

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17608

研究課題名(和文) 一分子蛍光測定によるタンパク質折り畳み遷移経路の追跡

研究課題名(英文) Tracking of protein folding transition path by single-molecule fluorescence measurements

研究代表者

小井川 浩之(Oikawa, Hiroyuki)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：40536778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：一分子蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)測定によりタンパク質の折り畳みの際の遷移経路を追跡することを目指した。これまで開発してきたライン共焦点光学系とマイクロ流路を組み合わせた装置は時間分解能が不十分であった。そこでハイブリッド光検出器を導入し、時間分解能を劇的に改善した。装置評価のため二重蛍光標識した分子モーターF1-ATPaseの構造変化追跡を試みた。10マイクロ秒分解能で10ミリ秒の長さの一分子FRET効率時系列が得られた。残念ながらATP加水分解に伴うF1-ATPaseの速いFRET効率変化はとらえられなかったが、生体高分子構造変化の遷移経路を追跡可能な一分子測定手法が確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質などの生体高分子は機能発現時に多くの場合立体構造が変化し、構造変化時にたどる遷移経路は酵素反応や分子生物学的過程と深く関わる。遷移経路の理解は、タンパク質が関わる疾病の治療や、人工タンパク質の創製などに有益であり、社会的に重要である。近年、分子動力学計算によって、計算機では生体分子の構造転移を追跡できるようになったが、実験的手法はほとんどない。本研究で開発した一分子の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効率を10マイクロ秒分解能で追跡する手法はその有力な候補である。この手法は広範な生体高分子の構造変化の遷移経路追跡に適用可能であるため、学術的にも重要である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to track transition paths on protein folding events by single-molecule fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements. The time resolution of our existing line-confocal microscope combined with microfluidic chip was insufficient for tracking the transition events. To improve the time resolution, we built a new system based on hybrid photo detectors (HPD). By introducing HPD to the line-confocal microscope, we could obtain the single-molecule FRET traces with the time resolution of ten microsecond and the observation time of more than ten millisecond. As the target for the tracking of the transition path by using the new system, we tried to observe the fast conformational changes of F1-ATPase induced by the ATP hydrolysis. Unfortunately, although the conformational changes of F1-ATPase could not be observed, the method of single-molecule fluorescence measurement for tracking transition paths of biopolymer conformational changes was established.

研究分野：生物物理

キーワード：タンパク質 フォールディング 遷移経路 一分子蛍光測定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質や核酸などの生体高分子が生体中で様々な機能を持ち、機能発現時には多くの場合立体構造が変化する。本研究の対象は、この生体分子の構造変化の最中にたどる遷移経路である。本研究では特にタンパク質の折り畳み構造転移の際の遷移経路に注目した。多くのタンパク質は条件が整っていれば、ほどけた変性状態から、自発的に折り畳まれる。一般に、100 アミノ酸残基程度の比較的小さなタンパク質の折り畳み過程は、折り畳んだ状態とほどけた変性状態の二つの構造状態があり、その状態間にはエネルギー障壁があるという単純なモデルで表現できることが知られている。このモデルで考えると遷移経路は、エネルギー障壁を越える際の経路である。複雑な高分子であるタンパク質の折り畳みが、なぜこのような単純なモデルで表現でき、比較的短い時間で正確に進行するのは未解決の問題であるが、その問題の解決を難しくしている原因の一つは、遷移経路の観測が困難なためである。つまり遷移経路についての情報を得ることができれば、タンパク質の折り畳みを本質的に理解することにつながる。

比較的短い時間でタンパク質が折り畳むといっても、ミリ秒から秒以上の時間が必要であるのに対して、折り畳み構造転移における遷移経路通過時間はミリ秒より短い時間である。つまり、遷移経路通過は非常に稀なイベントであり観測が難しい。しかし、近年、高性能の分子動力学(MD)専用計算機の開発によって、これまでは困難であったミリ秒間以上のタンパク質の全原子 MD シミュレーションが可能になり、計算機の中では折り畳み過程を追跡することが可能になってきている。この計算結果には遷移経路の情報が含まれているが、長時間 MD 計算と直接比較できる実験的手法は現状ほとんどない。その実験的手法で最も有力な候補が、二種類の蛍光色素でラベルしたタンパク質分子に対して一分子蛍光測定を行い、色素間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効率を追跡する方法である。

しかし、一分子 FRET 測定には、単位時間あたりに一分子から得られる蛍光光子数によって時間分解能が制限されるという致命的問題がある。MD 計算から得られている遷移経路通過時間は数十マイクロ秒より短い、既存の実験手法では、1 マイクロ秒当たり 1 光子以下しか検出することができず、ミリ秒の時間分解能が限界であった。我々は本研究以前に独自の方法で一分子からの蛍光光子を増やすことに成功し、100 マイクロ秒の分解能で一分子の FRET 効率を追跡できる装置を開発した。

以上のように、計算機の高性能化と、一分子蛍光測定の高感度化、高時間分解能化により、生体高分子の構造変化の遷移経路を観測することが、実験と計算の両方で現実的なものとなってきている。

2. 研究の目的

長時間分子動力学(MD)計算によって遷移経路の探索が計算機上では可能になったが、実験的な遷移経路観測は難しかった。そこで本研究では時間分解能が 10 マイクロ秒以下、一分子を追跡できる時間を 20 ミリ秒以上である一分子 FRET 測定装置を開発し、二重蛍光標識されたタンパク質の溶液中での構造変化追跡を目指した。さらに MD 計算の結果と比較し、タンパク質折り畳み構造転移の遷移経路の詳細に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質にラベルされた蛍光色素からより多くの蛍光光子を得るために、マイクロ流路フローセル中に試料溶液を連続して導入する方法を考案した。溶液中の溶存酸素はどんな添加剤よりも強力な蛍光色素の励起三重項状態の消去剤になる反面、溶存酸素から生じる活性酸素は蛍光色素を光退色させる原因にもなる。そこで、試料溶液を常に置換し続けることで、活性酸素や、光退色した分子の濃度上昇を抑える。そうすることで、高強度のレーザーで蛍光色素を励起することが可能になり、より多くの蛍光光子を取り出せる。

この手法と組み合わせるために私達が開発した高時間分解能一分子 FRET 測定装置がライン共焦点顕微鏡である。この装置は共焦点顕微鏡の光学配置を参考にして設計した。照明光路の途中にシリンドリカルレンズを配置されているため、対物レンズの焦点でライン状の照明領域が形成される。この焦点に、石英製のマイクロ流路チップを配置し、希薄な試料溶液を連続して導入し続け、照明領域を通過する分子からの蛍光を検出する。検出光学系には背景光を除去するスリットと、蛍光分光のためにダイクロイックミラーを配置した。これによって二種の蛍光色素で標識されたタンパク質分子の FRET 効率を追跡できる。本研究ではこの装置を再設計し、大幅な性能向上を目指した。

装置の第一の改良点は時間分解能の改善のための検出器の変更である。私達の既存の研究では、検出器として電子増倍高型 CCD カメラを用いた。蛍光一分子が流路中を流れる時の軌跡を撮影し、CCD の 1 画素当たりに入射した光子数を後から読み出すことで蛍光光子数の時間変化を追跡した。この方法では、溶液の流速を上げることでしか時間分解能が向上しないが、流速を上げると一分子あたりの観察時間が短くなってしまいうため、遷移経路観測には向いていなかった。そこで、CCD の代わりにハイブリッド光検出器(HPD)を用いた。HPD はリアルタイムの一光子計数が可能な高感度光検出器であるため、光子数読み出し処理と試料の流速の制限を受けずに時間分解能の改善が見込める。HPD は高感度アバランシェフォトダイオードよりも受光面積が大きいので、カメラを置換するのにも都合が良かった。

第二の改良点は、一分子あたりの観測時間を伸ばすための、流路系全体の改良である。観測

時間を伸ばすためには試料溶液を導入する流量を下げれば良いが、現状の流路系では毎分 30 ナノリットル以下の極小流量での導入が必要になる。流量が少なくなればなるほど、流路に残った微小な気泡や気圧の変動によって安定した流れを作るのが難しくなる。そこで、気泡を除去しやすくするために、流路系全体の低デッドボリューム化を行った。また微弱な圧力変動の影響を受けにくくするため、フローセルの断面積や長さを見直して、フローセルの配管抵抗を調節し、低流量への最適化を行った。

新しい装置の評価をするために、分子モータータンパク質 F_1 -ATPase の ATP 加水分解にともなう構造変化の遷移経路を追跡することを目指した。 F_1 -ATPase の と サブユニットは ATP の結合と加水分解にともなって、closed 型と open 型の間を構造変化する。新しい装置にとって都合が良いことに、ATP 高濃度条件で F_1 -ATPase は、ATP を数ミリ秒の時定数で加水分解する。サブユニットに L398C の変異が導入された thermophilic Bacillus 由来の F_1 -ATPase の³ 複合体にドナーとアクセプターの蛍光色素を二重標識し、1 mM ATP 存在下で蛍光色素間の FRET 効率変化を追跡した。

4. 研究成果

(1) 一分子蛍光 FRET 測定に装置の改良と性能評価を行った。まず、検出器をこれまでの電子増倍型 CCD カメラから HPD に変更した。しかし、検出器の変更によって結果的に背景光の影響が大きくなってしまった。そこで、一分子からの蛍光の検出を阻害せずに背景光を除去することができる最適な検出スリット幅を実験によって調べ、10 μm と決定した。

また、高頻度で検出器に到達する光子をもれなく数え上げるためには、高速で光子計数を行うカウンターが不可欠である。そこで、安価な汎用カウンター、時間相関一光子カウンター、800 MHz 光子カウンターの三種類の光子計数システム用意し、HPD からの信号をカウントし評価した。800 MHz 光子カウンターだけが、10000 カウント/ms 以上の光子計数においても線形性が保たれており、HPD とともにこのカウンターを用いれば、十分高速な光子計数が可能であることが分かった。新装置で二重蛍光標識されたプロテイン A の B ドメイン (BdpA) の一分子 FRET 測定を試みた。その結果、10 マイクロ秒時間分解能で 10 ミリ秒程度の長さの一分子 FRET 効率時系列が得ることに成功し、新装置が十分な性能を持つことを確認できた。

(2) 装置の性能評価も兼ねて二重蛍光標識した分子モーター F_1 -ATPase 一分子の回転に伴う構造変化追跡を試みた。BdpA の場合と同様に 10 マイクロ秒時間分解能で 10 ミリ秒以上の長さの一分子 FRET 効率時系列が得られた。構造変化が速い ATP 存在条件と遅い ATP S 存在条件では FRET 効率の出現頻度分布に違いが見られたが、当初期待していた ATP 存在下での構造変化に相当する速い FRET 効率変化はとらえられなかった。現段階でこの結果を解釈することは難しいが、チオリン酸とリン酸では、 F_1 -ATPase から解離するタイミングの違いが見えている可能性がある。

本研究によって生体高分子構造変化の遷移経路を追跡可能な一分子蛍光測定手法が確立できたため、今後様々な試料に対して分子動力学計算と比較できる実験が可能であると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Hiroyuki Oikawa, Takumi Takahashi, Supawich Kamonprasertsukac, Satoshi Takahashi, Microsecond resolved single-molecule FRET time series measurements based on the line confocal optical system combined with hybrid photodetectors, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 査読有, Vol.20, 2018, pp.3277-3285, DOI: 10.1039/C7CP06268K
Satoshi Takahashi, Aya Yoshida, Hiroyuki Oikawa, Hypothesis: structural heterogeneity of the unfolded proteins originating from the coupling of the local clusters and the long-range distance distribution, *Biophysical Reviews*, 査読有, Vol.10, 2018, pp.363-373, DOI: 10.1007/s12551-018-0405-8
Takuhiro Otosu, Kunihiko Ishii, Hiroyuki Oikawa, Munehito Arai, Satoshi Takahashi, Tahei Tahara, Highly Heterogeneous Nature of the Native and Unfolded States of the B Domain of Protein A Revealed by Two-Dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, Vol.121, 2017, pp.5463-5473, DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b00546

[学会発表](計 9 件)

Satoshi Takahashi, Hiroyuki Oikawa, Single molecule fluorescence tracking at 10- μs resolution: Application to protein folding and functional dynamics, 第 56 回日本生物物理学会年会 (招待講演), 2018 年
Supawich Kamonprasertsuk, Hiroyuki Oikawa, Satoshi Takahashi, Ultra-fast dynamics of simple polyalanine peptides by using nanosecond region fluorescence correlation spectroscopy, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018 年

Saya Nakano, Hiroyuki Oikawa, Satoshi Takahashi, Investigation on the structural properties of proteins included in non-membraneous granule droplets, 第 56 回日本生物物理学会年会、2018 年

Hitomi Urabe, Saya Nakano, Yuki Shimizu, Naoki Mikoshiba, Hiroyuki Oikawa, Satoshi Takahashi, Improvement of the fluorescent detected phage sorter for the application to phage display, 第 56 回日本生物物理学会年会、2018 年

高橋巧, 小井川浩之, 須河光弘, 高橋聡, マイクロ秒分解 分子蛍光測定による F₁-ATPase の構造変化追跡, 第 18 回日本蛋白質科学会年会、2018 年

吉田文, 金沢省, 高橋泰人, 松井敏高, 小井川浩之, 浜田大三, 高橋聡, 単一分子蛍光分光法のための新しいタンパク質二重蛍光色素標識方法, 第 18 回日本蛋白質科学会年会、2018 年

Asami Izaki, Hiroyuki Oikawa, Takeshi Tomita, Satoshi Takahashi, Development of Fluorescence Correlation Spectrometer for the Elucidation of Protein Interactions, 第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年

Supawich Kamonprasertsuk, Hiroyuki Oikawa, Satoshi Takahashi, Unexpected heterogeneity and slow dynamics of simple poly-alanine peptides detected by single molecule fluorescence spectroscopy, 第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年

小井川 浩之, 高橋 巧, 須河 光弘, 高橋 聡, タンパク質構造変化の遷移経路追跡を目指した一分子蛍光測定装置の開発, 第 11 回分子科学討論会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/takahashi-s/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 聡

ローマ字氏名：Takahashi, Satoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。