwell time の T500-TMR が点灯している時間がやや短いように見えた。そ

ここで非修飾デキストラン存在下で、T500-TMR がガラス表面に滞在する時間（つまり、GTF と相互作用している時間）をビデオのコマ送りで測定し、ヒストグラムを作成した（図 29）。ショ糖存在下では非存在下よりも分布が短時間側にシフトした。ヒストグラムの 1 次反応プロットより、デキストランの解離速度定数を求めた。ショ糖非存在下の $3.0 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$ に対して、ショ糖存在下では $5.3 \pm 1.0 \text{ s}^{-1}$ と速度定数の増加が認められた。ショ糖非存在下の解離速度定数は、ストップフロー光散乱測定で求めた速度定数（図 18）と良い一致を示した。このように 1 分子系では、個々の分子は個々の振る舞いをするが、統計的に解析すると多分子系の平均の振る舞いと同じに見える（エルゴード性が成立する）。同様の解析を非修飾デキストランなしで行った結果（上述のように、ショ糖非存在下では非常に困難であった）、非修飾デキストラン有りの場合と有意差のない解離速度定数（ショ糖なしで $3.7 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ 、ショ糖有りでは $6.4 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ ）が得られた（図 30、表 3）。従って、ショ糖存在下における GTF/デキストラン親和性低下の一部は、解離速度定数の増加に起因することが判明した。さらに、単位面積、単位時間当たりにガラス表面に現れる T500-TMR 数を測定した（表 3）。これは結合速度定数を反映するパラメータであり、ここでは結合速度 (mm^2s^{-1}) と呼ぶ。非修飾デキストラン存在下で解析した結合速度は、ショ糖非存在下で $814 \pm 68 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ であったのに対し、ショ糖存在下では $578 \pm 50 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ と有意に減少した。従って、ショ糖は解離速度定数の増加だけでなく、結合速度定数の低下も誘起することが明らかになった。

T500-TMR 観察において、ショ糖添加 30-60 分後に顕微鏡の焦点をカバーガラス表面に合わせると、沈殿した蛍光性の凝集体が観察された (Data not shown)。これは、1 分子観察においても実際に WIG が合成されたことを意味している。

最後に、T500-BIO をスライドガラス表面にコートし GTF-TMR の 1 分子観察を行った（図 13b、図 31、表 4）。デキストランの観察とは異なり、ショ糖非存在下においてもほとんどの GTF は視野内に出たり入ったりしており、蛍光スポットが点灯している時間はデキストラン観察の場合よりもやや短く感じられた。Dwell time のヒストグラム（図 32）から、ショ糖非存在下での GTF の解離速度定数は $6.7 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ であり、ショ

糖存在下では $8.7 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$ と増加することが分かった。結合速度の解析も行い、シヨ糖非存在下の $1774 \pm 108 \text{ mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ に対して、シヨ糖存在下では、 $1262 \pm 138 \text{ mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ と減少した。大過剰の非修飾 GTF 存在下でも同様の解析を行った。その結果、シヨ糖存在下で解離速度定数の増加（シヨ糖なしの $9.2 \pm 1.7 \text{ s}^{-1}$ に対してシヨ糖有りでは $13.3 \pm 1.5 \text{ s}^{-1}$ ）と結合速度の減少（シヨ糖なしの $2053 \pm 272 \text{ mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ に対してシヨ糖有りでは $749 \pm 36 \text{ mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）が認められてた（図 33、表 4）。

以上のデータから、不溶性グルカン合成の初期段階においても、シヨ糖存在下において GTF/デキストランの親和性が低下し、それは解離速度定数の増加と結合速度定数の減少の両方に起因することが判明した。

【第5章 考察】

本研究はタンパク質と糖鎖の相互作用を1分子レベルで解析した最初の報告である。GTFとデキストランの相互作用にはいくつかの興味深い問題が含まれ、その問題への挑戦は糖鎖研究の発展につながる。特に、繰り返し構造を持つ多糖は、タンパク質結合単位が繰り返し存在し、そこでのタンパク質の振る舞いを明確にすることはタンパク質の機能解明に重要である。糖鎖が修飾を受けない条件でタンパク質と糖鎖の相互作用を定量的に解析することは様々な物理化学的手法で可能である。しかし、糖鎖が修飾され、その影響（粘度などの物理的要因や濁度などの光学的要因による）が大きい場合、定量的な解析は非常に困難である（図34）。場合によっては、装置の破損を招く可能性もあり、そういった系での解析はほとんど行われていない。相互作用が起きている現場を直視する1分子イメージング法はそれらの解析に有効であり、その基盤を築いた本研究は、タンパク質/糖鎖相互作用研究の先駆けである。

GTFがデキストランに特異的に結合することは以前から知られている（Fukui, et al., 1982, Abo, et al., 1991, Mooser and Wang, 1988, Wang, et al., 1990, Kato and Kuramitsu, 1990, Kato, et al., 1992）が、その相互作用の解析は定量的に行われていなかった。本研究室では、GTFとデキストラン（未修飾）の相互作用を様々な手法で解析し結合定数を導いた（Mori, 1997, Hirata, 1998, Kaseda, et al., unpublished）。しかしながら、シヨ糖存在下では前述の理由から解析が不可能であった。本研究ではこの問題に1分子イメージング法を用いて挑戦し、不溶性グルカン合成過程におけるGTF/デキストラン相互作用の解析に成功した。

GTFが α -1,3鎖で完全に修飾されたデキストランに結合しないことは以前から知られており（正式な報告はない）、本研究でも多分子イメージング（図22）や共沈実験（data not shown）で確認した。今回、1分子観察によって初めて、不溶性グルカン合成反応を始めたばかりの条件下においても、GTFのデキストランに対する親和性が低下することが示された（表3, 4）。1分子解析の信頼性は、以下の事実から明らかであ

る。1分子のデキストランの解離速度定数をガラス表面に GTF 分子を敷かず解析した結果（非特異相互作用の解析）、 $13.8 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$ という大きな値を得た。GTF 分子を敷いた系では有意に小さな速度定数（表 3）を示し、非特異相互作用の影響は無視できると思われる。さらに、1分子観察で決定したショ糖非存在下での解離速度定数は、ストップフロー光散乱測定で決定したそれとオーダー内で一致していた。

測定した全ての条件において、ショ糖存在下では解離速度定数の増加が認められた（表 3, 4）。T500-TMR 観察よりも GTF-TMR 観察で得られた解離速度の方が大きな値を示したのは、前述のように T500-TMR は、ガラス表面の複数の GTF 分子と相互作用している可能性が考えられる。また、GTF 観察において大過剰の非修飾 GTF 存在下ではその非存在下よりも、ショ糖の存在に関わらず大きな解離速度定数を得た。これは、非修飾 GTF 非存在下においては、その存在下よりもデキストラン上の多くの GTF 結合部位と相互作用しているためであると思われる（図 35; 1分子は、直径約 $1 \mu\text{m}$ の蛍光スポットとして観察されるので、GTF 分子の近接したサイトへの移行は検出できない）。従って、非修飾 GTF 存在下で行った GTF-TMR 観察が、最も良く 1分子の GTF とデキストラン上の 1つの結合部位の相互作用を反映していると思われる。GTF-TMR のグルコシル基転移活性の速度定数 (23 s^{-1} , Kobayashi, 1998) を考慮すると、GTF は 1度デキストランに結合している間に約 2分子 ($23/13.3$) のグルコース残基を転移している計算になる。福井等はデキストラン上に転移・伸長された α -1,3-グルカン鎖の分子量をゲルろ過法で決定し、平均で 220 残基のグルコースからなることを報告している。本研究の条件でも同様であるかどうかは検討の余地があるが、もしそうであるなら、GTF はデキストラン上の同じ分岐サイトに何度も結合し、分岐鎖の伸長をしていると考えられる。

スライドガラス表面に GTF-BIO の代わりに 4R-BIO をコートして、T500-TMR 観察を行った結果、ショ糖存在下、非存在下の両方で多くの蛍光スポット (long dwell time) が認められた (Data not shown)。つまり、ショ糖による親和性の低下は、GTF のショ糖分解/糖転移ドメインを介して起こる。ショ糖存在下において、親和性が低下

する要因として、修飾されたデキストラン自身が GTF との相互作用に不都合である可能性が考えられる。上述のように GTF はデキストランに結合している間に、数個のグルコシル基を転移していると思われ、その側鎖が GTF/デキストラン相互作用を弱めているのかもしれない。別の可能性として、GTF 酵素反応サイクル中のある状態がデキストランと低い親和性を持つことも否定できない。前者を支持するデータとして、大過剰の非修飾 GTF 存在下で行った GTF-TMR の 1 分子解析の結果があげられる。この条件では、ガラス表面のデキストランが過度（少なくとも非修飾デキストランなしの場合よりも多く）に修飾されているはずである。ショ糖による結合速度への影響の程度 (749/2053) は、非修飾 GTF の非存在下の場合 (1262/1774) よりも大きい。従って、 α -1,3-グルカン鎖が直接 GTF の接近を妨げている可能性が高い。しかしながら、ショ糖添加直後からおよそ 1 時間に渡り、解離速度定数や結合速度に時間依存性が認められなかった (Data not shown) ことから後者の可能性も無視できない。これについては、更に長い時間領域で解析することやショ糖のアナログを用いた検討が必要である。また GTF の WIG 合成過程は 3 段階（遅滞期、加速期、減速期）で起こるので、これらの状態を 1 分子系で検出する方法を確立すれば、更に詳細な分子機構解析が可能になる。

現在、生体高分子 1 分子を観察するだけでなく、直接操作する技術が多方面で用いられている。分子 1 個を操作する方法には、探針（微小ガラスや原子間力顕微鏡のカンチレバー）で分子を捕まえる方法とレーザートラップ (Ashkin, et al., 1986) を使って、分子が結合したビーズを操作する方法がある。探針を使った例では、ミオシン分子が発する力の測定 (Kitamura, et al., 1999, Kitamura, et al., 1998) や糖鎖の構造解析 (Marszalek, et al., 1998, Rief, et al., 1997) やタンパク質のフォールディングの解析 (Wang and Ikai, 1999) 等がある。レーザートラップでは、キネシンやダイニン, RNA ポリメラーゼの力学測定 (Shingyouji, et al., 1998, Wang, et al., 1998, Kojima, et al., 1997) やスペクトリンの 4 量体形成の相互作用解析 (Tomisige, et al., 1999)、またアクチンフィラメント (Tsuda, et al., 1996, Arai, et al., 1999) や DNA (Haneda, et al., 1999, Arai, et al., 1999) の軸方向ねじれ弾性解析等が報告されている。さらに、ミオシ

ン/アクチン系ではATP加水分解反応と力学測定の同時計測も行われ (Ishijima, et al., 1998)、タンパク質分子内にエネルギーを貯めるという新しい分子機構(メモリー現象)の存在が発見された。本研究でGTF1分子酵素学の基盤を構築したので、今後様々な技術を駆使すればさらに詳細なGTFの分子機構が明確になると思われる。特に、GTFは単に結合・解離を繰り返しているか、それともショ糖のエネルギーの一部を使ってデキストラン鎖上を滑っているのかを明確にすることは分子モーター研究の立場から興味深い(図36, 37)。また、デキストランとはどれほどの力で相互作用しており、ショ糖はその力にいかに関与しているのかや、GTFが結合したデキストランの柔軟度は変化しているのかなどの問題点も1分子計測でないと解決しない。蛍光標識したショ糖を合成しショ糖分解反応とデキストランとの相互作用の同時観察を行うことや、1分子蛍光共鳴エネルギー移動解析により、昨今1分子解析で見いだされた新たな知見(メモリー現象や秒オーダーの揺らぎ)がGTFにも当てはまる現象であるかどうかを知ることができる。多くの問題点と発展性を秘めているGTF/デキストランの1分子酵素学システムを構築し、それは糖鎖研究や1分子研究の発展につながるという意味で本研究は意義深い。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、以下の方々にはご指導、ご助言、ご協力を頂きました。ここに記して暑くお礼申し上げます。

児玉孝雄教授には、日々貴重なご助言、激励を頂きました。また、他の大学や研究所における協同研究と多くの先生方と接する機会を与えて頂きました。小松英幸助手は、本研究を行う基礎的な技術をご教授下さいました。新原真美技官には、論文作成を円滑に行うご協力を頂きました。

本研究の大部分は、岡山大学 歯学部 口腔細菌学講座で行いました。福井一博教授には日々、貴重なご意見を頂くと共に研究が捗る環境を提供して下さいました。谷本一郎助手には、遺伝子操作のご指導を頂きました。口腔細菌学講座の皆様には、多くのご助言を頂きました。

1分子イメージングは、科学技術振興事業団 国際共同研究 1分子過程プロジェクトで行いました。横田浩章研究員には、実験のサポートを頂くと共に細部に渡るご協力を頂きました。石井由晴プロジェクトリーダー、および大阪大学 医学系研究科の柳田敏雄教授には、方針の指導やデータの解釈に対するご意見を頂きました。井上裕一研究員には、貴重なご意見とご指導を頂きました。

ストップフロー光散乱測定は、郵政省 通信総合研究所 関西先端研究センターの大岩和弘先生のご指導、ご協力のもとで行いました。小島寛明研究員には、貴重なご意見とご指導を賜りました。

慶応義塾大学 理工学部 物理学科の原田慶恵講師には、蛍光色素の取り扱い等についての貴重なご意見を頂きました。

通産省 工業技術院 産業技術 融合領域研究所の広瀬恵子主任研究官、上田太郎主任研究官を初めとするバイオモレキュラーグループ（分子モーター）の皆様には、論文作成においてご意見、ご配慮、激励を頂きました。

本論文には記載していませんが、電子顕微鏡による GTF の最初の観察を九州大学 医学部 臨床薬理学教室の大槻馨男教授のご指導のもとで行いました。また、岡山大学 歯学部 口腔病理学講座の赤木巧（元）教務員にもご指導頂きました。

本論文を作成するに当たり、当教室の宮本茂昭教授、米谷快男児教授、小谷享助教授、制御システム工学科の八木哲也助教授にはご指導、ご助言を頂きました。

最後に、日々激励と多岐に渡るご支援を下された両親に心より感謝します。

【参考文献】

Abo, H., Matsumura, T., Kodama, T., Ohta, H., Fukui, K., Kato, K., and Kagawa, H. (1991) *J. Bacteriol.* **173**:989-996.

足立健吾、安田涼平、野地博行、吉田賢右、木下一彦. (1999) 第37回生物物理学会、2PD039

Alaluusua, S. et al. (1996) *Arch. oral Biol.* **41**:167-173

Arai, Y., Yasuda, R., Akashi, K., Harada, Y., Miyata, H., Kinoshita, K. Jr., Itoh, H. (1999) *Nature* **399**:446-448

Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., Chu, S. 1986. *Opt. Lett.* **11**:288-290

Axelrod, D. (1989) *Methods Cell Biol.* **30**:245-270

馬場貞晴. 平成10年度卒業論文

馬場貞晴. 平成8年度卒業論文

Banas, J. A., Russell, R. R. B., and Ferretti, J. J. (1990) *Infect. Immun.* **58**:667-673

Barrett, J. F., Barrett, T. A., and Curtiss, R. III (1987) *Infect. Immun.* **55**:792-802

Bastianini, A., and Fruschelli, C. (1966) *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **42**:1604-1606

Bender, G. R., et al. (1986) *Infect. Immun.* **53**:331-338

Bennick, A., and Dawes, C. (1985) 236-260. in G. Nikiforuk (ed.), Etiology and mechanisms basic and clinacal aspects. Karger, Basel.

Bowden, G. H., and Hamilton, I. R. (1987) Can. J. Microbiol. 33:824-827

Bradford, M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-

Burne, R. A., Wen, Z. T., Chen, Y. Y., Penders, J. E. (1999) J. Bacteriol. 181:2863-71

Busscher, H. J., and Weerkamp, A. H. (1987) FEMS Microbiol. Rev. 46:165-173

Carlen, A., and Olsson, J. (1995) J. Dent. Res. 74:1040-1047

Case, R. B., Pierce, D.W., Hom-Booher, N., Hart, C.L., and Vale, R.D. (1997) Cell. 90:959-966.

Chu S. (1999) The 7th JST International Symposium

Clarke, J. K. (1924) J. Exp. Pathol. 5:141-147

Colson, P., Jennings, H. J., and Smith I. C. P. (1974) J. Am. Chem. Soc. 96:8081-9097

Criddle, Geeves, and Jeffries. (1985) Biochem. J. 232:343-349

Current protcols in molecular biology, John Wiley and Sons, Inc.

de Soet, J. J. et al. (1991) Caries. Res. 25:116-122

Demuth, D. R., Lammey, M. S., Huck, M, Lally, E. T., and Malamud,

D. (1990) *Microb. Pathog.* **9**:199-211

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* **28**:350-356.

Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**:70-77.

Ferretti, J. J., Gilpin, M. L., and Russell, R. R. B. (1987) *J. Bacteriol.* **169**:4271-4278

Fujimoto, Z., Takase, K., Doui, N., Momma, M., Matsumoto, T., and Mizuno, H. (1998) *J. Mo. Biol.* **277**:393-407

Fukui, K., Kokeyuchi, S., Kato, K., Miyake, Y., Nogami, R., and Moriyama, T. (1983) *Infect. Immun.* **39**:762-766

Fukui, K., Moriyama, T., Miyake, Y., Mizutani, K., and Tanaka, O. (1982) *Infect. Immun.* **37**:1-9.

Fukushima, K., et al. (1982) *FEBS. Lett.* **149**:299-303

Funane, K., Shiraiwa, M., Hashimoto, K., Ichishima, E., and Kobayashi, M. (1993) *Biochemistry* **32**:13696-13702

Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., and Yanagida, T. (1995) *Nature.* **374**:555-559.

Funatsu, T., Harada, Y., Higuchi, H., Tokunaga, M., Saito, K., Ishii, Y., Vale, R. D., and Yanagida, T. (1997) **68**:63-72

Gibbons, R. J., et al. (1986) *Infect. Immun.* **52**:505-516

Gibbons, R. J., and Hay, D. I. (1989) J. Dent. Res. 68:1303-1307

Giffard, P. M., Allen, D. M., Milward C. P., and Simpson, C. P., and Jacques, N. A. (1993) J. Gen. Microbiol. 139:1511-1522

Giffard, P. M., and Jacques, N. A. (1994) J. Dent. Res. 73:1133-1141

Gilmore, K. S., Russell, R. R. B., and Feretti, J. J. (1990) Infect. Immun. 58:2452-2458

Gilmore, K. S., Russell, R. R. B., and Feretti, J. J. (1993) Infect. Immun. 61:1246-1250

Gilpin, M. R., Russell, R. R. B., and Morrissey, P. (1985) Infect. Immun. 49:414-416

Glick, M. C., Chen, I. W., and Zilliken, F. 1962. J. Biol. Chem. 237:981-987.

Guggenheim, B., and Haller, R. (1972) J. Dent. Res. 51:394-402

Ha, T., Ting, A. Y., Liang, J., Galdwell, W. B., Deniz, A. A., Chemla, D. S., Schultz, P. G., and Weiss, S. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:893-898

浜田茂幸. (1984) 医学細菌学 4:271-314

Hamada, N., Isobe, I., Aizawa, Y., Katayama, T., Sato, S., and Inoue, M. (1993) Infect. Immun. 61:2096-2103

Hamada, S., and Slade. D. H. (1980) Microbiological reviews 44:331-384

Hanada, N., Yamashita, Y., Shibata, Y., Sato, S., Katayama, T.,

Takehara, T., and Inoue, M. (1991) Infect. Immun. 59:3434-3438

花本賢. 平成7年度卒業論文

原田慶恵 (1995) 生物物理 35 卷: 51-52

Harada, Y., Funatshu, T., Murakami, K., Nonoyama Y., Ishihama A., and Yanagida T. (1999) Biophys. J. 76:709-715.

Harada, Y., Funatsu, T., Tokunaga, M., Saito, K., Higuchi, H., Ishii, Y., and Yanagida, T. (1998) Meth. Cell Biol. 55:117-128.

Harada, Y, Sakurada, K, Aoki, T, Thomas, D.D., Yanagida T. (1990) J. Mol. Biol. 216:49-68.

Harada, Y., Yanagida, T. (1988) Cell Motil. Cytoskel. 10:71-76

Hajishengallis, G., Nikolova, E., and Russell, M. W. (1992) Infect. Immun. 60:5057-5064

Harper, D. S., and Loesche, W. J. (1984) Arch, Oral Biol. 29:843-848

羽田裕子、原田慶恵、木下一彦. (1999) 第37回生物物理学会、3PD044

畑中研一、西村紳一郎、大内辰郎、小林一清. (1997) 糖質の科学と工学、講談社

Heitzmann, H. and Richards, F. M. (1974) Proc. Natl . Acad. Sci. USA 71:3537-3541.

平田雪絵. 平成10年度卒業論文

Hirose, H., et al. (1993) Caries. Res. 27:292-297

Ishii, Y. (1999) The 7th JST International Symposium

Ishijima, A., Kojima, H., Funatsu, T., Tokunaga, M., Higuchi, H., Tanaka, H., and Yanagida, T. (1998). *Cell* **92**:161-171.

Itakura, S., Yamakawa, H., Toyoshima, Y. Y., Ishijima, A., Kojima, T., Harada, Y., Yanagida, T., Wakabayashi, T., and Sutoh, K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**:1504-1510.

Iwami, Y., Abbe, K., Takehashi-Abbe, S., and Yamada, T. (1992) *Oral Microbiol. Immunol.* **7**:304-308

岩瀬仁勇、大西正健、木曾真、平林義雄、山本憲二。(1994) 糖鎖の科学入門、培風館

James, A., Haynes, W. C., Wilham, C. A., Rankin, J. C., Melvin, E. H., Austin, M. J., Cluskey, J. E., Fisher, B. E., Tsuchiya, H. M., and Rist, C. E. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.* **76**:5041-5052.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. (1990) *Nature* **347**:37-44

Kabata, H., Kurosawa, O., Arai, I., Washizu, M., Margaron, S. A., Glass, R. E., Shimamoto, N. (1993) *Science* **262**:1561-1563

Kaseda, K., Mori, M., Komatsu, H., Fukui, K., and Kodama, T. Unpublished data.

Katayama, E. (1998) *J. Mol. Biol.* **278**:349-367

Katayama, E., Ohmori, G., and Baba, N. (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.* **453**:37-46

Kato, C., and Kuramitsu, H. K. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 72:299-302

Kato, C., Nakano, Y., Lis, M., and Kuramitsu, H. K. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 189:1184-1188

河合知二、第37回生物物理学会年会 シンポジウム

菊本真人、榊原斉、坂井由佳子、大岩和弘. (1999) 第37回生物物理学会、2PD023

Kinoshita, K. Jr. (1998) Adv. Exp. Med. Biol. 453:5-13

Kishimoto, E. D., Hay, I., and Gibbons, J. (1989) Infect. Immun. 57:3702-3707

北森武彦 (1998) ぶんせき、847-853

Kitamura, K., Tokunaga, M., Iwane-Hikikoshi, A., Yanagida, T. (1999) Nature 397:129-134.

Kitamura, K., Tokunaga, M., Iwane-Hikikoshi, A., Yanagida, T. 1998. Biophys. J. 74:A265

小林万里子. 平成10年度卒業論文

Koga, T., et al. (1990) Infect. Immun. 58:289-296

Koga, T., and Inoue, M. (1978) Infect. Immun. 19:402-410

Kohler, B., and Bjarnason, S. (1987) Oral Epidemiol. 15:332-335

Konishi, N., Torii, Y., Yamamoto, T., Miyagi, A., Ohta, H., Fukui,

K., Hanamoto, S., Matsuno, H., Komatasu, H., Kodama, T., and Katayama, E. (1999) J. Biochem.(Tokyo) 126:287-295.

Kojima, H., Muto, E., Higuchi, H., and Yanagida, T. (1997) Biophys. J. 73:2012-2022

Kuramitsu, H. K. (1993) Crit. Rev. Oral Biol. Med. 4:159-176.

Linder, M., Nevanen, T., and Teeri, T. T. FEBS Lett. (1999) 19:13-6

Loesche, W. J. (1986) Microbiol. Rev. 50:353-380

MacGregor, E. A., Jespersen, H. M., and Svensson, B. (1996) FEBS Lett. 378:263-266

Marszalek, P. E., Oberhauser, A. F., Pang, Y. P., and Fernandez, J. M. (1998) Nature 396:661-664

増田典男. (1982) う蝕と歯周病-研究の進歩、浜田茂幸（編）、1:1-33.日本歯科評論社.東京.

松野秀輝. 平成9年度卒業論文

Mawatari, K., Kitamori, T., and Sawada, T. (1998) Anal. Chem. 70:5037-5041

McDeermid, A. S., McKee, A. S., Ellwood, D. C., and Marsh, P. D. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:1205-1214

箕口滋、佐甲靖志、柳田敏雄. (1999) 第37回生物物理学会、1PA068

Molecular cloning; a laboratory manual / second edition

Molecular Probes. 1998. Molecular Probes manual. Molecular Probes, Inc. Gerald Thomas.

Monchois, V., Lakey, J. H., and Russell R. R. (1999) FEMS. Microbiol. Lett. **15**:243-248

Mooser, G. 1992. Glycosidases and glycosyltransferases. Enzymes **20**:187-231.

Mooser, G., Hefta, S. A., Paxton, R. J., Shively, J. E., and Lee, T. D. (1991) J. Biol. Chem. **266**:8916-8922

Mooser, G., and Iwaoka, K. R. (1989) Biochemistry **28**:443-449

Mooser, G., and Wang, C. (1988) Infect. Immun. **56**:880-884

森美幸. 平成9年度卒業論文

Morikawa, K., and Yanagida, M. (1981) J. Biochem. **89**, 693-696

Musaka, H., et al. (1986) 121-132, in Hamada, S., Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L., and McGhee, J. M. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.

武笠英彦, 津守秀明, 島村熟成 (1986) 第59回日本生化学会大会

Nakano, Y. J., and Kuramitsu, H. K. (1992) J. Bacteriol. **174**:5639-5646

Nakajima, H., Kunioka, Y., Nakano, K., et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. **234**:178-182

西田智幸、和沢鉄一、石井由晴、後藤祐児、柳田敏雄. (1999) 第37回生物物理学会、3PA017

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinoshita, K. Jr. (1997) *Nature* **386**:299-302

Ofek, I., and Doyle, R. J. (1994) *Bacterial adhesion to cells and tissues*. 1-15, 195-238. Chapman and Hall, Inc., New York.

Ogawa, K., Okamura, K., and Sarko, A. (1981) *Int. J. Biol. Macromol.* **3**:31-36

Okada, Y. , and Hirokawa, N. (1999) *Science*. **283**:1152-1157

Okada, T., et al. (1995) *J. Dent. Res.* **74**:501

岡本浩幸. 平成 8 年度卒業論文

Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., and Holden, H. M. (1993) *Science* **261**:50-57

Rief, M., Oesterhelt, F., Heymann, B., and Gaub, H. E. (1997) *Science* **275**:1295-1297

Riddles, P.W., Blakeley, R.L., and Zerner, B. 1983. Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* **91**:49-60

Riger, R., Mets, U., Widengren, J., and Kask, P. (1993) *Eur. Biophys. J.* **22**:169-175

Robyt, J. F. (1995) *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* **51**:133-168

Robyt, J. F., and Martin, P. J. (1983) *Carbohydr. Res.* **113**:301-315

Roger, V., Tenovuo, J., Lenander-Lumikari, M., Sodering, E., and Vilja, P. (1994) Caries Res. 28:421-428

Rolla, G., Oppermann, R. G., Bowen, W. H., Ciardi, J. E., and Knox, K. W. (1980) Caries Res. 14:235-238

Romberg, L., Pierce, D. W., and Vale, R. D. (1998) J. Cell Biol. 140:1407-1416.

Russell, R. R. B., Donald, A. C., and Douglas, C. W. (1983) J. Gen. Microbiol. 129:3243-3250

Russell, R. R. B., Gilpin, M. L., Hanada, N., Yamashita, T., Shibata, Y., and Takehara, T. (1990) J. Gen. Microbiol. 136:1631-1637

Russell, R. R. B., Gilpin, M. L., Mukasa, H., and Dougan, G. (1987) J. Gen. Microbiol. 133:935-944

Sakakibara, H., Kojima, H., Sakai, Y., Katayama, E., and Oiwa, K. (1999) Nature 400:586-590

坂本武史、横田悦雄、安藤敏夫. (1999) 第37回生物物理学会、2PD004

Sako, Y., and Kusumi, A. (1994) J. Cell. Biol. 125:1251-1264

Sako, Y., and Kusumi, A. (1995) J. Cell. Biol. 129:1559-1574

Sako, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takeichi, M., and Kusumi, A. (1998) J. Cell. Biol. 140:1227-1240

佐甲靖志、柳田敏雄. (1999) 第37回生物物理学会、1PA067

Sase, I., Miyata, H., Corrie, J. E. T., Craik, J. S., and Kinoshita, K.

Jr. (1995) Biophys. J. 69:323-328

沢田正樹. 平成9年度卒業論文

Schnitzer, M. J., and Block, S. M. (1997) Nature. 388:386-389

Shimamura, A., Nakano, Y. J., Musaka, H., and Kuramitsu, H. K. (1994) J. Bacteriol. 176:4845-4850

Shingyoji, C., Higuchi, H., Yoshimura, M., Katayama, E., and Yanagida, T. (1998) Nature 393:711-714

Soukka, T., Roger, V., Soderling, E., and Tenovuo, J. (1994) Microb. Ecol. Health Dis. 7:139-144

Southwick, P. L., Ernst, L. A., Tauriello, E. W., Parker, S. R., Mujumdar, R. B., Mujumdar, S. R. Clever, H. A., and Waggoner, A. S. (1990) Cytometry 11:418-430

Spatafora, G., et al. (1995) Infect. Immun. 63:2556-2563

Syed, S. A., et al. (1975) Infect. Immun. 11:727-731

Synge, E. H. (1928) Phil. Mag. 6:356-362

多田隈尚史、阿藤淳一郎、石浜陽、羽原靖晃、谷時雄、船津高志.
(1999) 第37回生物物理学会、3PD041

Tam, S. C., Blumenstein, J., and Wong, J. T. F. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73:2128-2131.

Taylor, K. E. and Wu, Y. C. (1980) Biochem. Int'l. 1:353-358.

Terada, Y., Yanase, M., Takata, H., Takaha, T., and Okada, S. (1997)
J. Biol. Chem. **272**:15729-15733

富重道雄、萬野純恵、高桑雄一、楠見明弘. (1999) 第37回生物物理学会、
1PD040

Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A. H., and Yanagida, T. (1997)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **235**:47-53

Tomishige, M., Sako, Y., and Kusumi, A. (1998) *J. Cell. Biol.*
142:989-1000

Tsuda, Y., Yasutake, H., Ishijima, A., Yanagida, T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:12937-12942

上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志. (1999) 第37
回生物物理学会、2PA123

Usui, K., Ibata, K., Suzuki, T., Kawai, K. (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**:1346-1352

Vale, R. D., Funatsu, T., Pierce, D. W., Romberg, L., Harada, Y., and Yanagida, T. (1996) *Nature.* **380**:451-453.

Wang, C., Hefta, S. A., Paxton, R. J., Shively, J. E., and Mooser, G. (1990)
Infect. Immun. **58**:2165-2170

Wang, M. D., Schnitzer, M. J., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., and Block, S. M. (1998) *Science* **282**:902-907

Wang, T., and Ikai, A. 1999. *Jap. J. Appl. Phys.* **38**:3912-3917

和沢鉄一、石井由晴、柳田敏雄. (1999) 第37回生物物理学会、3PA018

White and Taylor (1976) *Biochemistry* **15**:5818-5826

Wiwat, C., Siwayaprahm, P., and Bhumiratana, A. (1999) *Curr. Microbiol.* **39**:134-40

Yamada, T., and Carlsson, J. (1975) *J. Bacteriol.* **124**:55-61

Yamasaki, R., Hoshino, M., Wazawa, T., Ishii, Y., Yanagida, T., Kawata, Y., Higurashi, T., Sakai, K., Nagai, J., Goto, Y. (1999) *J. Mol. Biol.* **292**:965-972

Yamashita, Y., et al. (1993) *J. Bacteriol.* **175**:6220-6228

Yanagida, T., Nakase, M., Nishyama, Katsumi, N., and Oosawa F. (1984) *Nature* **307**:58-60

横田浩章. 私信

Yokota, H., Saito, K., and Yanagida, T. (1998) *Physical Review Letters* **80**:4606-4609

表1 導入システインの反応性

GTF-cys 純度 ^a	96 %
Cys 含有率	84 % (Intact ^b) 90 % (Denatured ^c)
↓	
Cys 保持率	94%
反応性	93 %

チオール検出試薬(5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid))
を用いて、GTF-Cys に含まれるシステイン残基の保持率と
反応性を評価した。^aSephadex G-100ビーズを用いたア
フィニティー精製で得たGTF-CysをSDS-PAGE/CBB染色にか
けた後でデンストメーターで定量した。

^b0.1M Na-phosphate (pH8.0)中で測定した。

^c6M Gnd-HCl/0.1M Na-phosphate (pH8.0)中で測定した。

表2 グルコシル基転移活性 (s^{-1})
 反応条件 ; 20nM GTF, 10mM MOPS (pH 7.0), 100mM NaCl, 100mM sucrose, 25°C
 解糖系酵素を用いた共役反応で遊離のフルクトースとグルコース量を定量し、その差
 から転移量を算出した (測定値は2回の測定の平均値)。化学修飾したGTFとデキストラン
 は、いずれも本来の機能を保持している。

Dextran	None	T500	T500-TMR	T500-Biotir
GTF'	2.0	24.5	ND	ND
GTF-Cys	1.9	24.0	12.5	16.0
GTF-TMR	1.0	11.8	ND	5.8
GTF-Bio	1.7	20.1	8.6	ND

表3 T500-TMR 1分子イメージングの結果

非修飾T500	-	-	+	+	+
シヨ糖	-	+	-	-	+
観察視野に認められたスポット数 ^a	43.8 ±3.6	10.5 ±0.6	25.2 ±2.1	16.2 ±2.7	
解離速度定数(s ⁻¹)	3.7 ±0.6	6.4 ±0.6	3.0 ±0.5	5.3 ±1.0	
結合速度(mm ⁻² s ⁻¹) ^b	ND ^c	749 ±55	814 ±68	578 ±50	

^a焦点を合わせた瞬間に1視野内に認められた蛍光スポット数。

^b5秒間に観察視野に現れたスポットをカウントし、面積当たり、秒当たりのスポット数として示した。

^c大半のスポットがガラス表面下に滞在し続ける（多くのGTF分子と相互作用している）為、結合速度を反映しない。

表4 GTF-TMR 1分子イメージングの結果

	非修飾GTF	-	-	+	+	+
	シヨ糖	-	+	-	-	+
観察視野に認められたスポット数	118.5 ±39.7	44.3 ±8.2	55.9 ±9.4	35.3 ±2.0		
解離速度定数(s^{-1})	6.7 ±0.8	8.7 ±0.9	9.2 ±1.7	13.3 ±1.5		
結合速度($mm^{-2}s^{-1}$)	1774 ±108	1262 ±138	2053 ±272	749 ^a ±36		

^a大過剰(~10,000倍)の非修飾GTF存在下では、結合速度の大きな減少が認められた。これは、ガラス表面下のデキストランが多くの α -1,3-鎖で修飾され、GTFが結合しにくくなったためであると思われる。

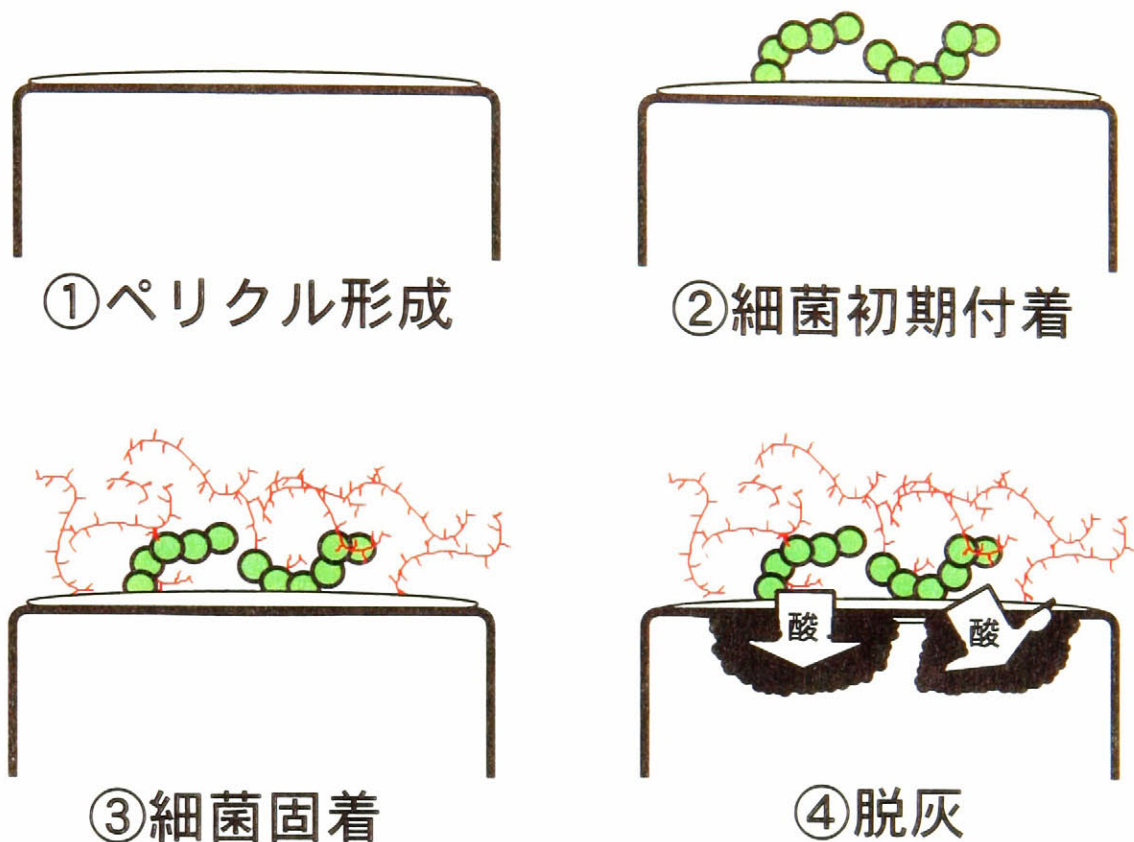


図1 う蝕の発生機構

①唾液中の成分が歯面に吸着しペリクル層ができる。②ミュータンス連鎖球菌がペリクルを介して付着する。③ミュータンス菌が産生するグルコシルトランスフェラーゼが合成する粘着性不溶性グルカンによって、細菌の固着が起こる。④細菌の代謝で生じた酸（主に乳酸）によって脱灰が起こる。不溶性グルカンは酸の拡散バリアーとしてもう蝕誘発を高めている。

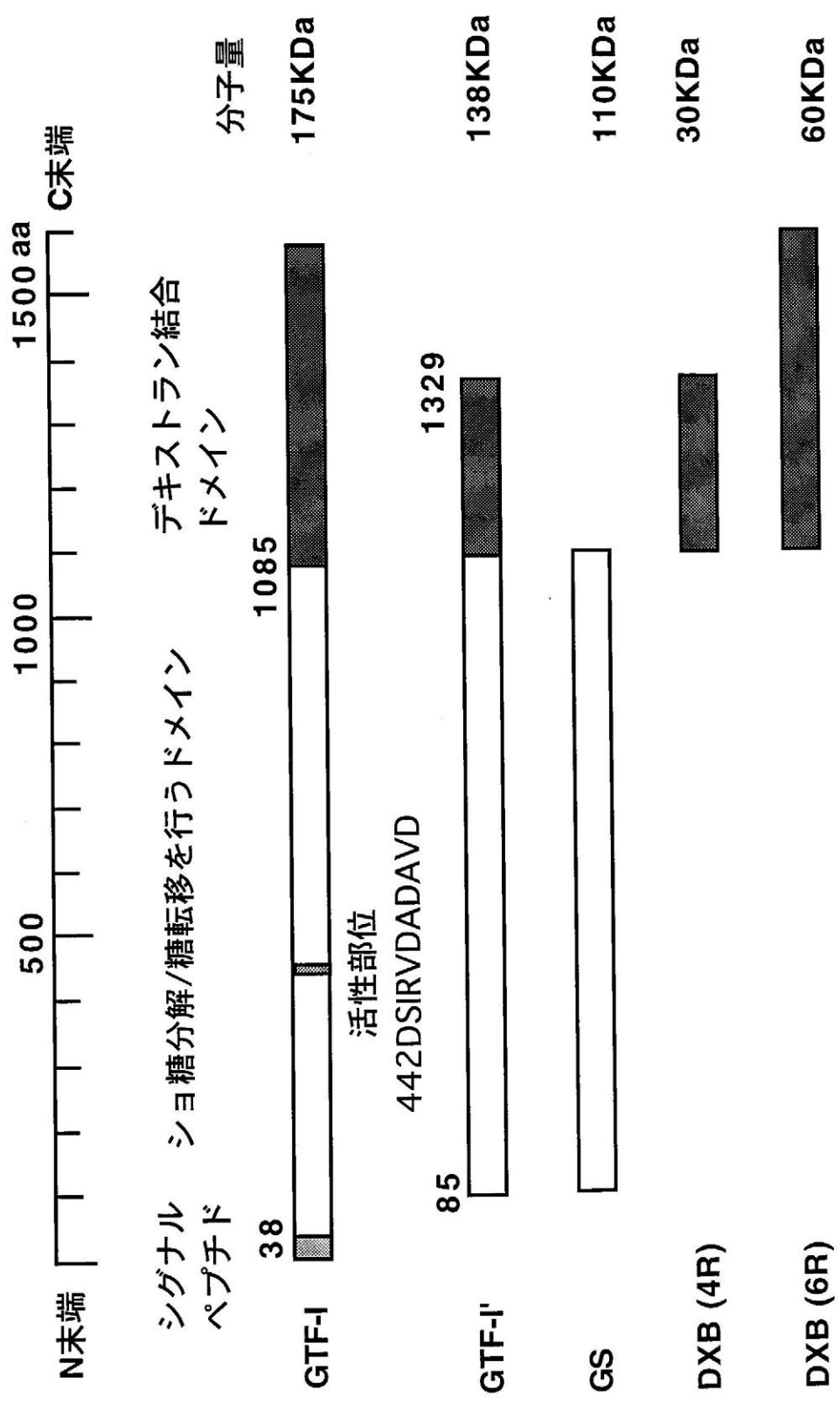
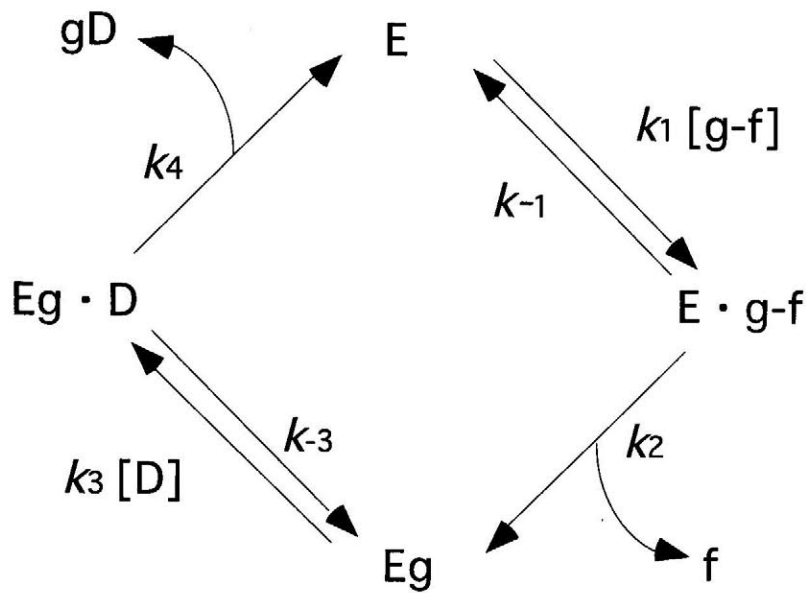


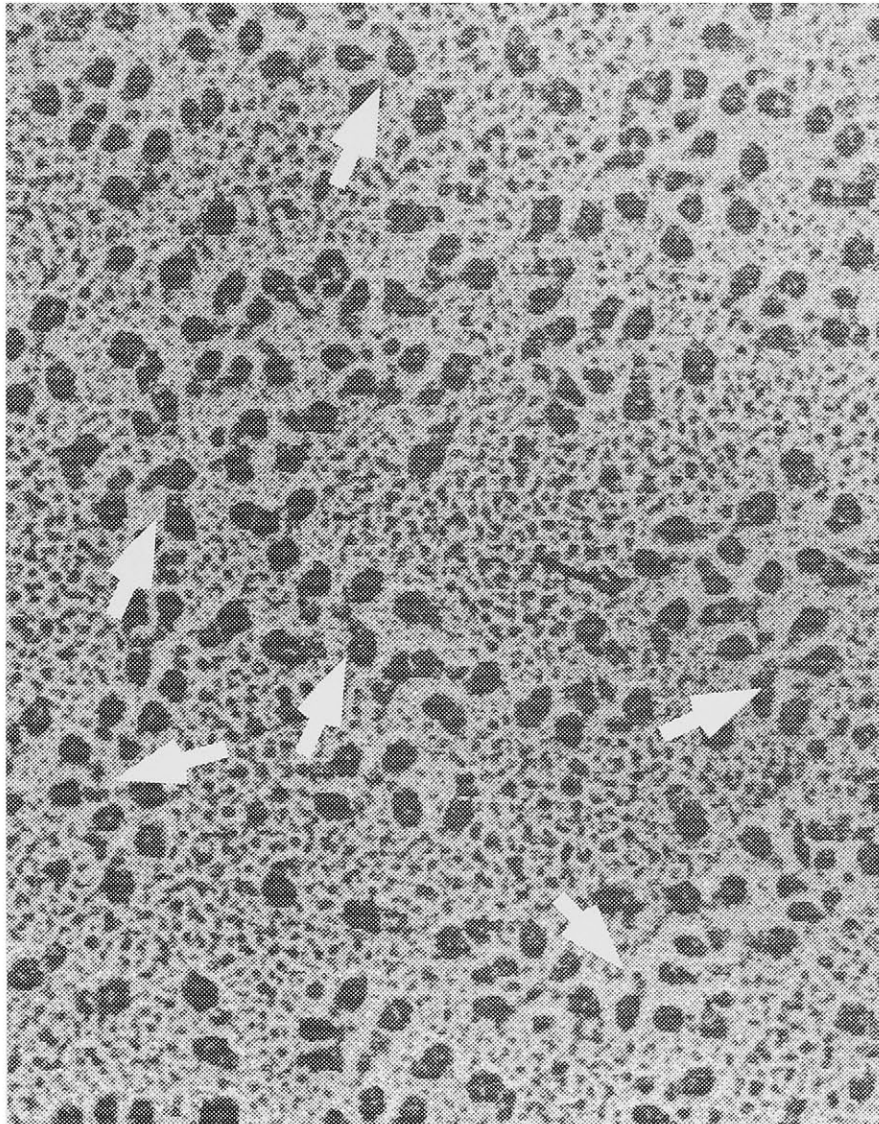
図2 GTF-Iの機能領域とGTF-I由来の部分クローン



E : GTF
 g-f : ショ糖
 g : グルコース
 f : フラクトース
 D : デキストラン

図3 GTFの酵素反応スキーム

1分子イメージングにおいて、ショ糖存在下で観察されるのは、グルコシル化された GTF (Eg) にデキストラン (D) が結合し、グルコシル基転移反応後に修飾されたデキストラン (gD) が解離していくステップである。

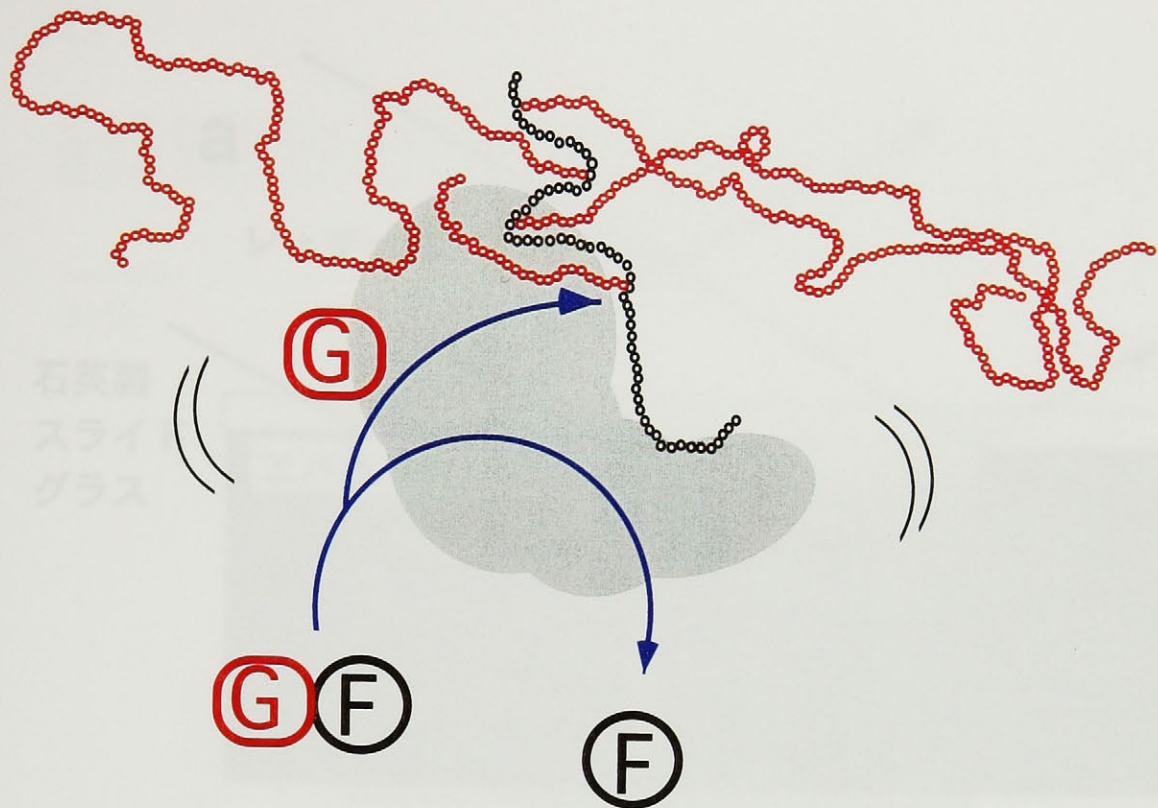


200nm

図4 GTF'の電子顕微鏡像

GTF'分子は全体として洋ナシ型をしている。矢印で示した分子は2つのドメインから成ることが良く分かる。

(東京大学 医科学研究所 片山栄作先生のご提供)



- α-1,6-グルカン鎖 (デキストラン)
- α-1,3-グルカン鎖
- ⓐ グルコース
- ⓑ フルクトース
- ⓐⓑ ショ糖

図5 GTF-Iの作用模式図

GTFはショ糖を加水分解し、生じたグルコースをデキストラン鎖上にα-1,3-グルカン鎖として付加・伸長する。側鎖は平均でグルコース10残基毎に合成される。

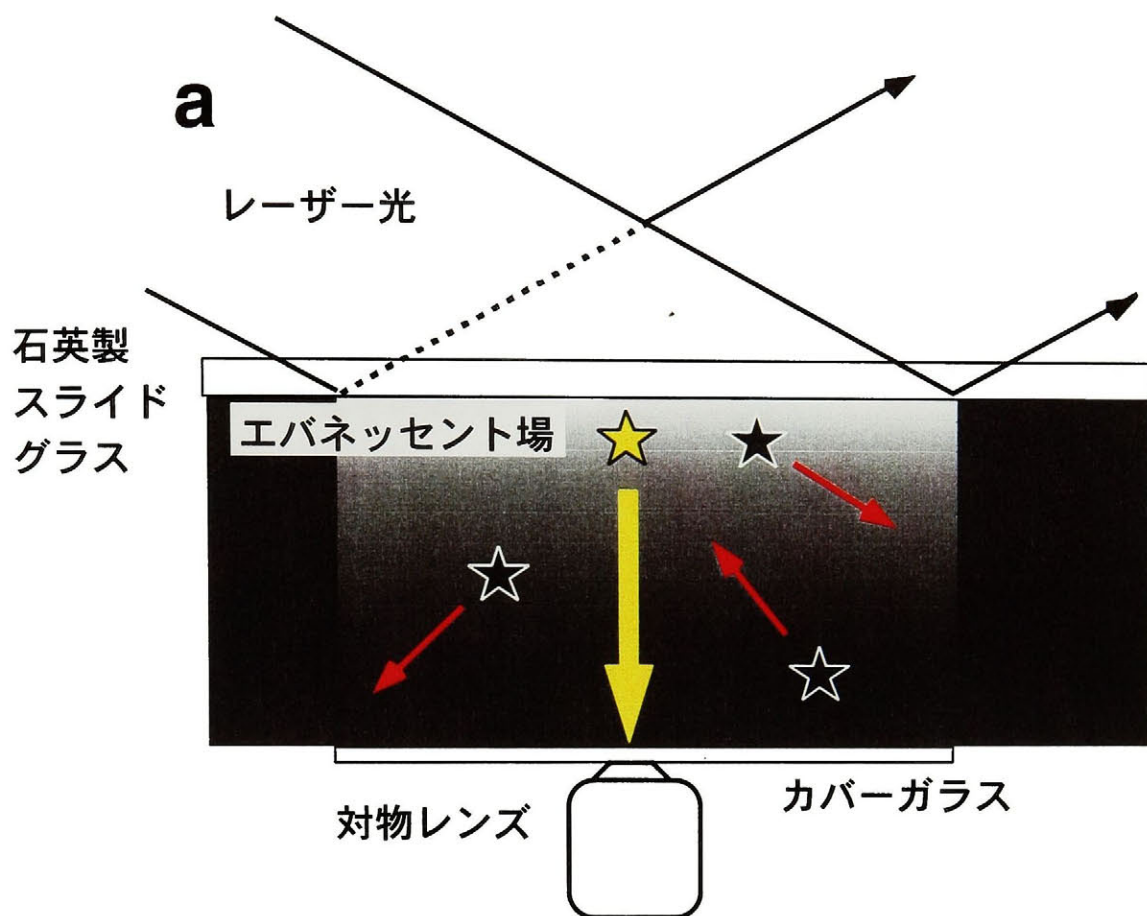
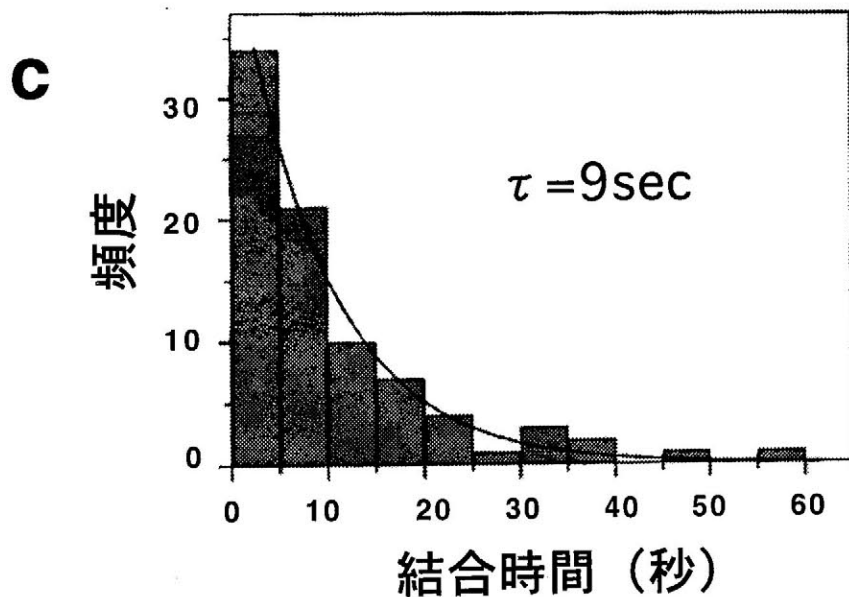
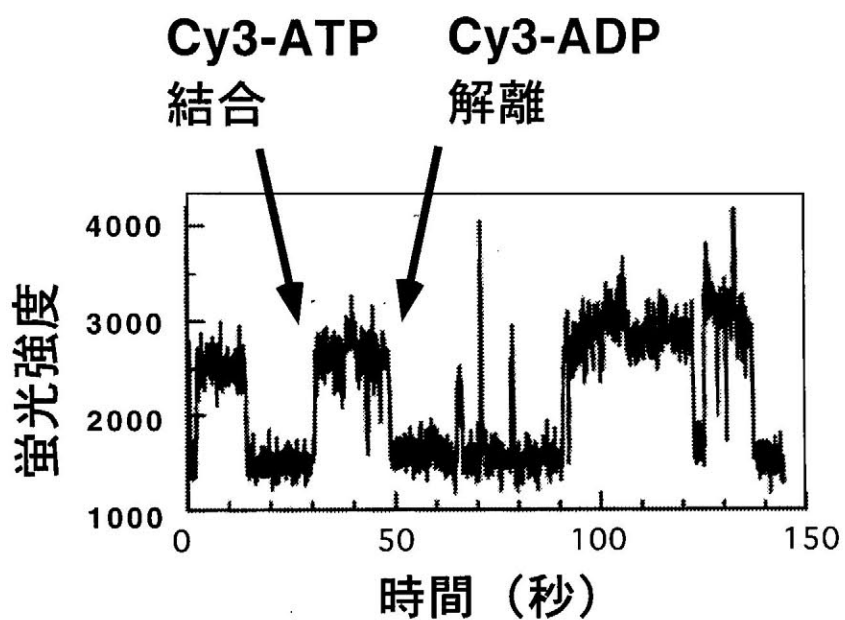
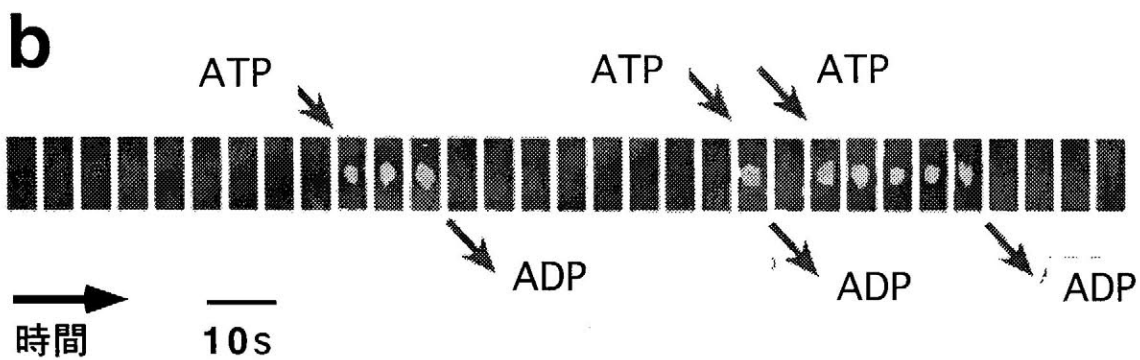


図6 1分子酵素反応のイメージング

(a) 1分子蛍光イメージングのためのプリズム型エバネッセント照明

(Funatsu, T., et al. 1997, Harada, Y., et al 1998)。対物レンズの辺縁部にレーザー光を入射すると、ガラス/水溶液界面で全反射し、表面近傍100~200nmの深さに光がしみ出す。この光の場をエバネッセント場という。エバネッセント場を蛍光照明に使うと背景光を著しく減少させることができ、コントラストの高い蛍光1分子の像が得られる。

(b) ATP加水分解反応の1分子イメージングの測定例(Funatsu, T., et al. 1995より改図)。オレンジ色の蛍光色素Cy3で標識したATPを用いる。酵素反応中は、基質である蛍光ATPは止まっているので点像として蛍光像を与えるが、反応していないときはブラウン運動で激しく動いているので蛍光像を与えない。つまり、酵素反応が蛍光のON-OFFとして可視化される。(c) Cy3-ATPが点滅している時間のヒストグラム。一次反応プロットより得られた速度は、多分子系の結果と一致する。



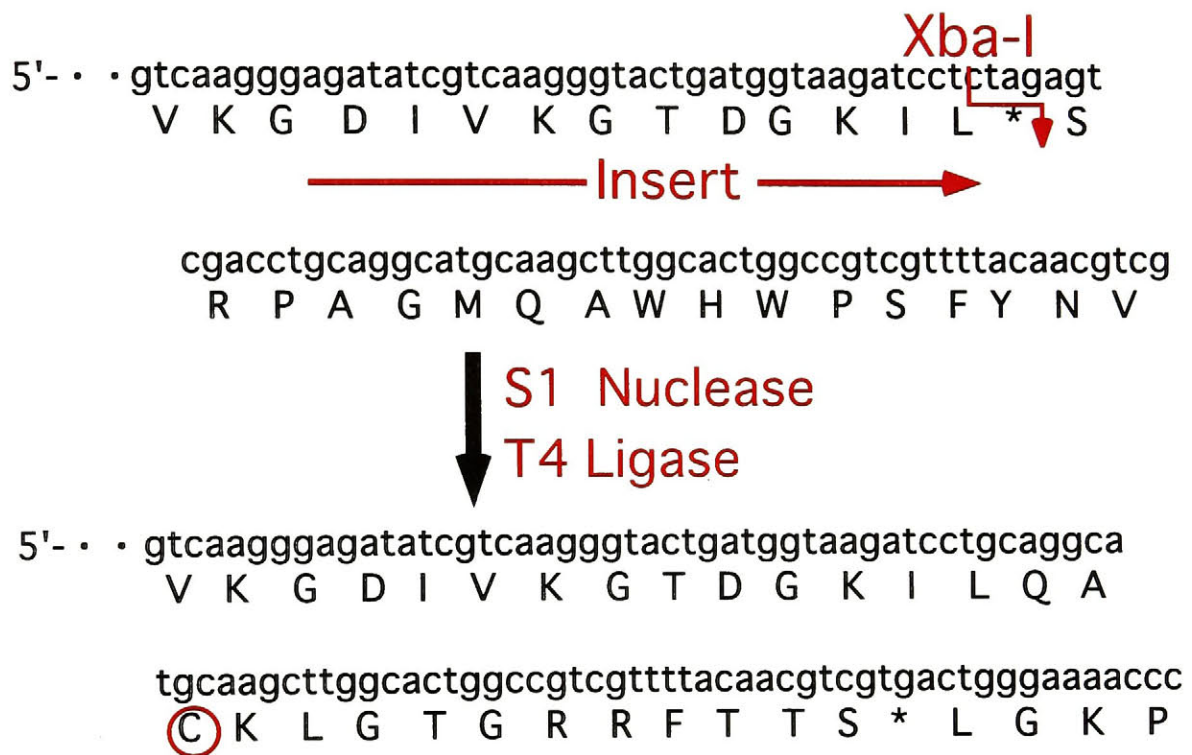


図7 システイン残基の導入

GTFをコードするプラスミド pAB2を制限酵素処理後に削り込みとライゲーションを行った。得られたクローンは、システインをコードするコドンを含んでいる。大腸菌JM109を形質転換して得られた遺伝子産物を硫酸分画と陰イオン交換クロマトグラフィーで精製し、GTF-Cysとした。

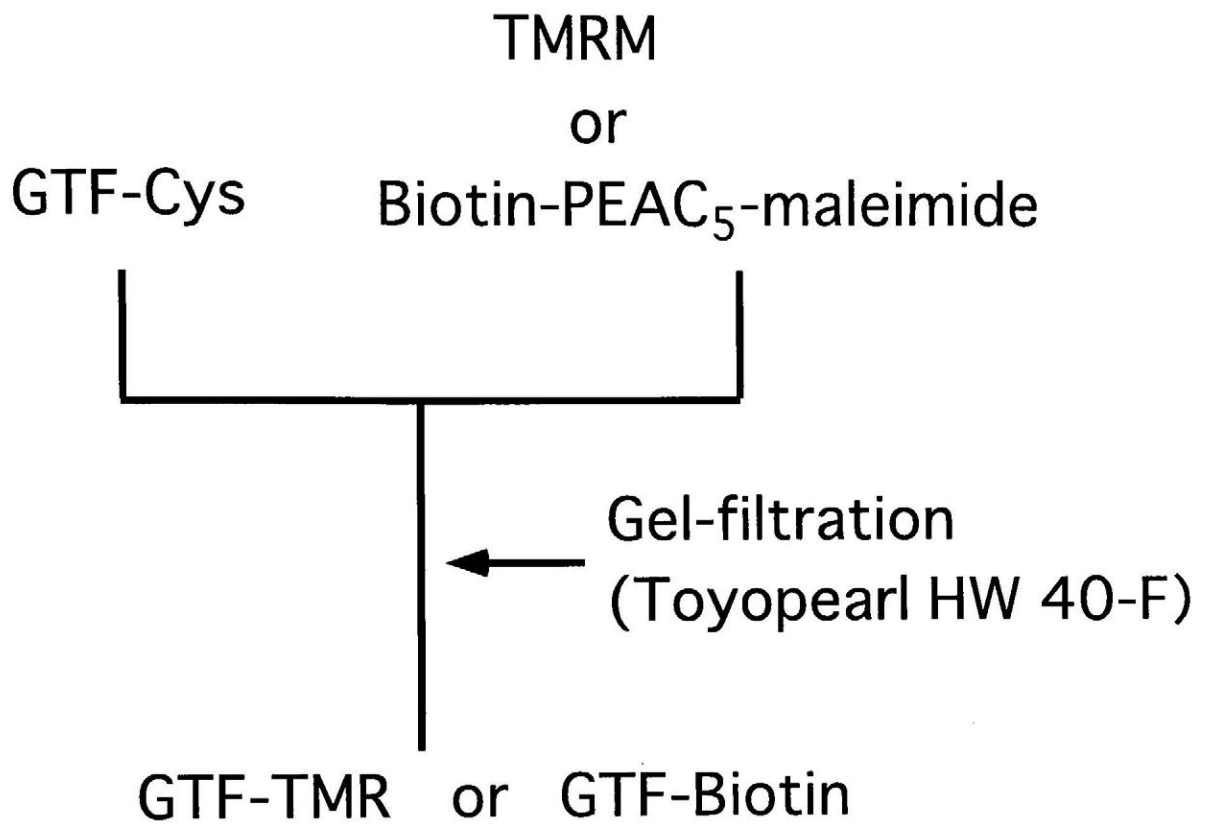


図8 GTF-Cysの化学修飾

チオール基とマレイミド基の特異的反応により、
GTFにTMRとビオチンを導入した。

TMR標識率: 70% for GTF-TMR

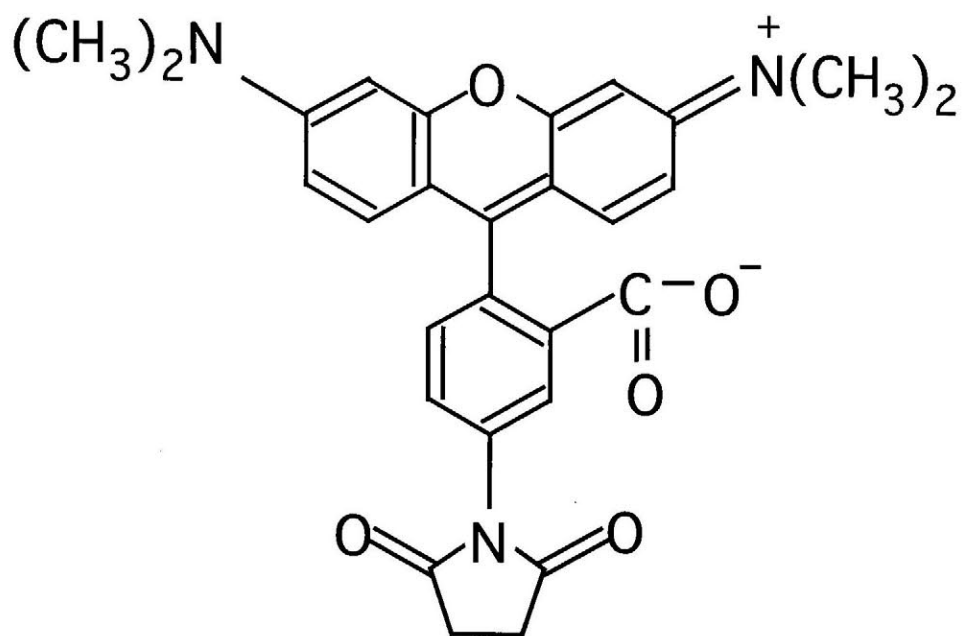


図9 Tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMRM)の化学構造
蛍光色素TMRは、分子吸光係数と蛍光量子収率が大きく、安定性も
良いので、1分子イメージングに適している。MW, 482;
Abs, 541nm; Em, 567nm; ϵ 541, 91,000 M⁻¹ · cm⁻¹

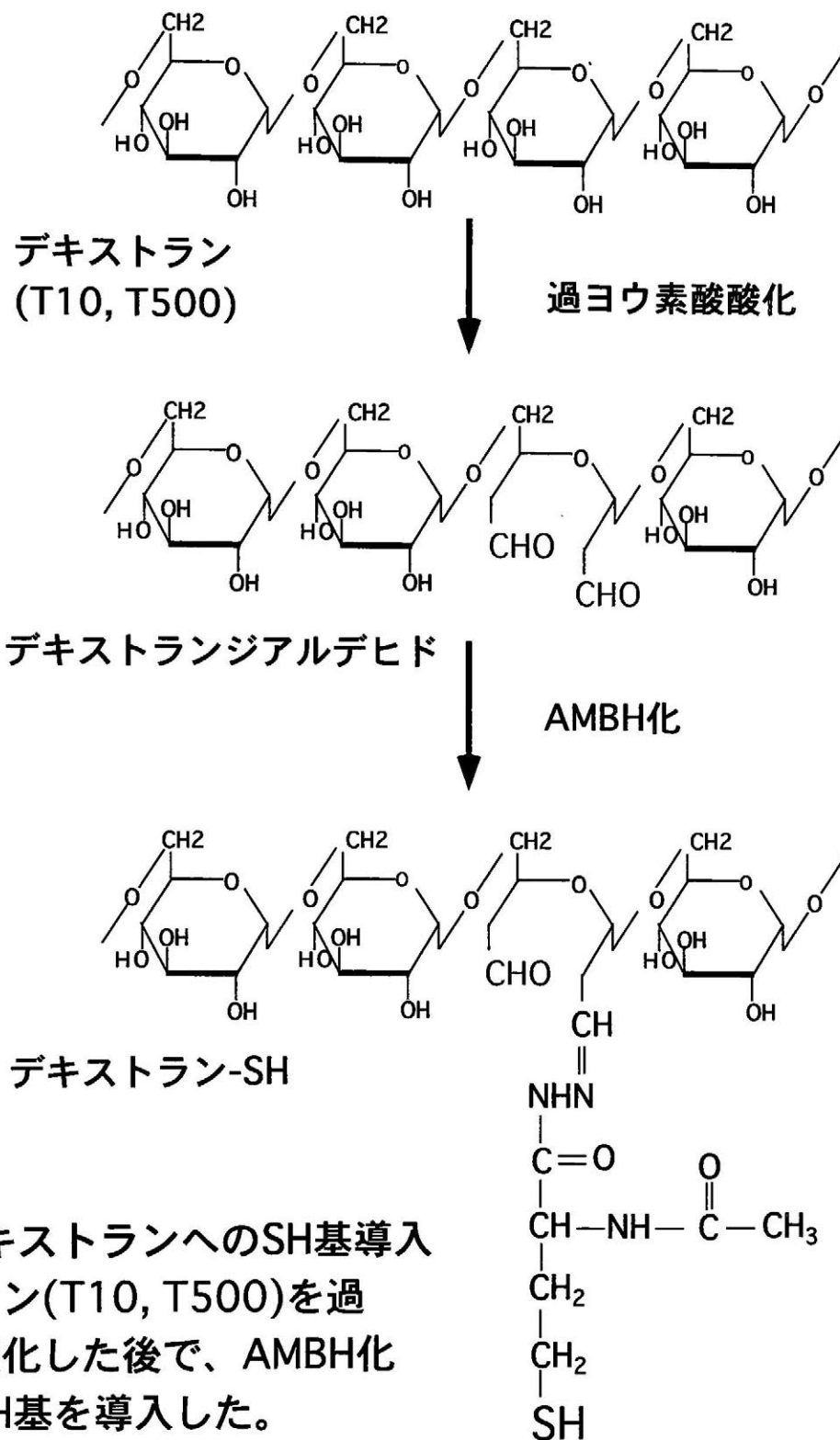


図10 デキストランへのSH基導入
 デキストラン(T10, T500)を過
 ヨウ素酸酸化した後で、AMBH化
 を行い、SH基を導入した。

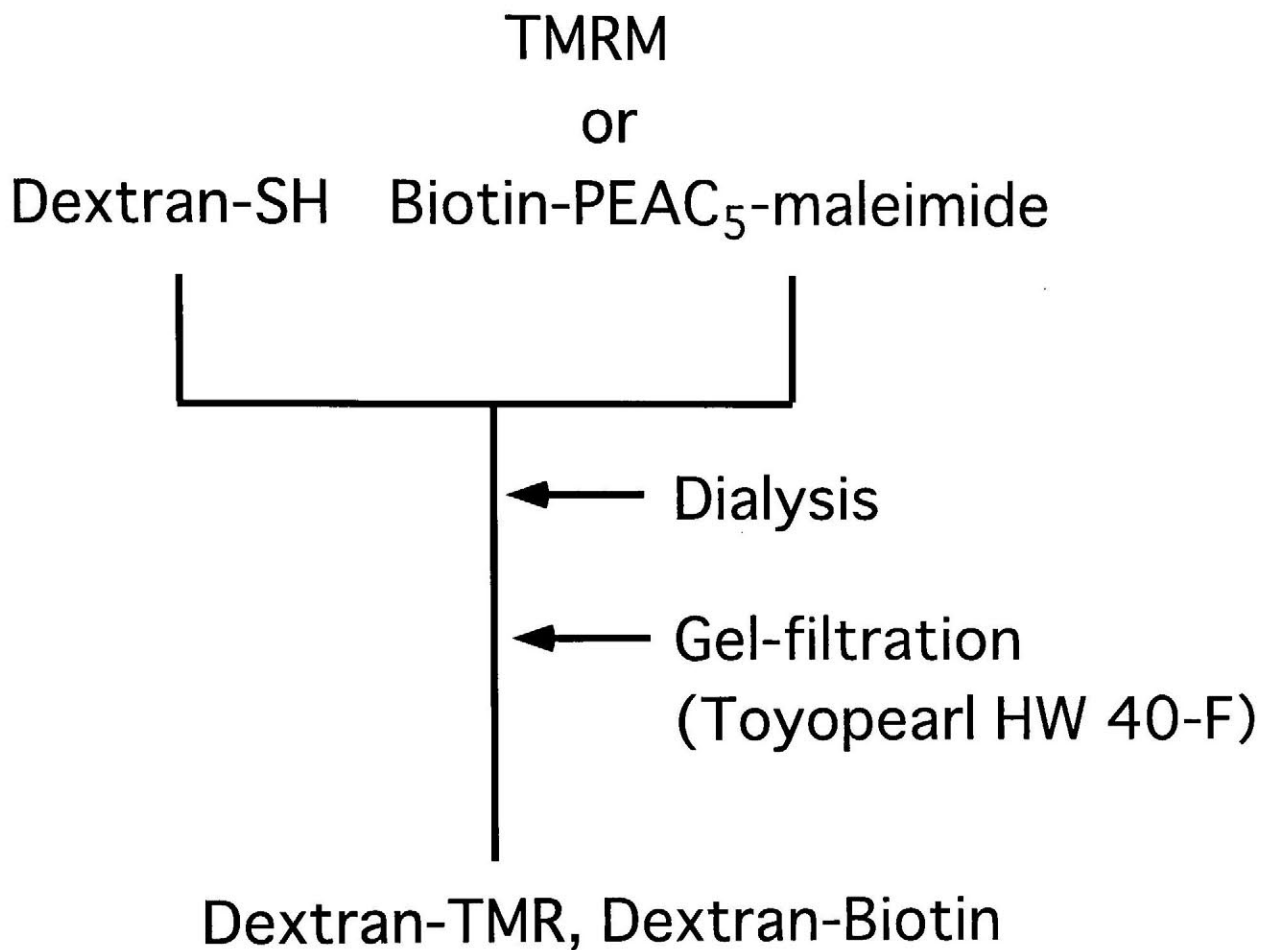


図11 デキストランの化学修飾

チオール基とマレイミド基の特異的反応により、
デキストランにTMRとビオチンを導入した。

TMR標識率:50% for T10-TMR, and 400% for T500-TMR

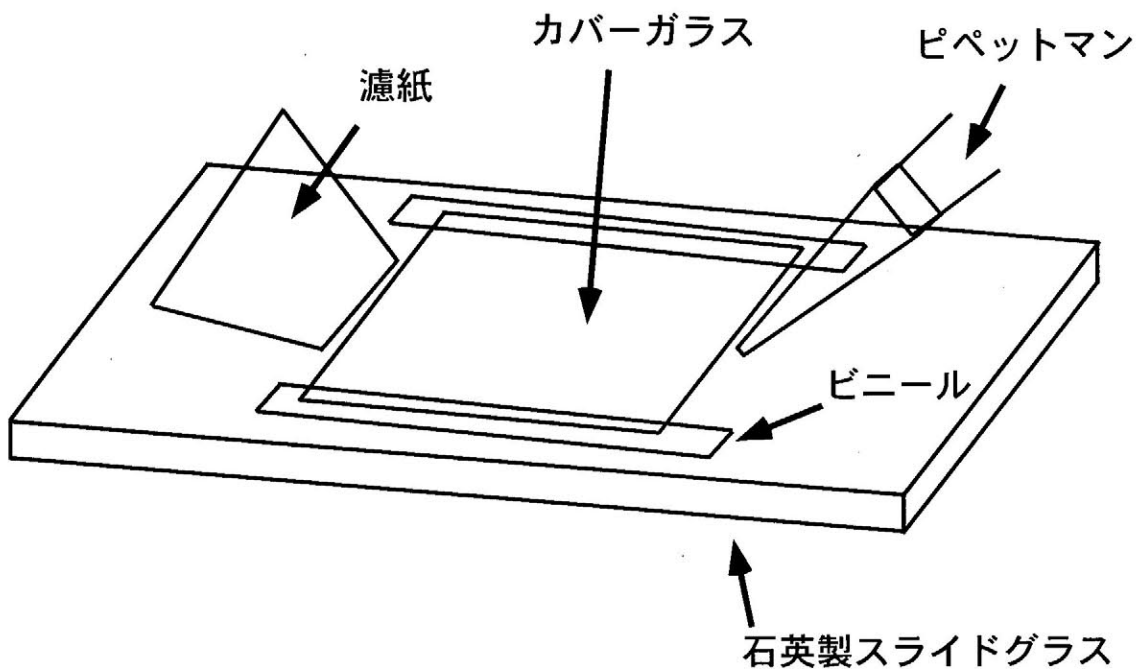


図12 1分子イメージングのフローチャンバー
石英製のスライドガラスに2枚のビニールをのせ、
その上にカバーガラスをおきフローチャンバーとした。
チャンバーの片側から試料を流し入れ、他方から濾紙で
溶液を吸った。全ての試料添加後にカバーガラスの縁を
市販のマニキュアで接着し、試料の乾燥を防いだ。

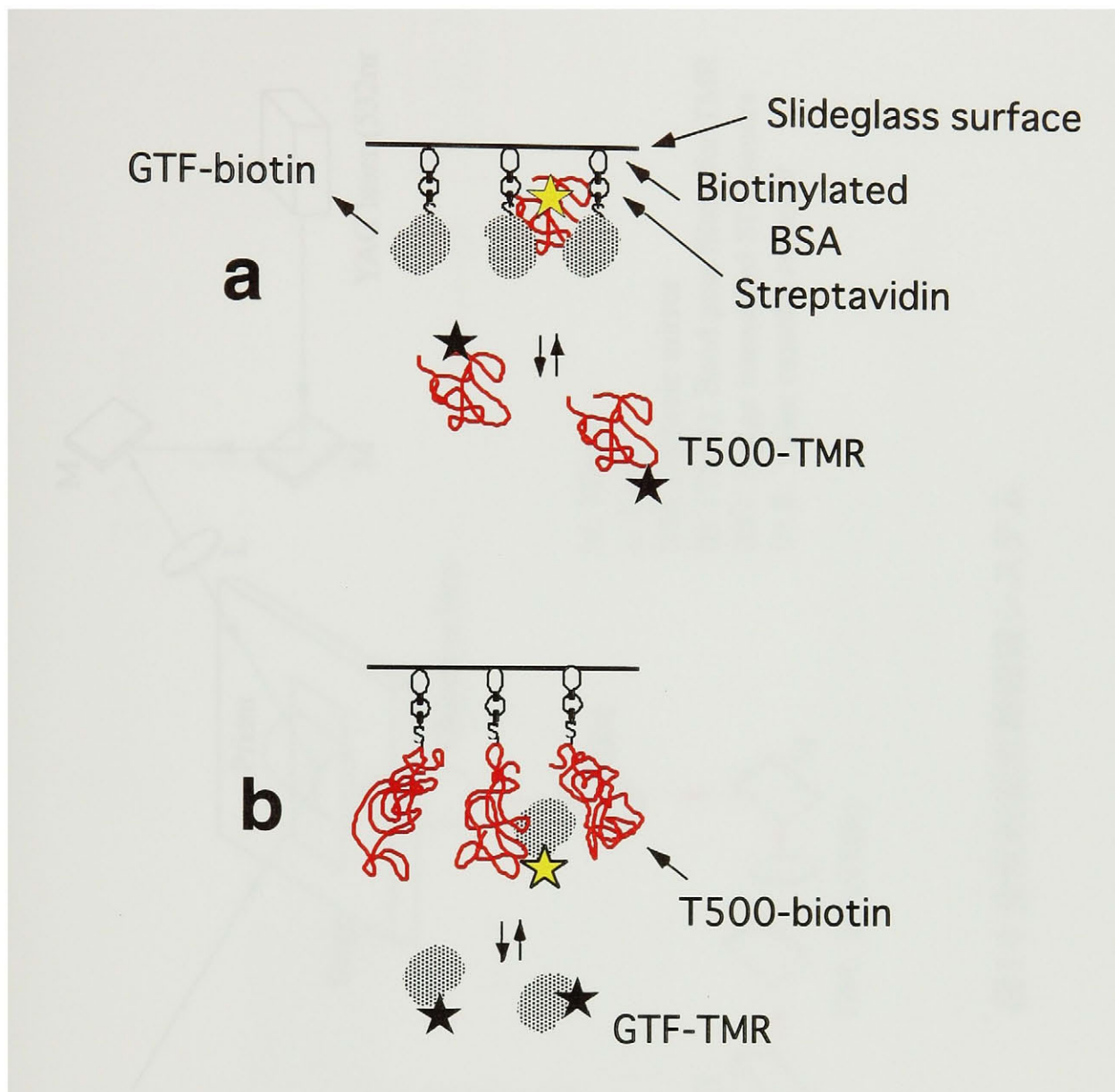


図13 1分子観察フローチャンバー内の模式図

蛍光標識したGTFおよびデキストラン分子を全反射蛍光顕微鏡を用いて観察した。デキストラン-TMRの1分子観察には、スライドガラス表面にビオチン化したGTFを固定化し(a)、GTF-TMRの観察には、ビオチン化したデキストランを固定化した(b)。

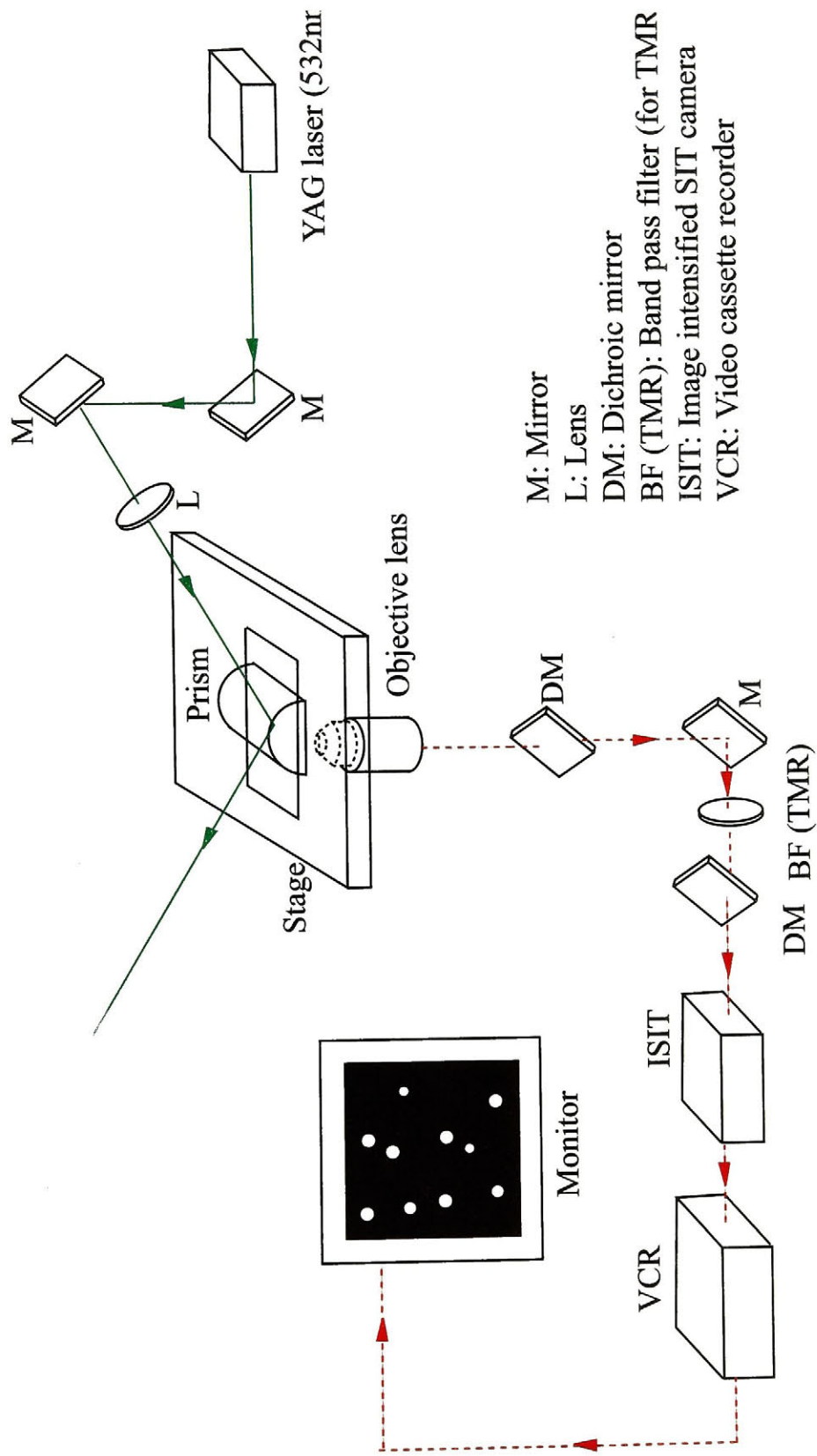


図14 全反射蛍光顕微鏡システム

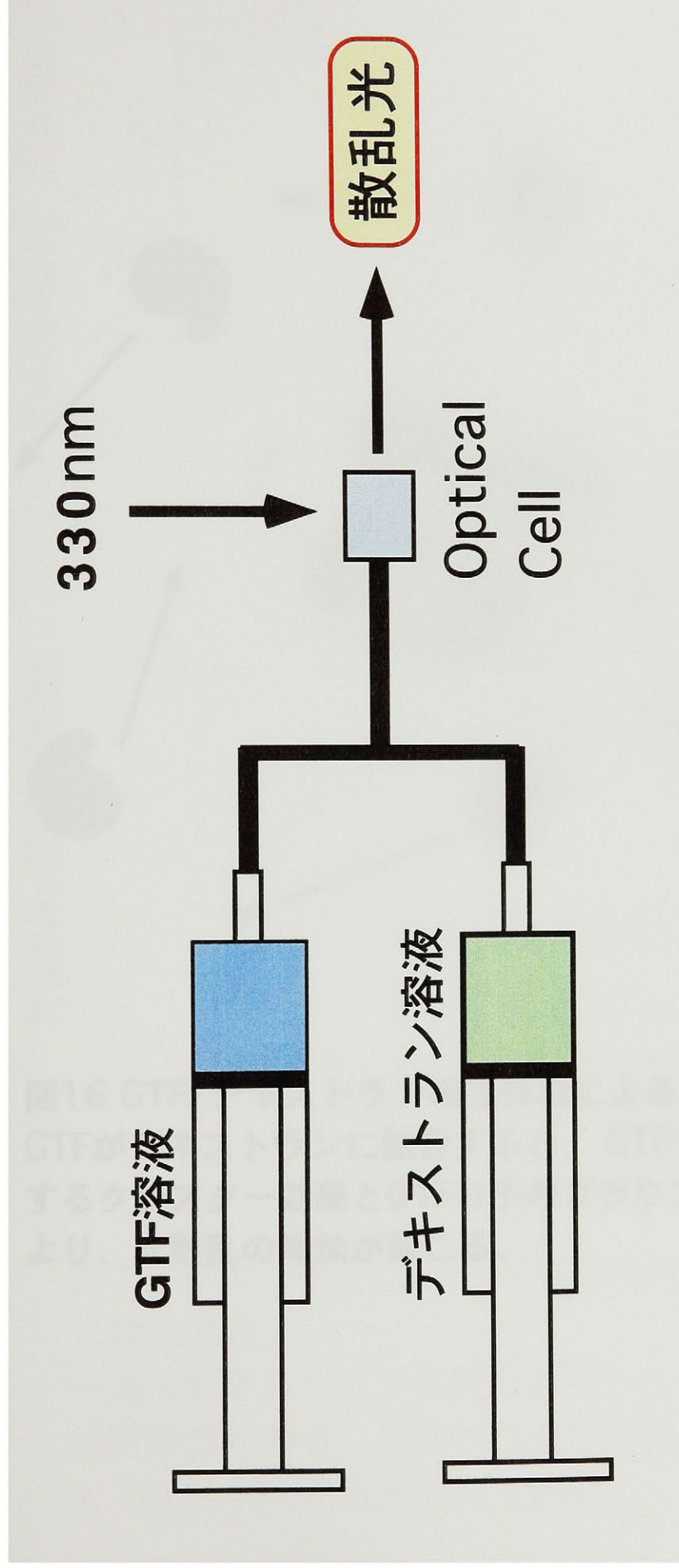


図15 ストップフロー光散乱測定の様式図
GTF溶液とデキストラン溶液を測定セル内で急速混合し、
330nmの光散乱を検出した。

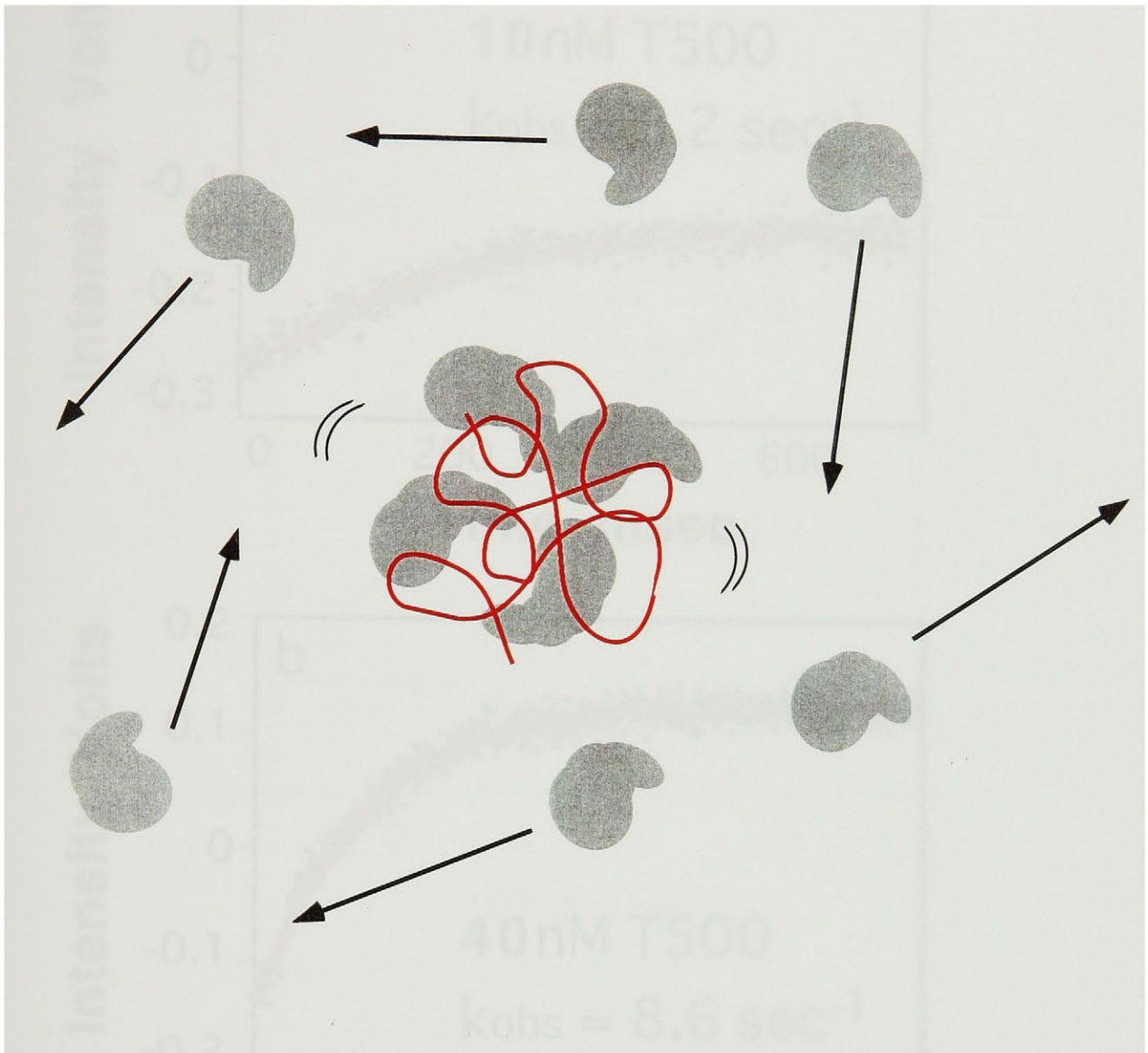


図16 GTF/デキストラン相互作用による光散乱の増加
GTFがデキストランに結合すると、GTF分子同士が近接するクラスター効果とGTF分子のブラウン運動の抑制により、光散乱の増加が起こる。

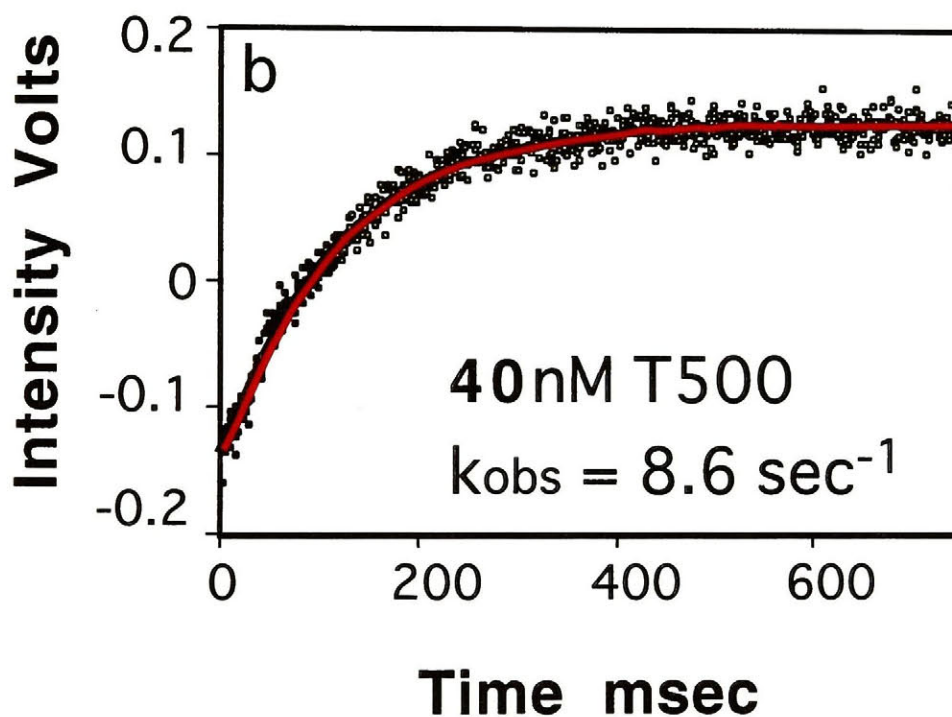
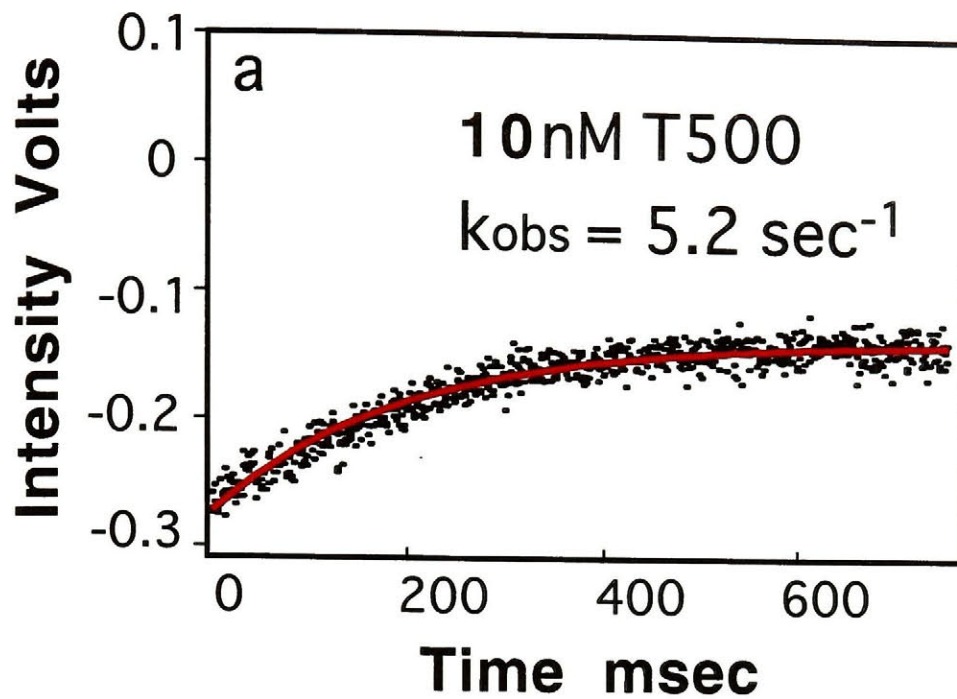


図17 GTF/デキストラン相互作用のストップフロー光散乱測定

一連のデキストラン濃度で測定した光散乱(330nm)の経時変化から、見かけの反応速度を求めた。

a, 10nM T500; b, 40nM T500

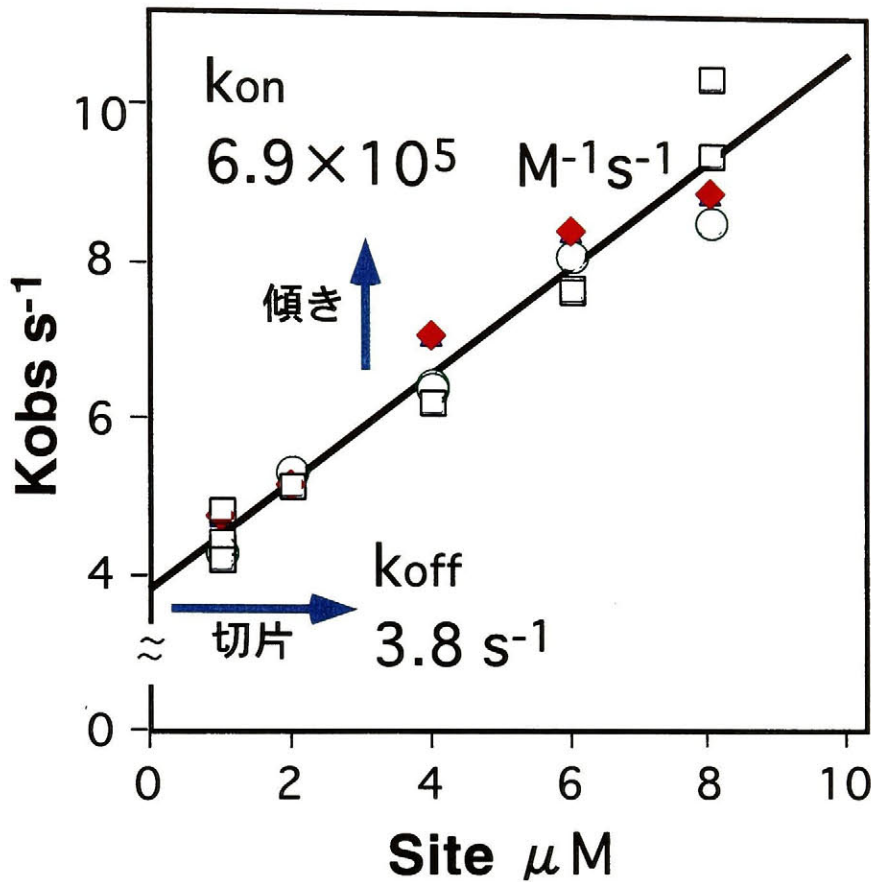


図18 ストップフロー光散乱測定による速度定数の決定
 図17のように求めた見かけの反応速度をGTFの結合部位濃度に対してプロットした。GTF1分子は、15グルコースユニットを認識するとして結合部位濃度を決定した。直線回帰の傾きは結合速度定数、切片は解離速度定数を与える。

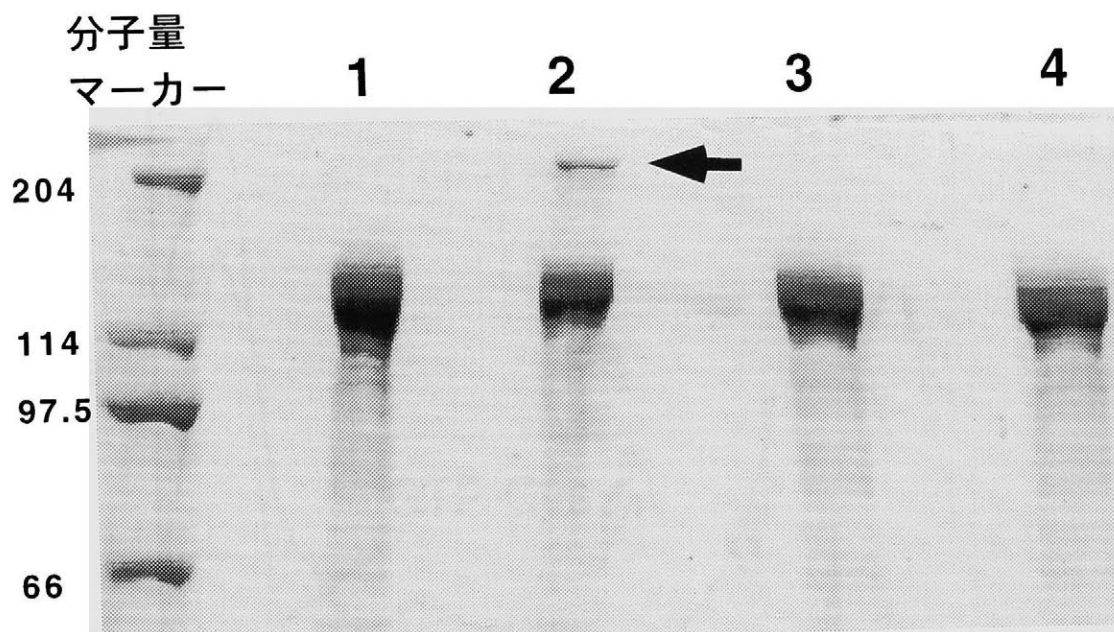


図19 還元/非還元条件でのSDS-PAGE
 GTF-Cys (lane 1,2)、GTF' (lane 3,4)を還元 (lane 1,3) および
 非還元 (2,4)条件でSDS-PAGE後にゲルをクマシーブリリアント
 ブルーで染色した。GTF-Cysの非還元状態にのみGTF-Cys同士が
 ジスルフィド結合したダイマーが認められる (矢印)。

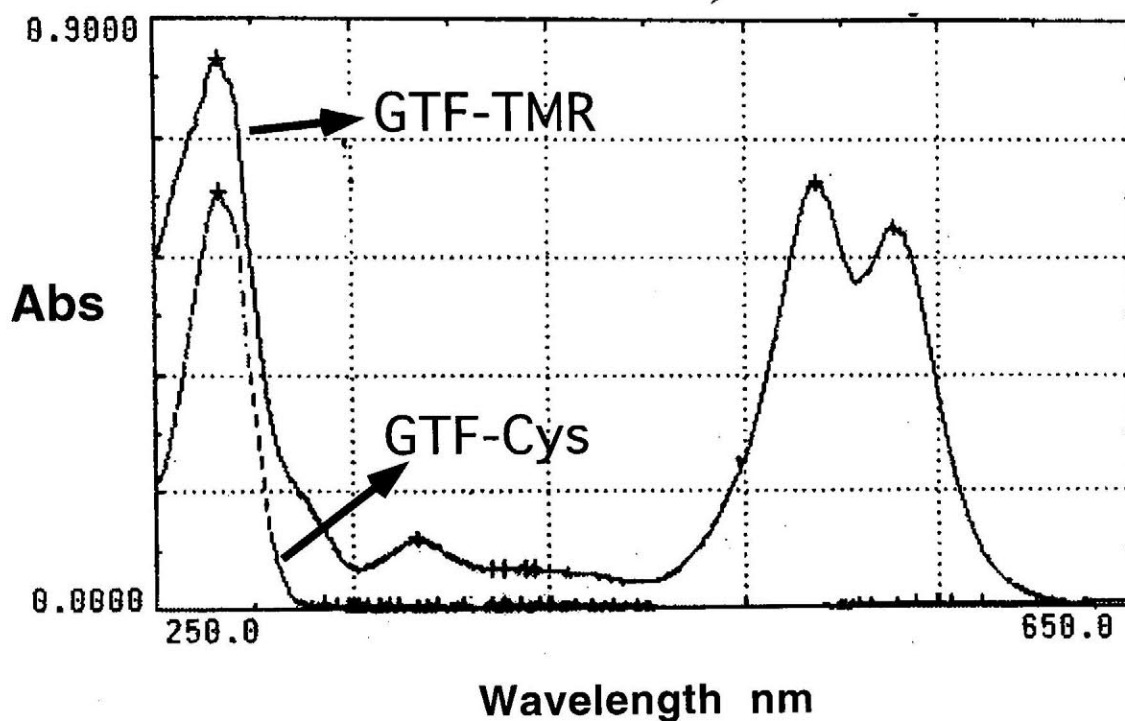


図20 蛍光標識GTFの吸収スペクトル
 GTF-CysおよびGTF-TMRの吸収スペクトルを示す。
 GTF-TMRのスペクトルには、GTF-Cysには見られない
 可視領域にTMR由来のピークが認められる。

T-10

洗淨

透過光像

蛍光像

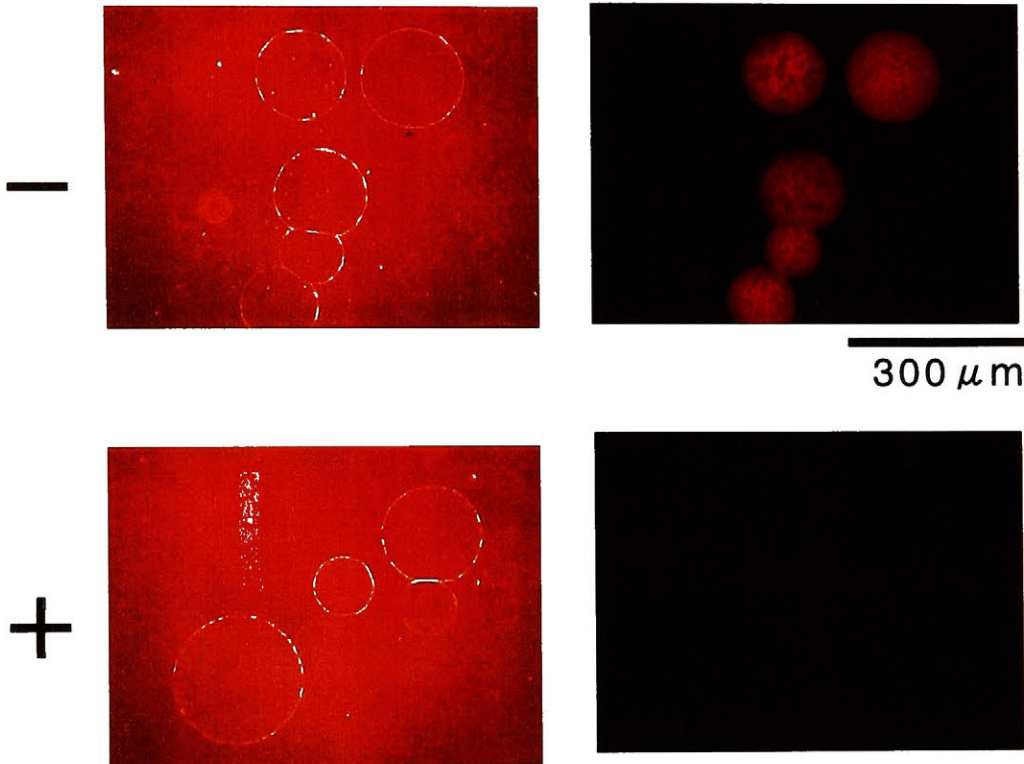


図21 GTF/デキストラン相互作用の多分子系観察

上段；GTF-TMRをSephadex G-100ビーズと混合し25°Cで15分インキュベーションした。ビーズをBuffer Aで洗淨した後で、蛍光顕微鏡観察(Olympus BH2-RFL)を行った。透過光像で見られるビーズと同じ位置にTMR由来の蛍光像が認められる。TMR由来の蛍光強度は、添加したGTF-TMRの濃度に依存した(Data not shown)。

下段；ビーズをGTF-TMRと混合後、3mg/ml T10（可溶性のデキストラン）を含むBuffer Aで洗淨した。GTF-TMRがT10で洗い流されたため、ビーズは蛍光性を示さない。(励起フィルター, G; ダイクロイックミラー, G; 吸収フィルター, O570)

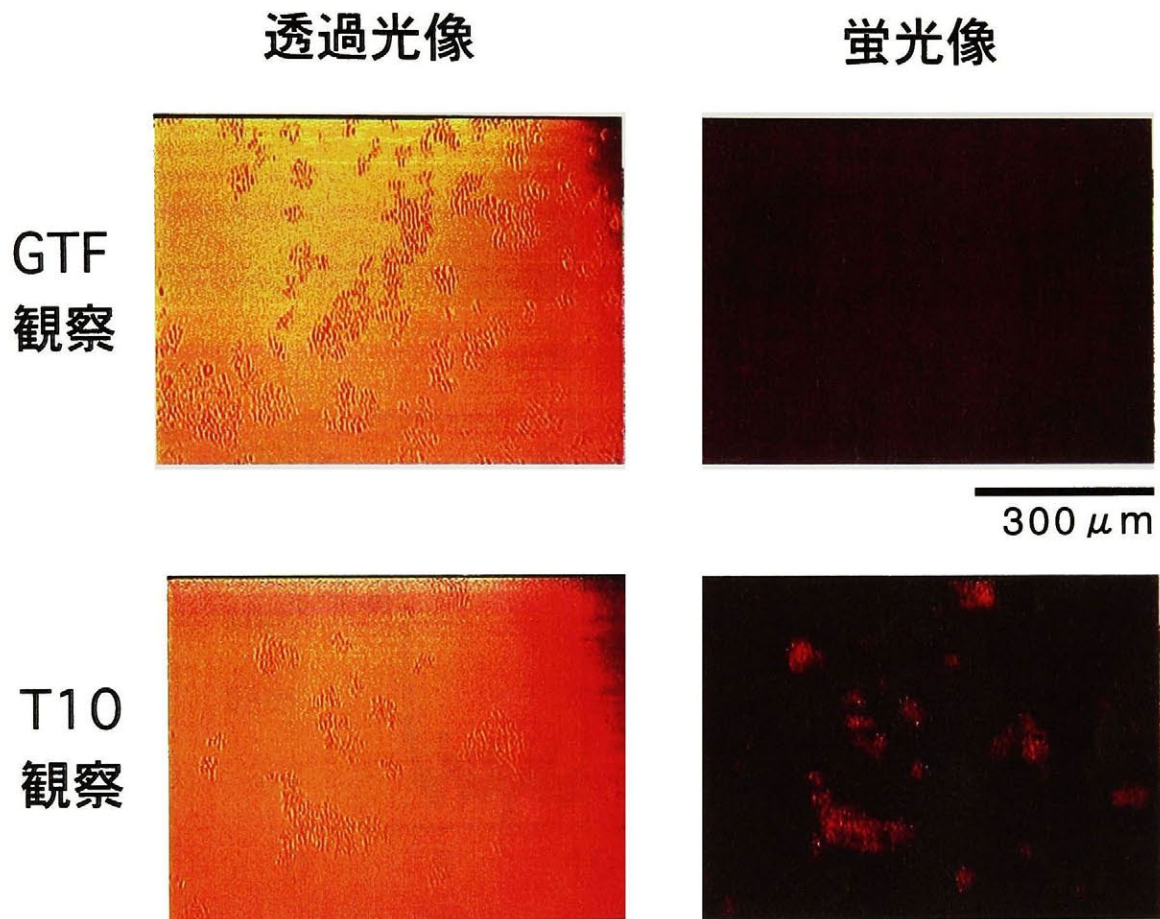


図22 GTF-I/WIG相互作用の多分子系観察

上段；GTF-TMR ($2\mu\text{M}$)をT10 ($2\mu\text{M}$)、シヨ糖(100mM)と混合後、2時間放置して得たWIGの蛍光顕微鏡観察を行った。GTF-TMRとWIGの局在は一致しなかった。

下段；WIGをGTF($0.3\mu\text{M}$)とT10-TMR($2\mu\text{M}$)から合成した。シヨ糖添加5分後に、小さな赤色のWIGが見え初め(Data not shown)、それらが集まって大きなWIGとなった(右)。

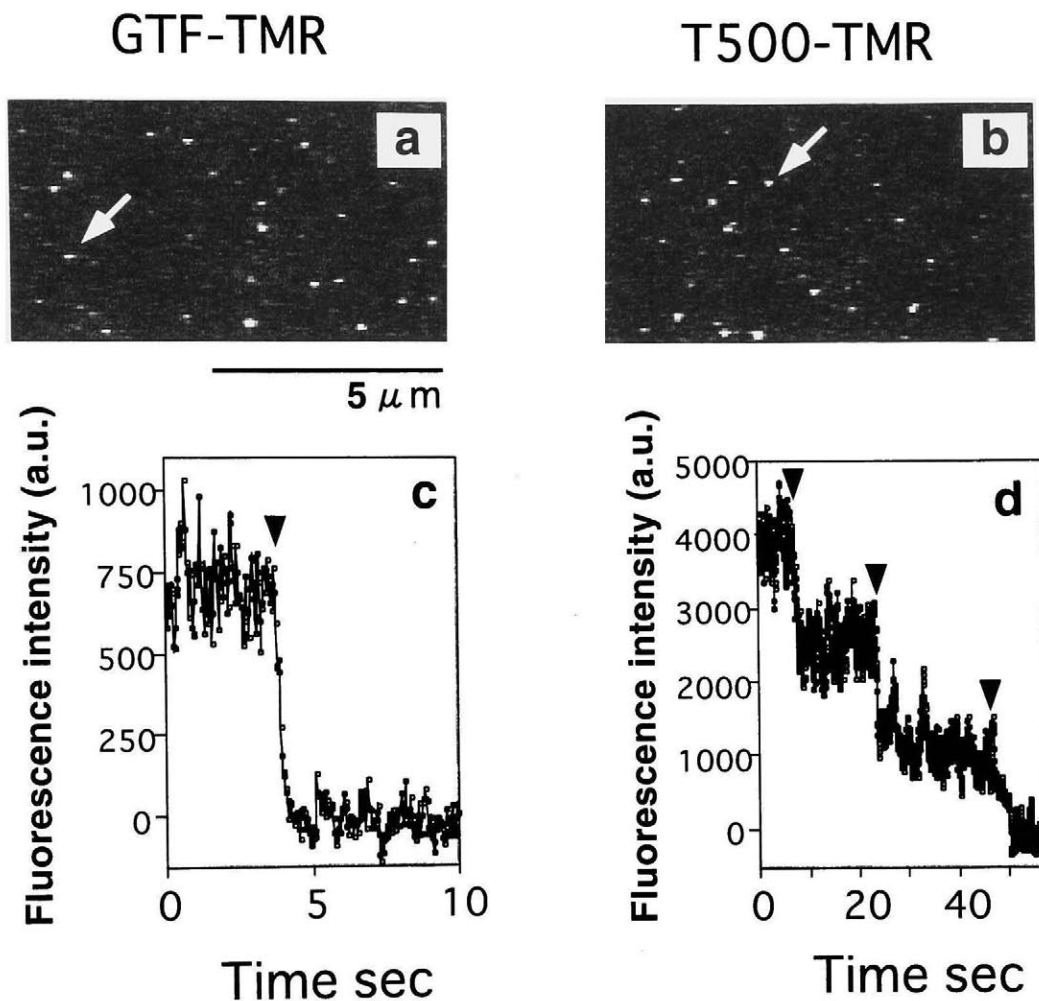


図23 1分子GTF-TMRおよびT500-TMRの退色過程

GTF-TMR (a)およびT500-TMR(b)をガラス表面下に固定化し、1分子蛍光イメージングを行った。試料溶液には、退色防止系(グルコース、グルコースオキシダーゼ、カタラーゼ、 β -メルカプトエタノール)が含まれている。スポット(白矢印)の蛍光強度をComputer image processor (Avio Excel, Nippon Avionics, Tokyo, Japan)を用いてビデオレートで解析した(c,d)。GTF-TMRは、1ステップで、T500-TMRは、3ステップで退色が起こった(矢頭)。

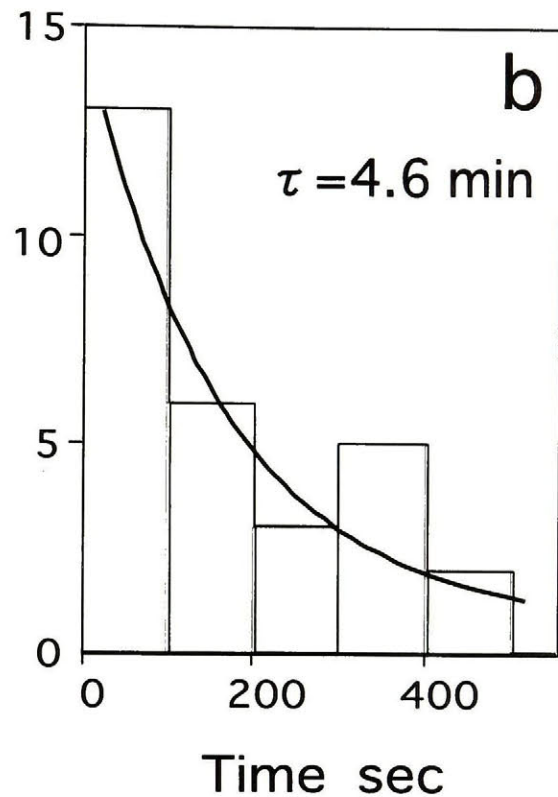
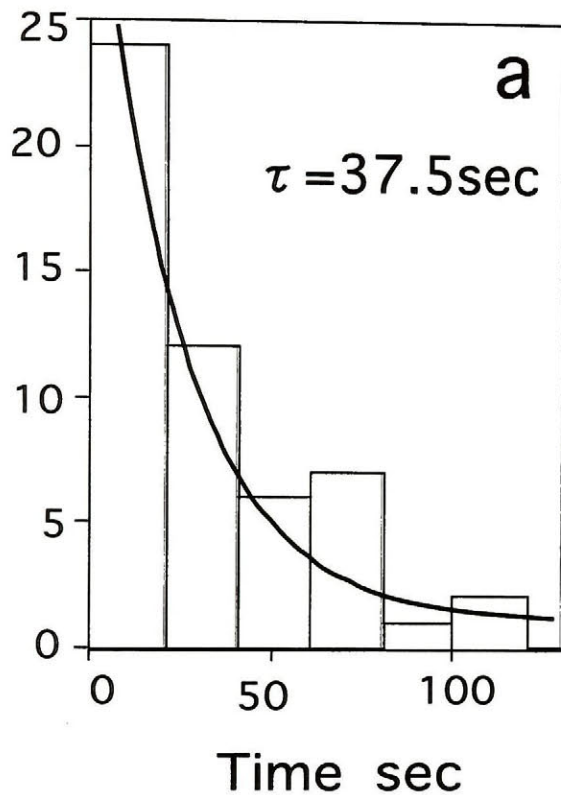


図24 退色過程の時定数決定

GTF-TMR (a) および T500-TMR (b) の蛍光スポットが点灯している時間を測定しヒストグラムとした。1次反応プロットより、退色過程の時定数 (τ) を決定した。退色が起こる時間は、GTF/デキストラン相互作用 (~百ミリ秒) よりも十分長い。

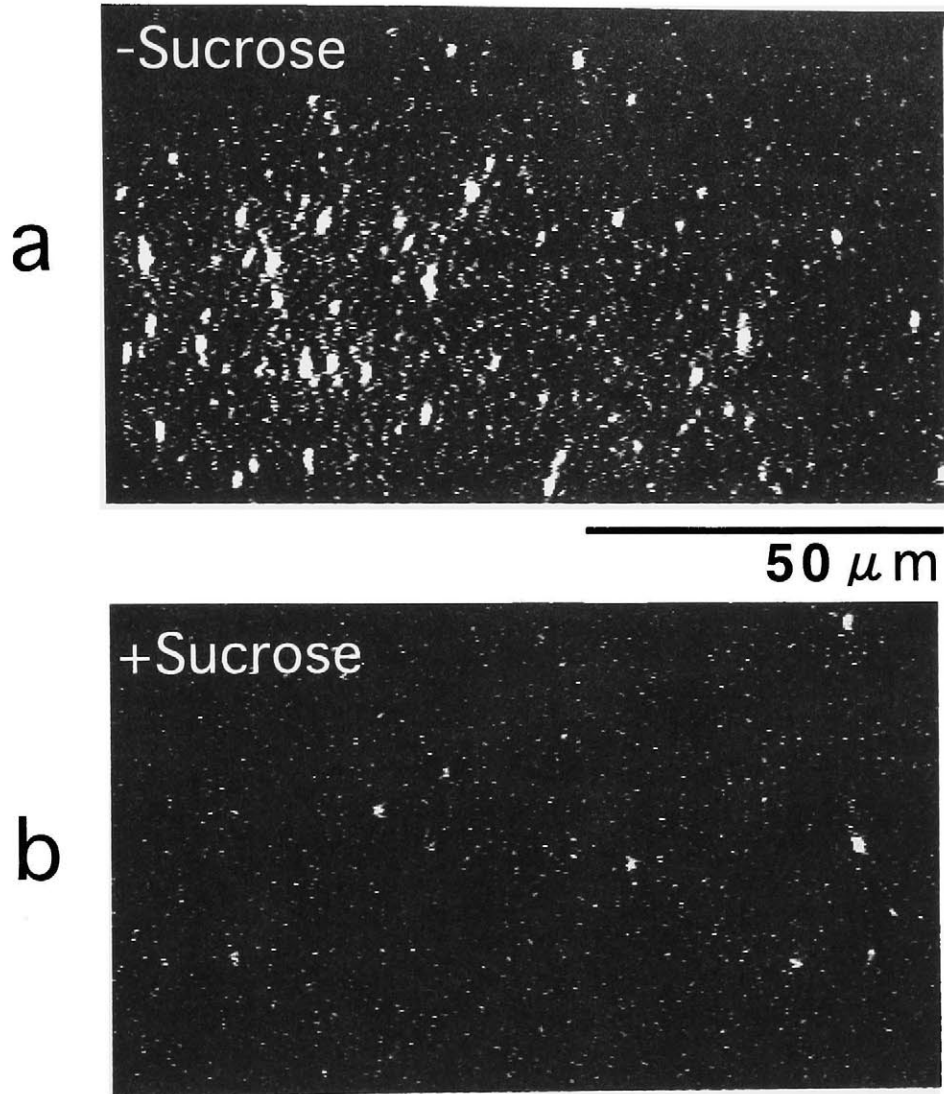


図25デキストランの1分子イメージング

GTFを固定化したチャンバーにT500-TMRを加えた(図13a)。蛍光スポットには、長時間(~分)点灯しているものと、短時間(~百ミリ秒)点灯しているものがあった。ショ糖非存在下では、長時間点灯するスポットが大半を占めていたのに対し、ショ糖存在下では、短時間点灯するスポットが大半であった。

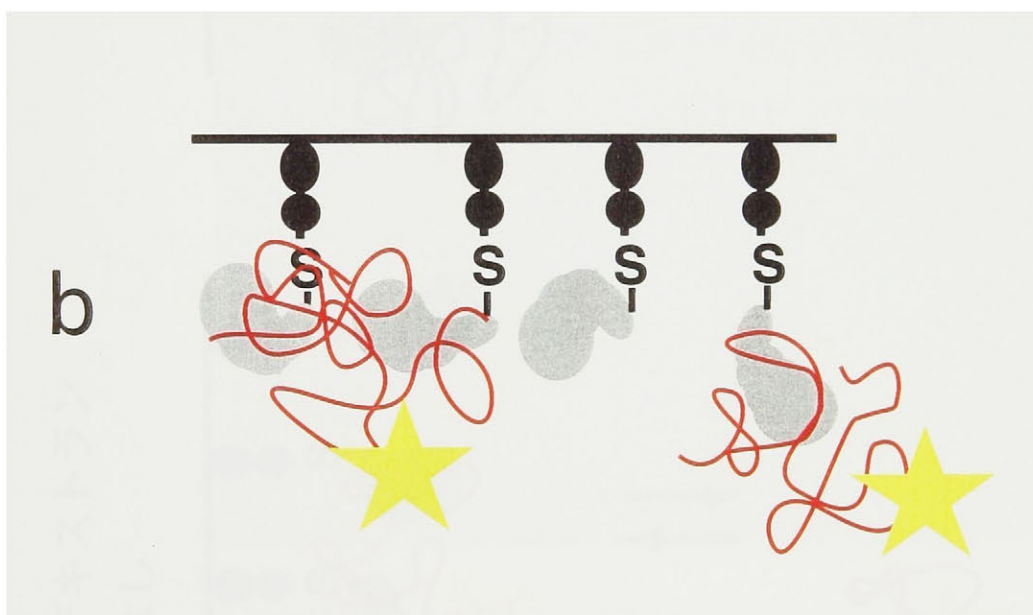
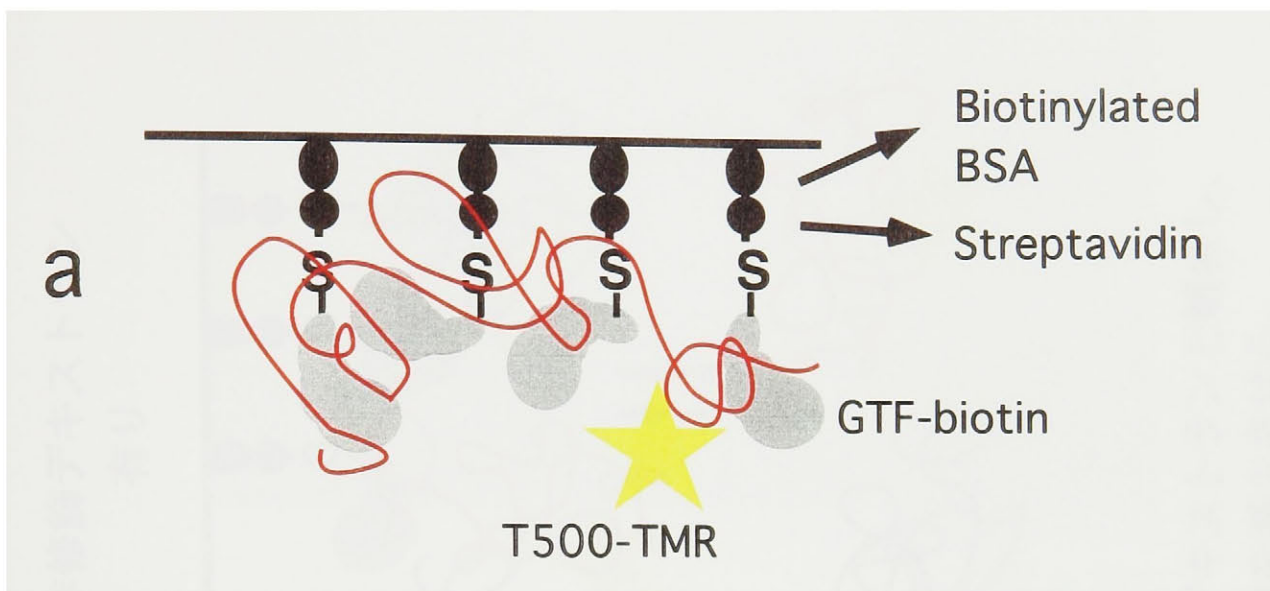


図26 デキストラン1分子イメージングの解釈

長時間（～分）連続的に観察される蛍光スポットは、ガラス表面下の多くのGTFと相互作用しているデキストランを反映し(a)、短時間（～百ミリ秒）点灯するスポットはより少ないGTFと相互作用しているものを反映していると思われる(b)。

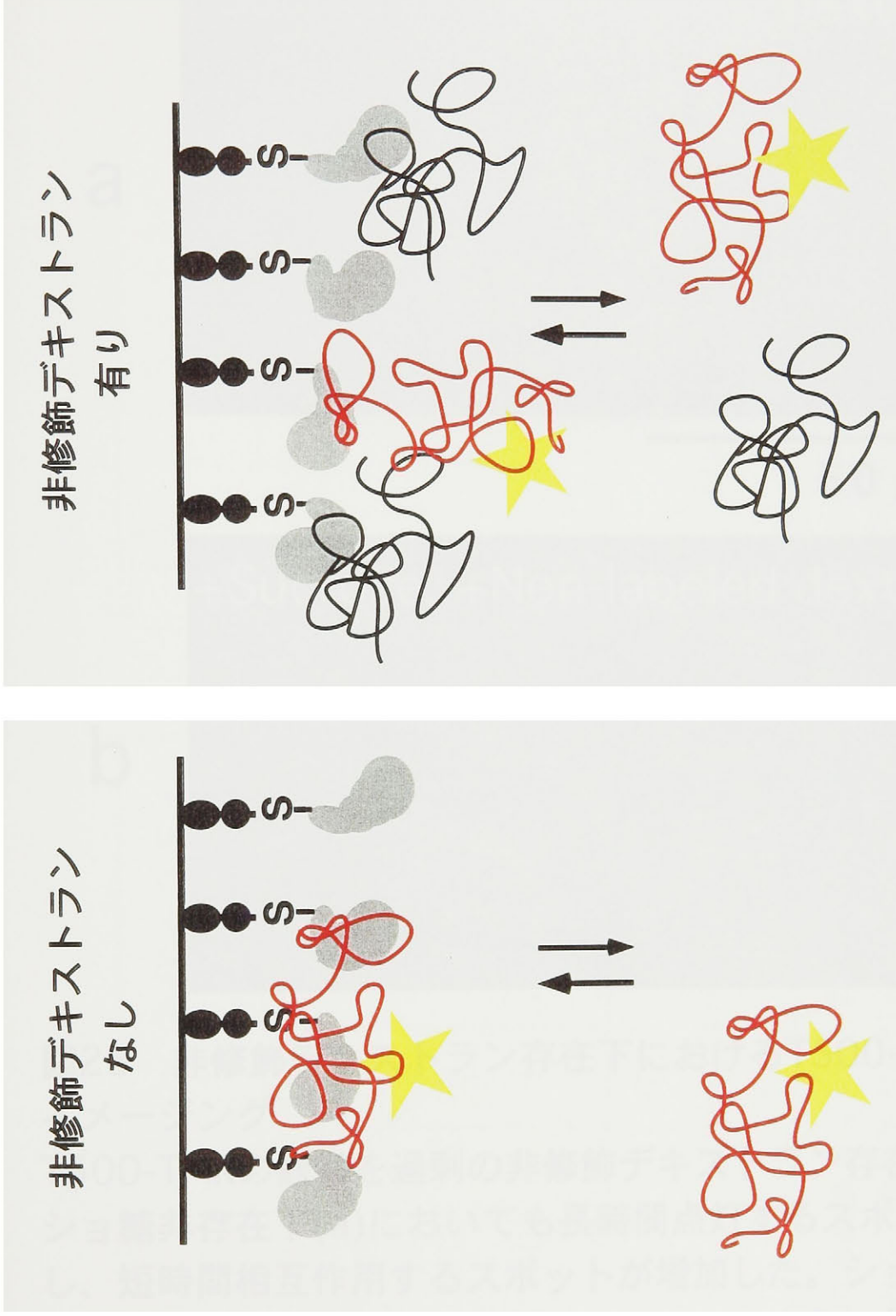


図27 非修飾デキストランの効果
 非修飾デキストランは、蛍光標識デキストランと競合し、
 長時間滞在する標識デキストラン数を減少させる。

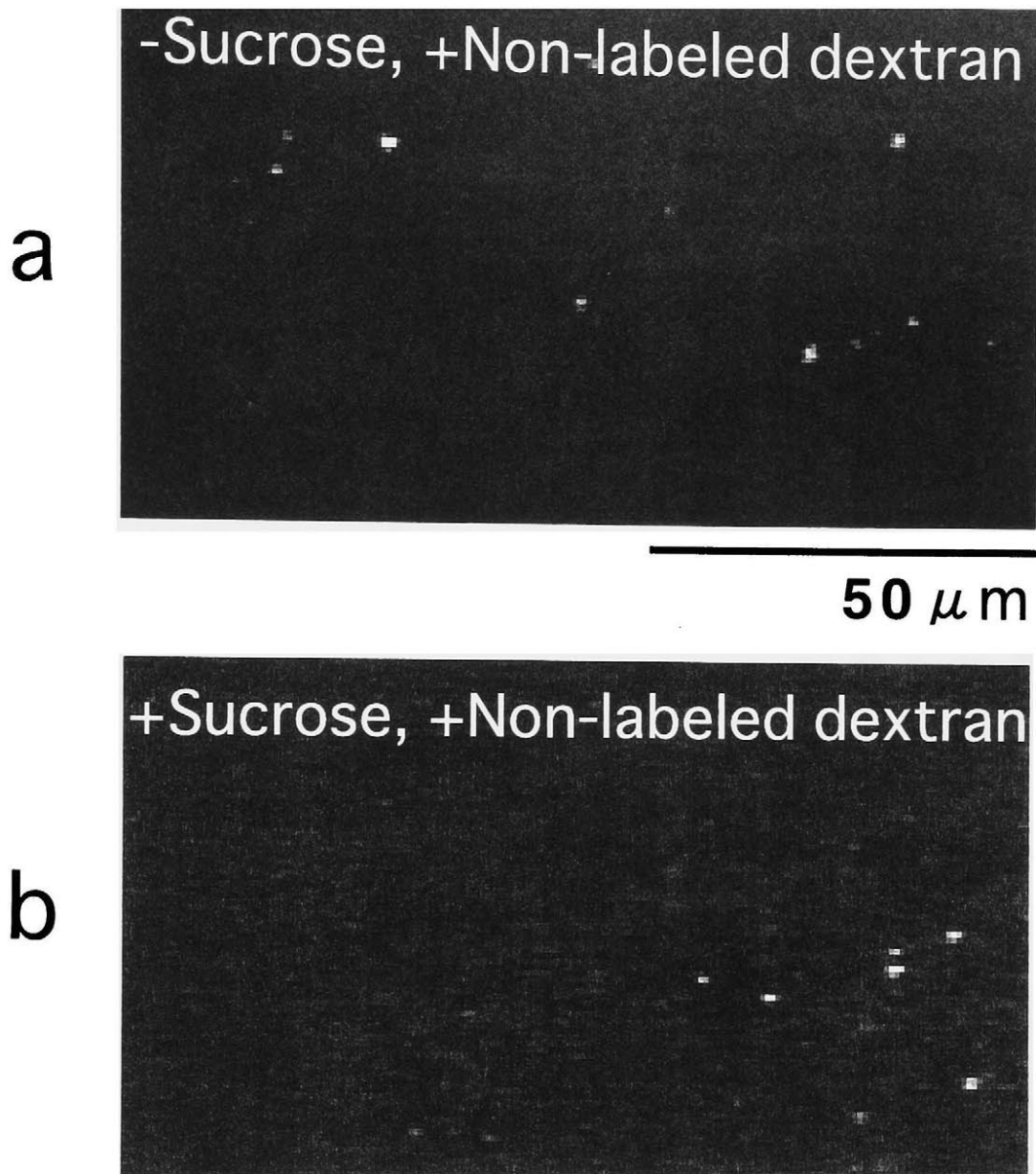


図28 非修飾デキストラン存在下におけるT500-TMR
イメージング
T500-TMRの観察を過剰の非修飾デキストラン存在下で行った。
ショ糖非存在下(a)においても長時間点灯するスポット数は減少
し、短時間相互作用するスポットが増加した。ショ糖存在下(b)
では、スポットの滞在時間が短くなっているように見えた。

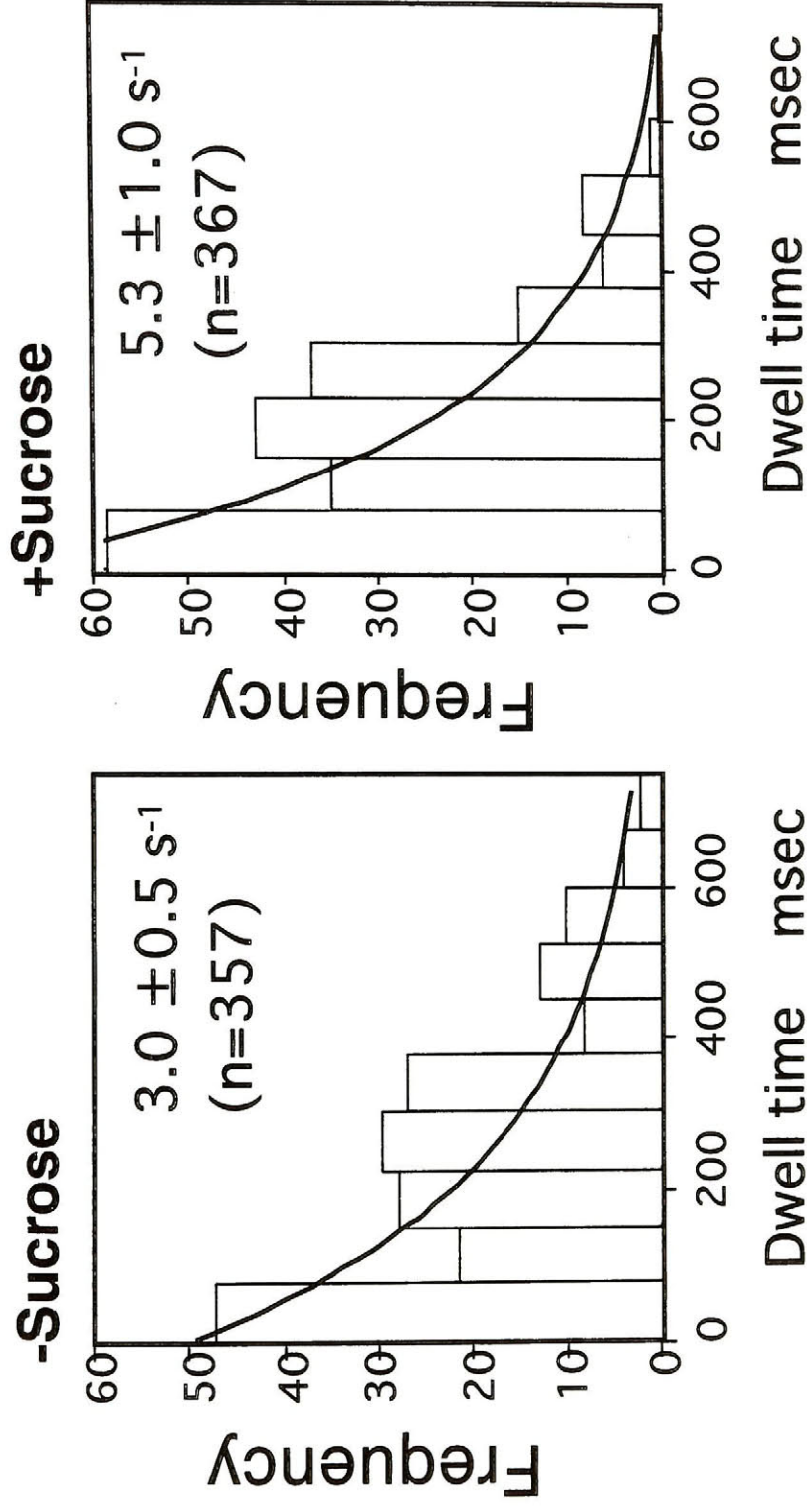


図29 デキストラン1分子イメージングから求めた解離速度定数
 過剰の非修飾デキストラン存在下で、標識デキストランの解離速度定数を決定した。蛍光スポットがガラス表面下で点灯している時間(Dwell time)をビデオのコマ送りでカウントし、ヒストグラムを作成した。1次反応プロットより解離速度定数を算出した(括弧内は、測定数を示している)。シヨ糖存在下における親和性低下の一部は、解離速度定数の増加によりことが判明した。

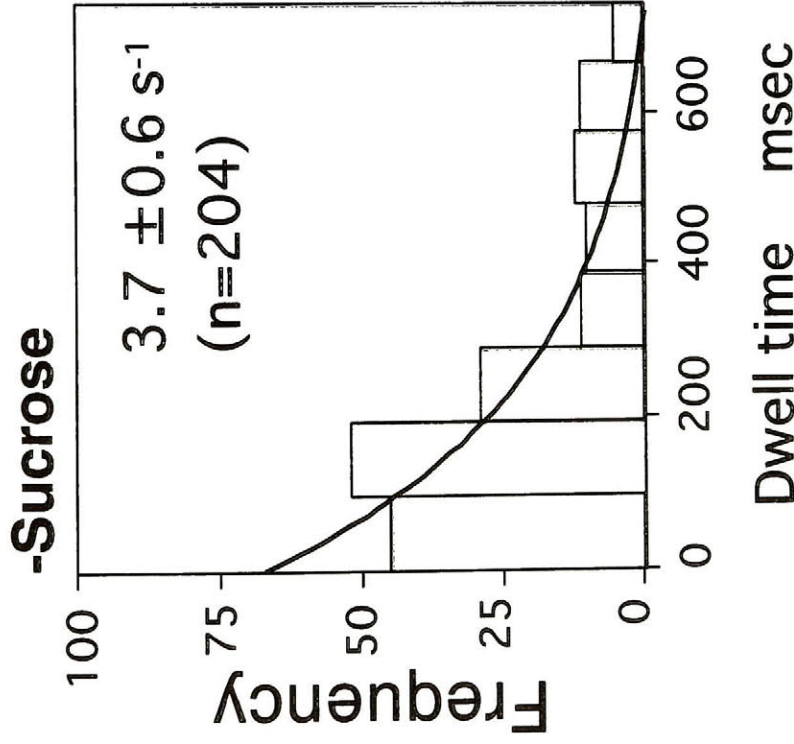
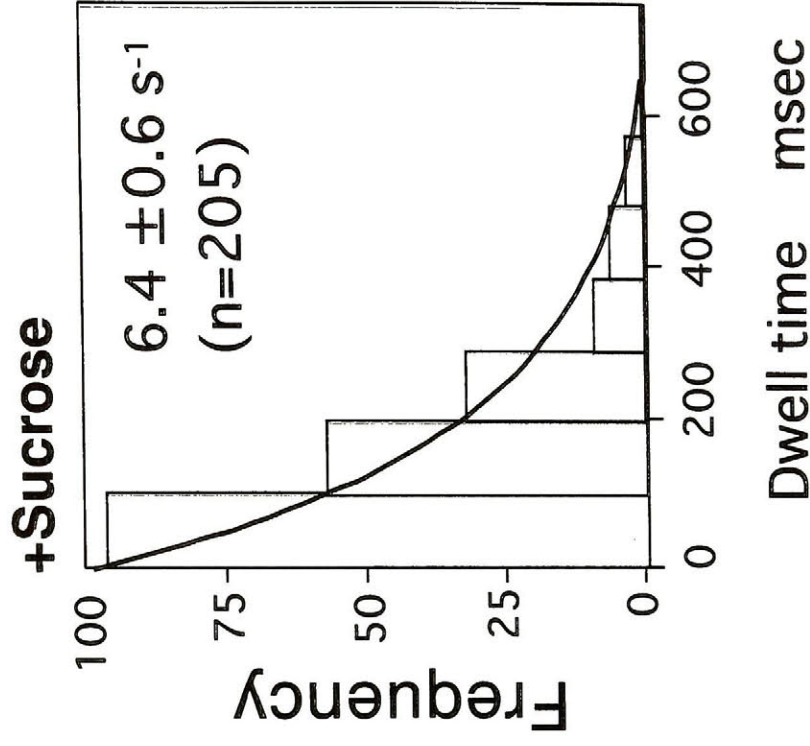


図30 デキストラン1分子イメージングから求めた解離速度定数
 非修飾デキストラン非存在下で、標識デキストランの解離速度定数を決定した。非修飾デキストラン
 存在下で測定した解離速度定数と有意差は認められなかった。

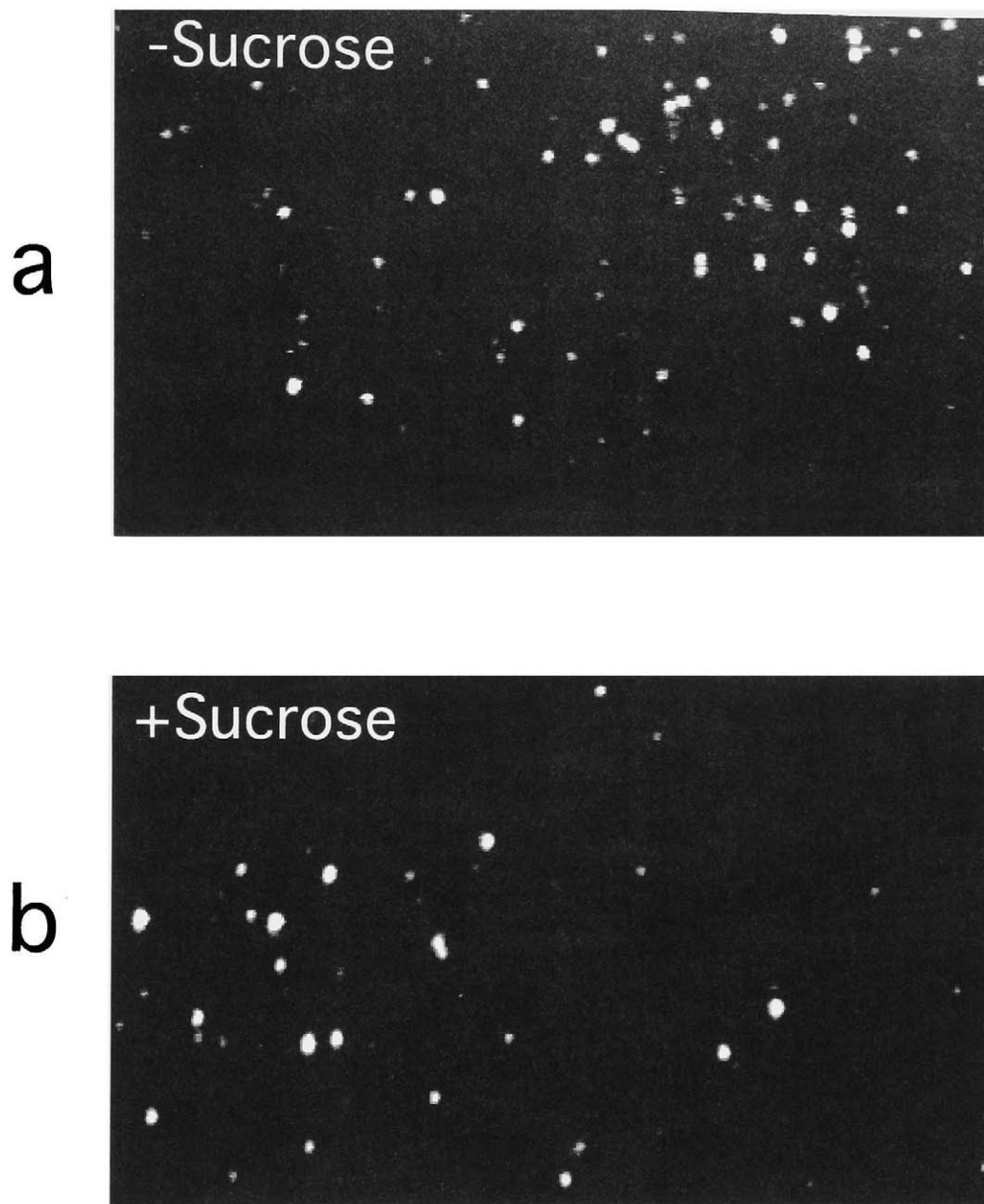


図31 GTFの1分子イメージング

デキストランを固定化したチャンバーにGTF-TMRを加えた(図13b)。シヨ糖の有無に関わらず、大半のスポットは短い時間点灯した。シヨ糖存在下では、1視野に観察されるスポット数は減少した。

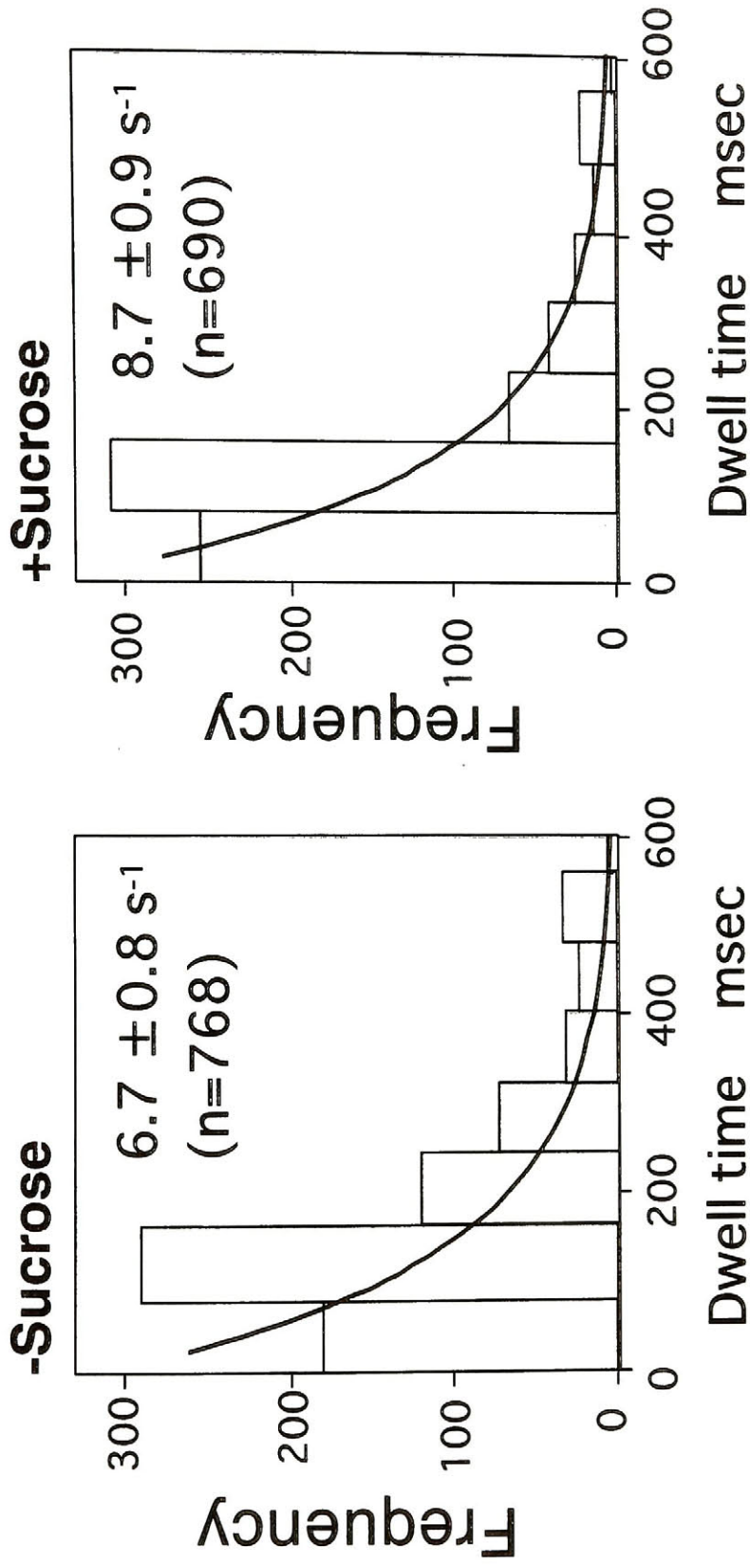


図32 GTF1分子イメージングから求めた解離速度定数
 蛍光標識GTFの解離速度定数を決定した。蛍光スポットがガラス表面下に滞在している時間
 を求めた。GTFを観察した場合も、シヨ存在下で解離速度定数の増加が認められた。図29と
 比べて速度定数が大きいのは、デキストラン観察のでは、数分子のGTFとの相互作用を反映し
 ている可能性が考えられる（デキストランT500は、200分子のGTFと相互作用が可能である）。

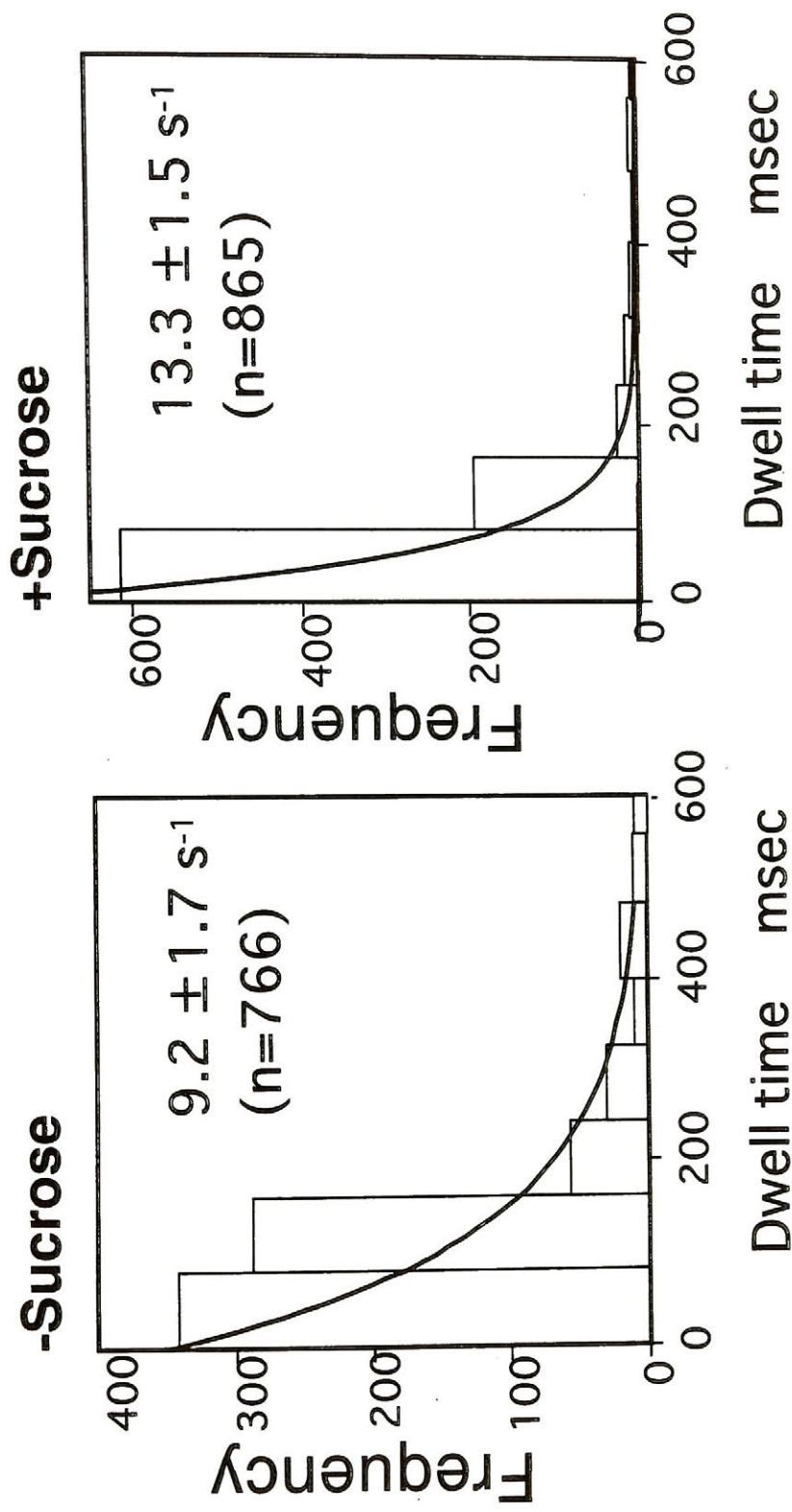


図33 非修飾GTF存在下のGTF分子イメージングから求めた解離速度定数
 大過剰の非修飾GTF存在下で蛍光標識GTFの解離速度定数を決定した。
 図32と比べて、大きな速度定数を得た。

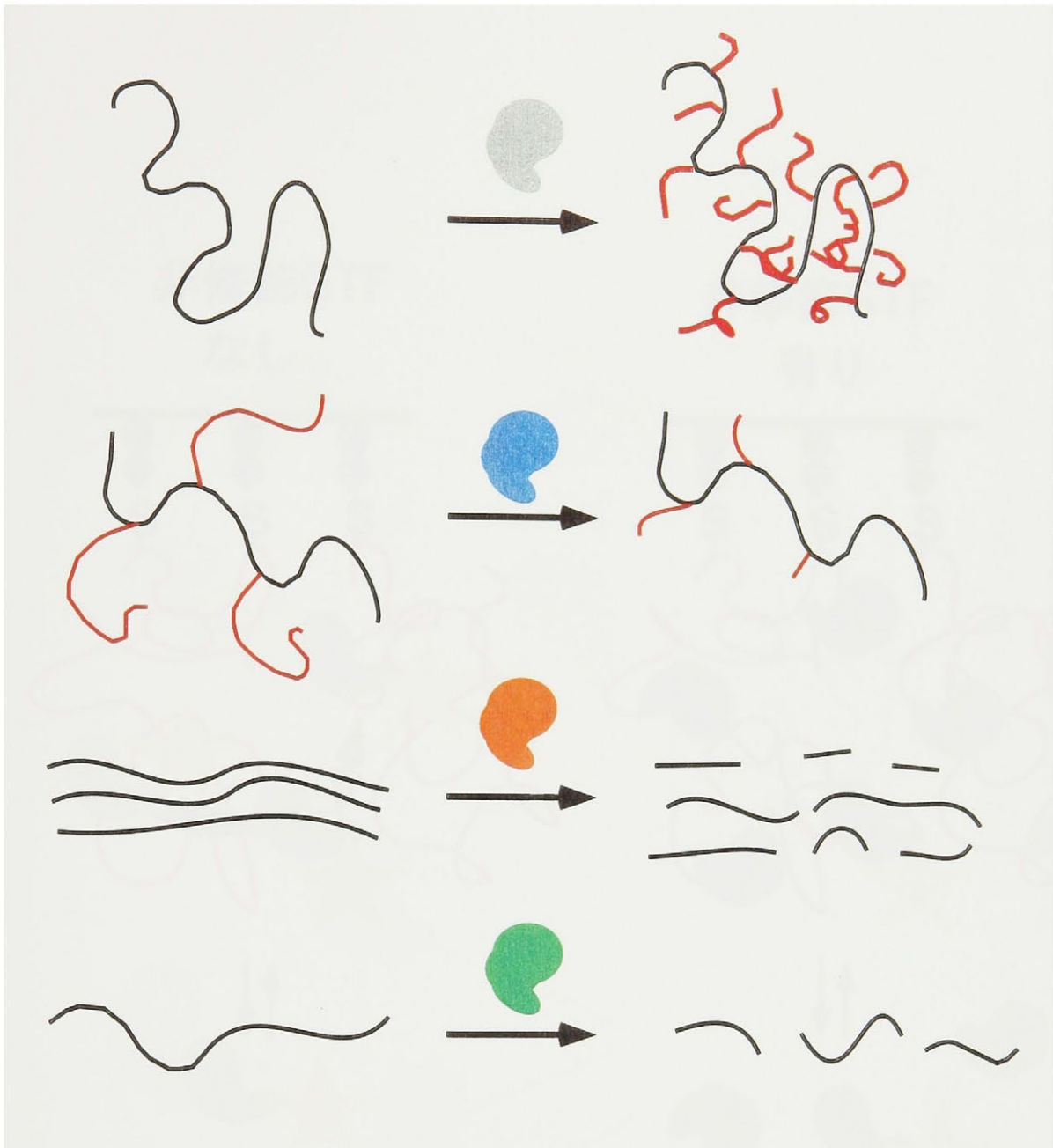


図34 様々な糖鎖反応

糖鎖が修飾される酵素反応の定量的な解析は困難である。

GTF/デキストラン系で開発した1分子システムは、これらの糖鎖関連反応に応用できる。

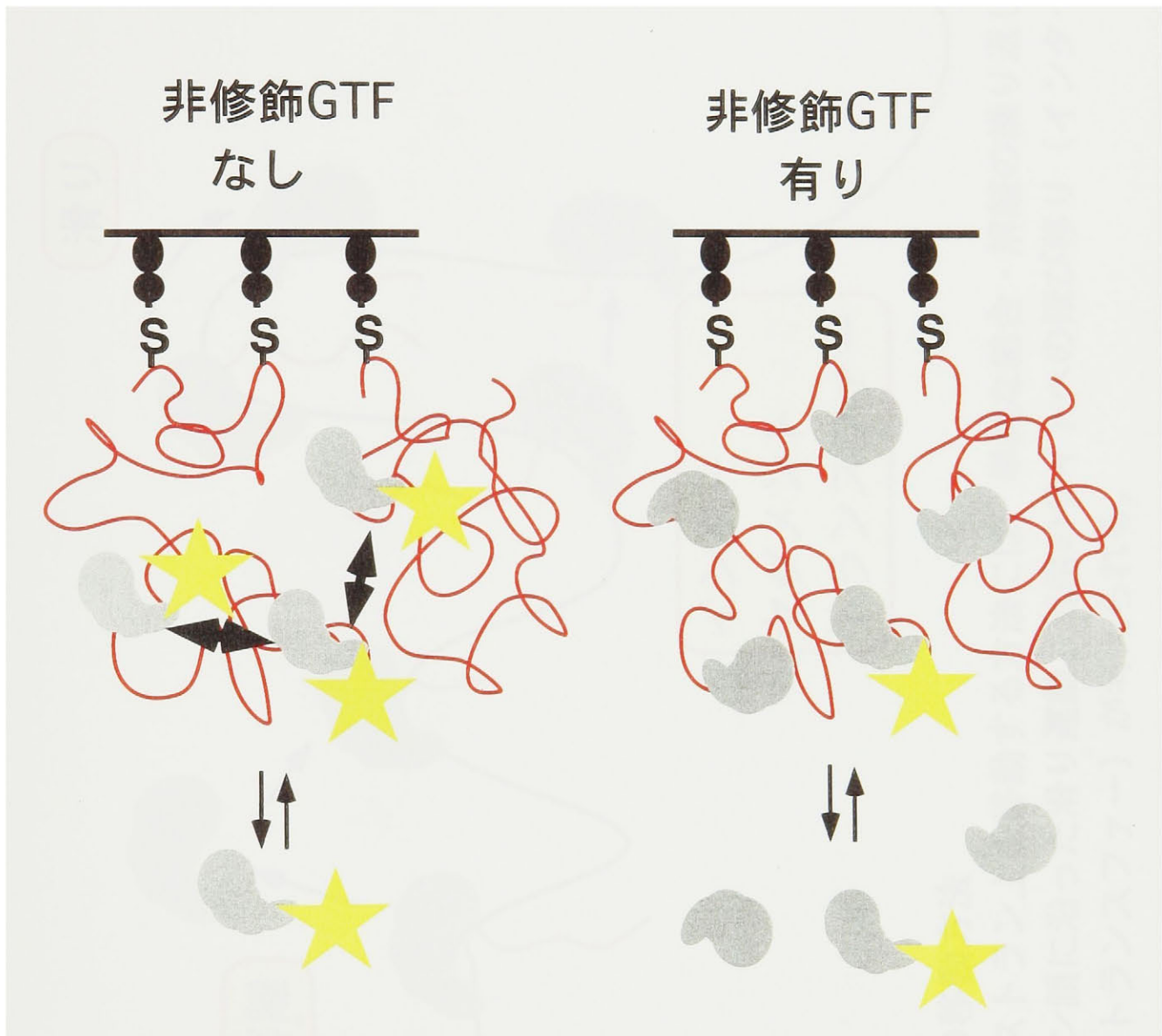


図35 非修飾GTFの効果

非修飾GTF存在下では、デキストラン上の近接した結合部位への移動の割合が減少するために、GTFの解離速度が大きくなる。

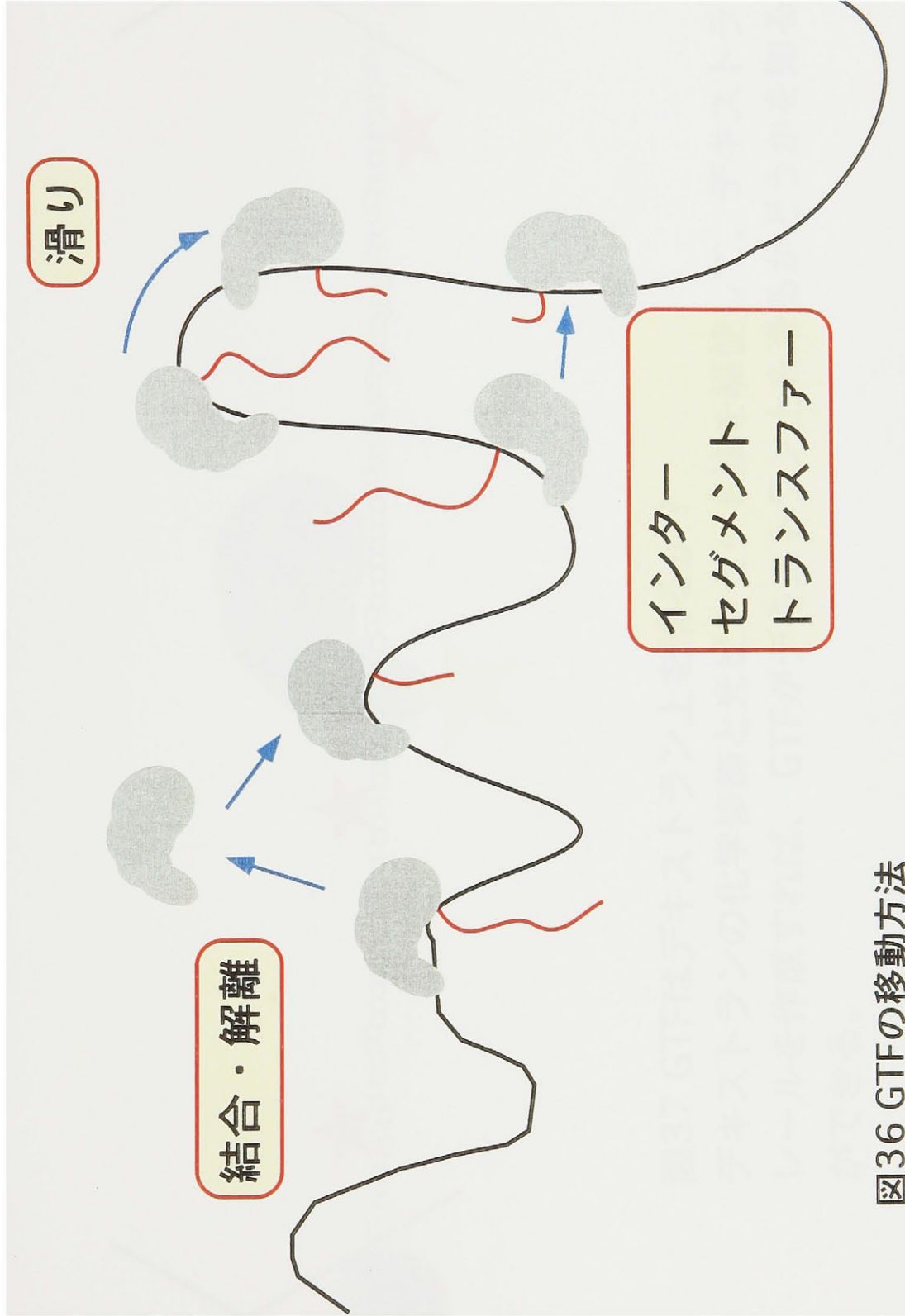


図36 GTFの移動方法

GTFがデキストラン上を移動する方法には、単純な結合・解離の繰り返し、デキストラン鎖に沿った滑り運動、近傍のサイトへの飛び移り（インターセグメントトランスファー）が考えられる。

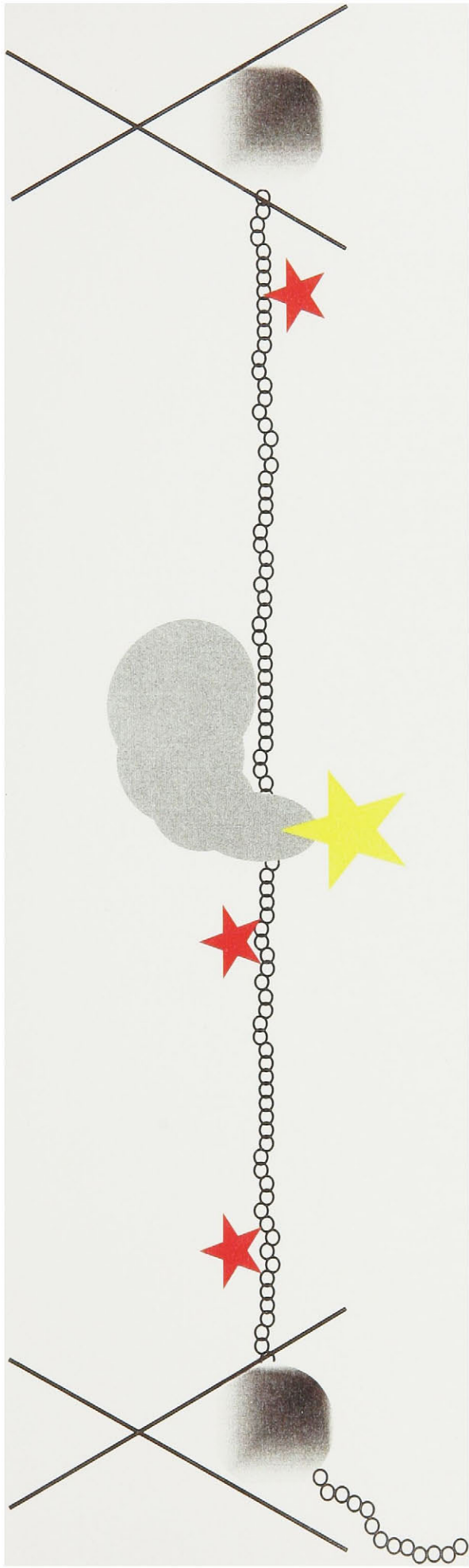


図37 GTFはデキストラン上を滑るか？
デキストランの化学修飾と光ピンセット法を駆使して、デキストランの
レールを作成すれば、GTFがデキストランを滑るかどうかがわかること
ができる。