

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 1月21日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009~2011

課題番号：21370072

研究課題名（和文） 高度化した一分子観察法による蛋白質の折り畳みダイナミクスの解明

研究課題名（英文） Investigation of the folding dynamics of proteins based on the advanced method of single molecule detection

研究代表者

高橋 聡 (TAKAHASHI SATOSHI)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30283641

研究成果の概要（和文）：本申請研究では、蛋白質のフォールディング現象を理解するために、第一に、一分子を長時間観察するための球面鏡システムを開発した。この装置を用いて、変性したシトクロム *c* のエネルギー地形を解析する研究を進めた。第二に、一分子の蛍光強度データを高時間分解能で観察するためのラインフォーカス型の共焦点顕微鏡を開発した。この装置を BdpA に適応することで、変性状態に複数の副順位が存在することを明らかにした。今後、開発した手法を新しい試料に応用することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we first developed spherical mirror system for the detection of fluorescence from single molecules for long periods. Based on the developed system, we successfully determined the energy landscape for cytochrome *c*. We next developed line confocal microscopy for the fast time resolved measurements of single molecule fluorescence time series. The method was used to investigate the unfolded state dynamics of the B domain of protein A, and revealed the presence of substates in the unfolded ensemble. Further applications of the developed methods for other protein systems are currently underway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：フォールディング

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、アミノ酸の一次配列をもとに、無数の変性状態の構造の中から唯一の折り畳み構造を選び出す能力をもつポリペプチド鎖である。アミノ酸の一次配列からタンパク質の構造を予測する問題を「タンパク質の折り畳み問題」という。この問題を解くことは、DNA 配列の解読や人工タンパク質の設計に必須であるほか、タンパク質が正しく折り畳まないことに起因する疾病の対策にも役立つはずである。

タンパク質のフォールディングは、大変難しい問題である。この原因の一つとして、変性したタンパク質の物性についての理解が欠けていることを指摘できる。これまで、変性タンパク質はランダムコイル状態にあり、天文学的な数の微視的な構造の集合体だと思われてきた。また、変性したタンパク質は、ランダムに構造転移を起こすとも考えられてきた。

変性タンパク質についての「二つのランダム」仮説は、厳密な証拠により証明された事実ではない。むしろ、変性タンパク質には構造があるのではないかと、また、構造転移は折り畳み構造を選びやすいように起こるのではないかなどの指摘がなされている。しかし、従来の実験手法では、これらの可能性の検討を行うことは不可能だった。

変性したタンパク質の構造や運動性を調べる場合、従来の分子集団を観察する手法による研究には限界がある。これは、変性したタンパク質は多数の構造を持つ分子の集合体であるため、従来法では平均構造の情報しか得られないためである。新しい実験方法による斬新なアプローチが求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、変性タンパク質の構造と運動の特性を調べることを目的として、一分子レベルでタンパク質が発する蛍光信号を観察する技術を発展させることを第一の目的とした。さらに、開発した手法をいくつかのタンパク質に応用し、変性タンパク質の物性を解明することを第二の目的とした。

第一の目的である蛍光観察技術の開発として、二つの手法を構築した。第一に、蛍光色素をラベルしたタンパク質が発する蛍光を、ミリ秒程度の時間分解能で数秒以上の長時間にわたって観察する手法を開発した。第二に、ラベル化を行った試料について、一分子蛍光信号をマイクロ秒領域の時間分解能で観測する手法を開発した。

第二の目的である変性タンパク質の物性を観測として、シトクロム c とプロテイン A の B ドメインをモデルとして取り上げ、これらのタンパク質の変性状態を一分子観測により解析することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 一分子観察法の高度化

本研究では、より多くの情報を引き出すことを目的に、一分子観察装置の高度化の努力を行った。マイクロ流路を用いたデータの S/N の向上、測定の間時間分解能の 10 マイクロ秒オーダーまでの短縮、二色の蛍光を同時観察する手法の開発などを行った。

(2) 一分子観察によるタンパク質のエネルギー地形の特徴付け

本プロジェクトでは、一分子観測により変性状態における微視的な構造を区別し、各構造の滞在時間から自由エネルギーレベルを実測することで、エネルギー曲面の性質を調べた。

(3) 一分子観測法による折り畳み反応スキームの決定

折り畳む過程で折り畳み中間体を形成するなど、複雑な反応スキームを示す蛋白質が多く存在する。一分子分光法により、中間体がどのような順番で形成されたかを判断する研究を行った。

4. 研究成果

(1) 基板に固定しない一分子を長時間観測するフローストップ法の開発

第一の実験装置として、本研究ではキャピラリーセルに蛍光色素をラベルしたタンパク質を一分子レベルで流すことで、色素の蛍光の経時変化を検出する方法を開発した。

一分子レベルにおける蛍光強度の観察のために、共焦点顕微鏡を用いる方法がよく知られている。しかし、この手法ではタンパク質を 1 ミリ秒ほどの間しか観察できない。一方で、タンパク質を光学基板に固定することで、長時間の観察を行う実験もなされるが、固定化がタンパク質の性質にしばしば影響を与えることも知られている。

今回開発した装置では、一分子観察実験で一般に用いられる顕微レンズではなく、球面型の反射光学系を用いた。この光学系は、光の集光効率が高いにもかかわらず、光学系の拡大倍率が低いという顕微レンズにはない特徴を持っている。このため、内径 5 μm 程度のキャピラリーを流れる全ての分子を、一分子レベルでイメージングすることが可能である。さらに、数百マイクロメートルという広い視野を持つことも特徴である。このため、キャピラリー流路の視野の中に分子がある限り、蛍光強度を追跡できるという特徴も持っている。

さらに長時間の一分子観察を目指し、本光学系の特徴を最もよく活かした実験方法として、「フロー・ストップ法」を開発した。この方法の手順は以下のとおりである。始め

に色素をラベルしたタンパク質の溶液を一定速度でキャピラリー流路に流しておく（フロー）。次に、分子が観察視野に入った時点で、フローの流速を止める（ストップ）。すると、分子は拡散運動を行ったとしても広い観察視野の中に留まるため、レーザーの照射によりブリーチするまで継続して観察できる。この手法により一分子から得られる蛍光信号を、10秒近くまで観察することが可能になった。

以上のように、開発した手法を用いることで、タンパク質に蛍光色素をラベルするだけで、容易に一分子観察を行うことができるようになった。特に、基板に固定化しないタンパク質を一分子レベルで継続観察することは、我々のグループだけが持つ特殊な技術であることを強調したい。

(2) フロー・ストップ法による変性状態におけるシトクロムcの観察

開発したフロー・ストップ法の最初の応用例として、変性状態におけるシトクロムcの運動を観察した。シトクロムcは、共有結合したヘムを持つ球状タンパク質である。酵母由来のシトクロムcは、C末端付近にシステイン残基を持つため、蛍光色素を簡単にラベルすることが可能であり、さらに、N末端付近に共有結合しているヘムが蛍光をクエンチするため、蛍光強度を観察することで構造変化を追跡することができる。この試料を用い、変性剤が存在して主に変性状態が存在する条件において、一分子観察を行った。

フロー・ストップ法を使って、30ミリ秒の時間分解能で観察した。得られた蛍光強度は一定値ではなく、比較的強度が強い所や弱い所が現れている。これらは、変性状態におけるシトクロムcの構造変化を反映する時系列データである。

得られた時系列データを、北海道大学電子科学研究所の小松崎教授のグループとの共同研究として、小松崎教授らが開発した局所平衡解析を行った。この方法により、変性したシトクロムcには広がった状態と、コンパクトな状態が共存することが確かめられた。さらに、二つの状態の相対自由エネルギーが、変性剤濃度により変化することも確認した。

(3) ラインフォーカス型の共焦点顕微鏡によるマイクロ秒分解一分子観察装置の開発

第二の実験装置として、フローセルとライン型共焦点顕微鏡を組み合わせることで、数十マイクロ秒の時間分解能で一分子の蛍光強度変化を連続追跡する装置を開発した。従来の一分子蛍光分光法において、時間分解能を決めるのは、単位時間当りに検出できる光子数である。強いレーザー光励起により、蛍光色素は S_0 状態と S_1 状態を行き来すること

で多数の光子を発するが、 T_1 状態が生じることで蛍光の発生が止まってしまう。

本装置では、 3O_2 存在下で蛍光観察を行うことで、蛍光色素の T_1 状態をクエンチさせ、単位時間内に得られる蛍光光子数を増やす工夫を行った。このために、フローセルを用いて新鮮な試料と 3O_2 を供給した。さらに、高速で流れる分子を継続観察するために、ラインフォーカス型の共焦点光学系を用いて観察体積を増やした。これらの工夫により、単位時間当りに検出できる光子数を従来法に比べて数桁増やし、最大で20マイクロ秒の時間分解能による一分子蛍光観察を可能にした。また、検出光子数を増やしたことで、蛍光観察で得られるFRET効率の分解能も向上できた。

(4) ラインフォーカス型共焦点顕微鏡を用いたプロテインAのBドメインの運動解析

開発した装置を用いて、二状態のフォールディングを示すプロテインAのBドメイン(BdpA)について、平衡変性過程を観察した。BdpAの22番目と55番目のアミノ酸残基にシステインを導入し、Alexa488とAlexa633をラベルした。バルクレベルの蛍光観察を行い、二つの色素の蛍光強度を比較することで、ラベル化した試料のFRET効率が変性剤濃度に対して協同的に変化することを確かめた。これは、試料が天然状態から変性状態に二状態的に変化することを示している。

次に、開発した装置を用いて、一分子レベルにおけるBdpAの変性転移を観察した。グアニジン濃度が0Mから6Mの溶液について、180マイクロ秒の時間分解能の時系列データを多数得た。得られた時系列データをFRET効率のヒストグラムに変換したところ、変性剤濃度が増えるにつれ、FRET効率が減少することが示された。

FRET効率の分布幅は、天然状態である1Mのデータでは比較的狭く、実験の光子数から推定されるショットノイズ幅とほぼ一致した。これは、天然状態の構造が比較的均一であることに対応する。一方で、変性状態について得られた分布幅は、光子数から推定されるショットノイズ幅よりも大きかった。特に、2Mや3Mなどの比較的low濃度のグアニジン溶液において、この効果が顕著だった。この結果は、変性状態内の複数の構造間を、観測の時間分解能とほぼ同じ時定数にてタンパク質がジャンプしていることを示唆する。

(5) まとめ

以上のように、本研究において、球面鏡とサンプルフロー装置を組み合わせた長時間一分子観測装置と、ラインフォーカス型共焦点顕微鏡を用いた高時間分解能一分子蛍光観察装置を開発した。これらの装置は、申請

者ら独自のアイデアに基づくものであり、海外の研究者により開発された装置のコピー等ではない。開発した装置は、数ミリ秒以上の長時間のタンパク質運動と、数十マイクロ秒程度の長時間分解能のタンパク質運動の追跡をはじめ可能とした。

開発した装置を、シトクロム c および BdpA という二つのモデルタンパク質に応用したところ、どちらのタンパク質についても、変性状態のタンパク質には複数の副状態が含まれていることが示された。すなわち、変性タンパク質は完全にランダムな構造の集合体であるというイメージとは反する結果となった。今後、さまざまなタンパク質系に開発した装置による実験を行うことで、より幅広い知見を集める必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kamagata K, Kawaguchi T, Iwahashi Y, Baba A, Fujimoto K, Komatsuzaki T, Sambongi Y, Goto Y, Takahashi S “Long-Term Observation of Fluorescence of Free Single Molecules To Explore Protein-Folding Energy Landscapes” J. Am. Chem. Soc. 134, 11525-11532 (2012) 査読有り

2. Tsuyoshi Konuma, Tetsunari Kimura, Shuzo Matsumoto, Yuji Goto, Tetsuro Fujisawa, Alan R. Fersht, Satoshi Takahashi “Time-Resolved Small-Angle X-ray Scattering Study of the Folding Dynamics of Barnase” Journal of Molecular Biology, 405, 1284-1294 (2011) 査読有り

3. Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata “Staring at a Protein: Ensemble and Single-Molecule Investigations on Protein-Folding Dynamics” Advances in Chemical Physics, 146, 3-22 (2011) 査読有り

4. 小井川浩之、鎌形清人、高橋聡、一分子蛍光観察法を用いたタンパク質フォールディングの解明、高分子、801-803 (2011) 査読無し

5. 鎌形清人、高橋聡、新しいタンパク質科学の可能性～新時代を切り拓くマルチタレント David Baker～、化学、68-69、化学同人 (2011) 査読無し

[学会発表] (計 26 件)

1. Toshifumi Kawaguchi, Kiyoto Kamagata, Hiroyuki Oikawa, Yoshihiro Sambongi, Satoshi Takahashi “Folding dynamics of cytochrome c551 studied by long time observation of fluorescence time series from single molecules” 日本化学会第92春季年会, 横浜,(2012.3.25-2012.3.28)

2. Kiyoto Kamagata, Toshifumi Kawaguchi, Akinori Baba, Yoshihiro Sambongi, Tamiki Komatsuzaki, Satoshi Takahashi, “Exploring The Energy Landscape of Denatured Protein Using Time-Series Detection of Fluorescence of Free Single Molecules” International Symposium on Innovative Nanobiodevices ISIN 2012, Nagoya, (2012.3.21-2012.3.22)

3. Satoshi Takahashi “ See how they run: exploring the energy landscape of protein folding using time-series detection of fluorescence of free single molecules” 日本分光学会年会講演会、横浜 (2011.11.30-12.2)

4. Hironao Itabashi, Eriko Mano, Hiroyuki Oikawa, Yasuyuki Araki, Kiyoto Kamagata, Takehiko Wada, Satoshi Takahashi “Additives inhibiting the bleaching of fluorophores for the long-time fluorescence observation of single proteins” 第49回日本生物物理学会年会, 姫路(2011.9.16-2011.9.18)

5. Kiyoto Kamagata, Toshifumi Kawaguchi, Akinori Baba, Yoshihiro Sambongi, Tamiki Komatsuzaki, Satoshi Takahashi “Energy landscape of denatured protein revealed by a new single-molecule fluorescence method” 第49回日本生物物理学会年会, 姫路(2011.9.16-2011.9.18)

6. Sion Ando, Hiroyuki Oikawa, Kiyoto Kamagata, Kazumasa Sakurai, Yuji Goto, Satoshi Takahashi “Imaging and tracking of single BLG molecules in solution” 第49回日本生物物理学会年会, 姫路(2011.9.16-2011.9.18)

7. Hiroyuki Oikawa, Kiyoto Kamagata, Issei Iijima, Takahiro Hosaka, Yoshihiro Sambongi, Satoshi Takahashi “Microsecond-resolved time traces of protein conformational change by single-molecule fluorescence detection” 第49回日本生物物理学会年会, 姫路 (2011.9.16-2011.9.18)

8. Hiroyuki Oikawa, Kiyoto Kamagata, Issei Iijima, Takahiro Hosaka, Yoshihiro Sambongi, Satoshi Takahashi “Submillisecond dynamics of

protein folding and ligand binding detected by the line confocal microscopy” 第 49 回日本生物物理学会年会, 姫路(2011.9.16-2011.9.18)

9. Kiyoto Kamagata “Exploration of energy landscape of protein folding using a novel single-molecule fluorescence method” The Complexity of Dynamics and Kinetics in Many Dimensions, USA, Telluride (2011.6.20-2011.6.24)

10. 鎌形清人, 川口敏史, 馬場昭典, 三本木至宏, 小松崎民樹, 高橋聡, “新規一分子蛍光観測法による蛋白質の自由エネルギー地形の解析” 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 大阪 (2011.6.7-6.9)

11. 小井川浩之, 鎌形清人, 飯島一生, 芳坂貴弘, 高橋聡, “マイクロ秒分解一分子蛍光検出による蛋白質構造変化の追跡” 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 大阪(2011.6.7-2011.6.9)

12. Satoshi Takahashi “Single molecule and ensemble investigations of protein folding dynamics in the time domain from 30 μ s to seconds” The 16th Biophysics Conference , National Dong Hwa University, Taiwan (2011.5.18-2011.5.21)

13. Kiyoto Kamagata, Akinori Baba, Tamiki Komatsuzaki, Satoshi Takahashi “Flow and Stop Protocol for the Long-Time Observation of Fluorescence from Single Molecules: Application to the Time-Series Analysis of Protein Folding” 55th Annual Meeting Biophysical Society, USA, Maryland (2011.3.5-2011.3.9)

14. 小井川浩之, 鎌形清人, 高橋聡 “一分子蛍光検出による蛋白質折り畳みのマイクロ秒分解時間追跡” 第 48 回日本生物物理学会年会, 日本, 仙台, (2010.9.20)

15. Satoshi Takahashi, Hiroyuki Oikawa and Kiyoto Kamagata “Single Molecule Investigation of the Denatured State Dynamics of Cytochrome c in the Time Domain from 100 μ s to 1S” The 24th Annual Symposium of The Protein Society , USA ,San diego,(2010.8.5)

16. Satoshi Takahashi “Single Molecule Investigation of the Denatured State Dynamics of Cytochrome c in the Time Domain from 10 μ s to 1s” Indo-Japan Joint Workshop on New Frontiers of Molecular Spectroscopy from Gas Phase to Proteins, 日本, 神戸, (2010.6.26)

17. 高橋聡 “蛋白質フォールディングの実験的研究：単純な速度論に潜む複雑性を検出できるか？” 第 10 回日本蛋白質科学会年会、日本、札幌 (2010.6.16)

18. 鎌形清人, 高橋聡 “キャピラリー内トラップによる一分子長時間測定法の開発：蛋白質の折り畳みへの応用” 第 10 回日本蛋白質科学会年会, 日本, 札幌, (2010.6.16)

19. Kiyoto Kamagata, Satoshi Takahashi, “Long-time observation of a single molecule trapped in a capillary cell: application for protein folding” Gordon Research Conference Protein Folding Dynamics ,USA, Ventura, (2010.1.10)

20. 鎌形清人, 後藤祐児, 高橋聡 “キャピラリー内トラップによる一分子の長時間観察：蛋白質の折り畳みへの応用” 第 47 回日本生物物理学会年会、徳島 (2009.10.30-11.1)

21. 門脇喬之, 鎌形清人, 小井川浩之, 櫻井一正, 後藤祐児, 高橋聡 “一分子測定法による乳性蛋白質 β -ラクトグロブリンの折り畳み過程の観測” 第47回日本生物物理学会年会, 徳島, (2009.10.30-2009.11.1)

22. 小井川浩之, 鎌形清人, 後藤祐児, 高橋聡 “ライン共焦点顕微鏡による蛋白質折り畳みのマイクロ秒分解一分子追跡” 第47回日本生物物理学会年会, 徳島, (2009.10.30-2009.11.1)

23. 山森明弘, 鎌形清人, 飯島一生, 芳坂貴弘, 後藤祐児, 高橋聡 “二重標識したマルトース結合蛋白質の基質結合と折りたたみの一分子観測” 第 47 回日本生物物理学会年会, 徳島, (2009.10.30-2009.11.1)

24. Satoshi Takahashi “STARING AT A PROTEIN Single-Molecule and Ensemble Investigations of Protein Folding Dynamics ” The Complexity of Dynamics and Kinetics in Many Dimensions, Colorado, USA (2009.6.29-2009.7.3)

25. 小井川浩之, 鎌形清人, 高橋聡 “マイクロ秒時間分解一分子追跡による蛋白質折り畳み運動の観測” 第 36 回生体分子科学討論会, 札幌, (2009.6.19-2009.6.20)

26. 鎌形清人, 後藤祐児, 高橋聡 “キャピラリー内トラップによる一分子長時間観測：蛋白質の折り畳みへの応用” 第9回蛋白質科学会, 熊本, (2009.5.20-2009.5.22)

〔図書〕（計 3 件）

1. Satoshi Takahashi, Tetsunari Kimura,
Protein Folding and Misfolding Shining Light by
Infrared Spectroscopy, Watching Dynamical
Events in Protein Folding in the Time Domain
from Submilliseconds to Seconds:
Continuous-Flow Rapid-Mixing Infrared
Spectroscopy, 91-115 ページ, springer (2011)

2. 高橋聡、タンパク質の立体構造入門：基
礎から構造バイオインフォマティクスへ、タ
ンパク質の変性とフォールディング、タンパ
ク質のフォールディング問題、18-24 ページ、
37-46 ページ、講談社 (2010)

3. 高橋聡、タンパク質のはたらきを知る一
分子機能と生体作用、「蛋白質の可視化とダ
イナミズム①：in vitro 系での研究」、53-66
ページ、化学同人 (2009)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 聡 (TAKAHASHI SATOSHI)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30283641

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

鎌形 清人 (KAMAGATA KIYOTO)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：90432492

小井川 浩之 (OIKAWA HIROYUKI)

東北大学・多元物質科学研究所・教育研究

支援者

研究者番号：