

マイクロ秒分解一分子蛍光分光法による タンパク質フォールディングダイナミクス

¹東北大学・多元物質科学研究所

○高橋聡¹, 齋藤雅嵩¹, 小井川浩之¹

Dynamics of protein folding studied by single molecule fluorescence measurements at microsecond resolution

¹*Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University*
Satoshi Takahashi¹, Masataka Saito¹, Hiroyuki Oikawa¹

Proteins are natural heteropolymers that can form a specific native structure from the unfolded state composed of rapidly fluctuating random polypeptides. To understand the molecular mechanism of protein folding, we developed a line confocal method of single molecule fluorescence spectroscopy that can trace the time evolution of FRET efficiency with the time resolution of 100 μ s. We detected significant heterogeneity in the unfolded state conformations of the B domain of protein A and ubiquitin, likely reflecting the pseudo-stable local structures in the unfolded proteins. We will discuss our recent trials to improve the time resolution of single molecule fluorescence detection aiming at the direct tracking of the folding transition path events.

タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合により連結した高分子鎖であり、無数の構造を持つ変性状態から、唯一の構造を持つ折り畳まれた状態にフォールディングする能力をもつ。タンパク質フォールディングの分子機構を理解することは、タンパク質の構造予測やデザインなどに資すると期待される。しかし、タンパク質の物性には未解明の部分が多く残されており、フォールディング機構の理解を妨げている。特に、変性タンパク質の運動特性や構造特性について、互いに矛盾するデータが報告されコンセンサスが得られない状況が続いている[1]。変性したタンパク質の構造特性を、個々の分子ごとに、正確に測定することが求められている。

我々は、蛍光一分子分光法を用いることで、タンパク質のフォールディング運動の解明に取り組んできた。タンパク質にドナーとアクセプターとなる二つの蛍光色素をラベルし、色素間の励起状態移動の効率 (FRET 効率) を一分子レベルで見積もることで、色素間距離を推定することができる。共焦点顕微鏡を用いた従来法では、一分子蛍光測定的时间分解能は数ミリ秒程度であった。我々はライン共焦点顕微鏡という独自の計測方法を提案し、一分子蛍光測定的时间分解能を数十マイクロ秒にまで短縮することに成功した[2]。さらに、この手法では単位時間内に多数の蛍光光子を単一の色素から検出することを可能にするため、FRET 効率の測定精度も劇的に向上させることが可能である。従って、ライン共焦点顕微鏡を用いることで、従来法では解明が難しかった変性タンパク質における構造、揺らぎ運動の時定数、さらに、不均一性等について知見が得られると期待される。

ライン共焦点顕微鏡を用いることで、ユビキチンの変性状態について得られた一分子蛍光測定の結果を説明する[3]。76 残基長のユビキチンの 1 番目と 65 番目のアミノ

酸に、異なる蛍光色素をラベルした。この試料を変性剤濃度の異なる溶液として準備し、色素間の FRET 効率を測定した。変性剤濃度が低い場合には、効率 0.8 付近に折り畳まれた状態に帰属できるピークが観察された。このピークの線幅は狭く、構造が均一であることが示された。一方で、変性剤濃度が高い場合には、FRET 効率が 0.4 から 0.6 にわたる幅広いピークが観察された。このピークは変性状態に帰属できるが、データを 1ms の時間幅で平均化した後においても、単一構造を仮定した場合のノイズ幅よりも明らかに広がった。この事実は、ユビキチンの変性状態において構造の不均一性が存在すること、さらに、不均一な構造間の転移がミリ秒以上のゆっくりした時定数で起きることを示している。

変性状態のタンパク質における不均一性とゆっくりした構造揺らぎは、プロテイン A の B ドメインにおいても観察された[4]。また、他のタンパク質についても類似した現象が示唆されている。一方で、変性したタンパク質において、非常に速い構造の交換が起きることも確立された観察事実である。例えば、幾つものタンパク質における蛍光相関分光法による観測結果は、タンパク質にラベル化した色素間の距離が数十ナノ秒の時間領域で揺らぐことを示している。

蛍光相関分光法で示された速い構造揺らぎと、我々のグループにより示されたミリ秒よりも長い寿命を持つ構造の不均一性を説明するために、我々は以下の仮説を考えている。変性したタンパク質の主鎖の収縮と伸張を伴う大規模な運動は、蛍光相関分光法で観察されたように、マイクロ秒以下の短い時定数で起きる。一方で、ペプチド鎖の局所的な構造の寿命は長く、蛍光色素をラベル化したアミノ酸周辺における構造の不均一性を引き起こす。これにより、我々が観察した遅い揺らぎが生じる。ミリ秒以上もの寿命をもつ局所構造が存在するならば、この構造はタンパク質フォールディングに大きな寄与を持つはずである。

現在、我々の仮説を確かめるために、比較的単純な配列を持つペプチド鎖における一分子蛍光測定を進めている。さらに、タンパク質フォールディングの遷移状態を直接観察するために、実験装置の時間分解能をさらに向上させる試みを続けている。また、一分子蛍光観察装置と溶液混合装置を組み合わせることで、非平衡条件におけるフォールディング過程の観察も進めている。これらの試みについても報告する。

【参考文献】

- [1] Takahashi, S.; Kamagata, K.; Oikawa, H., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *36*, 1–9.
- [2] Oikawa, H., Suzuki, Y., Saito, M., Kamagata, K., Arai, M., Takahashi, S., *Sci. Rep.* **3**, 2151 (2013).
- [3] Saito, M., Kamonprasertsuk, S., Suzuki, S., Nanatani, K., Oikawa, H., Kushiro, K., Takai, M., Chen, P.-T., Chen, E. H.-L. Chen, R. P.-Y., Takahashi, S., *J. Phys. Chem. B* **120**, 8818–8829 (2016).
- [4] Oikawa, H., Kamagata, K., Arai, M., Takahashi, S., *J. Phys. Chem. B* **119**, 6081–6091 (2015).