

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770173

研究課題名（和文） 新規一分子蛍光法による天然変性蛋白質の基質認識機構の解明

研究課題名（英文） Ligand recognition of intrinsically disordered protein revealed by a new single-molecule measurement

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

天然変性蛋白質の基質認識過程を含む、蛋白質の折れたたみや機能に関わる構造変化を検出するために、新規の一分子蛍光観測装置を開発した。まず、変性した蛋白質の物性（構造の多様性とその運動性）を明らかにするために、酵母由来と緑膿菌由来のチトクロム*c*にこの方法を応用した。得られた一分子蛍光データを局所平衡状態解析により解析した結果、変性チトクロム*c*は約100ミリ秒の動的な構造多様性を持つことが明らかになった。次に、一分子観測装置を使用し、基質結合に伴う糖質関連蛋白質の構造変化を測定した。解析の結果、基質が存在しないときに、蛋白質の開閉運動がミリ秒の時間領域で観測された。この開閉運動が基質結合時間より十分に遅いことから、この蛋白質はinduced fit型の基質結合様式を持つことが示唆された。今後、上記の手法を天然変性蛋白質に応用することで、天然変性蛋白質の物性を明らかにできると期待される。

研究成果の概要（英文）：

We developed a new single-molecule fluorescence method to investigate folding and dynamics with functions of proteins including ligand-recognition of an intrinsically disordered protein. At first, to understand a physiological property of a denatured protein, we applied our method to obtain the fluorescence fluctuations of two denatured cytochrome *c*. The fluorescence traces show multiple conformations with the lifetime of ~100 ms in denatured proteins. Second, we investigated ligand-binding kinetics of maltose binding protein at a single molecule level. The single-molecule data shows fluctuations between open and close conformations with ~100 ms time scale in the absence of maltose. The comparison of its binding rate with the rate of the fluctuations suggests that the ligand-binding of this protein is explained by induced fit model. The application of our developed method to intrinsically disordered proteins will reveal their ligand-recognition process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000円	540,000円	2,340,000円
2010年度	500,000円	150,000円	650,000円
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000円	690,000円	2,990,000円

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：変性蛋白質、一分子観察、ダイナミクス、チトクロムc、フォールディング

1. 研究開始当初の背景

天然変性蛋白質には、1) 特定の構造を持たない、2) 他の生体分子(基質)と結合して、様々な構造へと折り畳まる、3) 複数の機能を持つ、という特徴がある。特定の構造を持たないため、その特徴は構造を保持している蛋白質とは大きく異なる。しかしながら、「天然変性蛋白質が、どのように基質を認識をして、特定の構造へ折り畳まれ、機能を発揮するのか?」という基本的な機構がほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

変性蛋白質の物性や蛋白質の機能を明らかにし、天然変性蛋白質の基質認識機構を解明する。

3. 研究の方法

天然変性蛋白質を含む変性蛋白質の物性や蛋白質の機能を明らかにするために、新規の一分子蛍光観察装置を開発する。開発した装置を使用し、天然変性蛋白質を含む変性蛋白質の物性や蛋白質の機能を明らかにする。

4. 研究成果

蛋白質の折れたたみや機能に関わる構造変化を検出するために、新規の一分子蛍光観察装置を開発した。この装置は、高出力の励起系、キャピラリー・フローセル、球面鏡による高感度・高視野の検出系から構成されている。

まず、変性蛋白質のモデルとして、酵母由来と緑膿菌由来のチトクロムcを使用し、変性蛋白質の構造多様性とその運動性を明らかにした。開発した一分子蛍光装置を使用し、変性条件でチトクロムcの物性を測定した。チトクロムcに蛍光色素Alexa532, ATT0532を修飾し、その色素の強度変動を観測することで、蛋白質の構造とその運動性を調べることが可能になる。酵母のチトクロムcでは、様々な変性条件で、30以上の蛍光強度の時系列データを得た。局所平衡状態解析によりデータを解析した結果、変性した蛋白質はミリ秒の動的な構造多様性を持つことが明らかになった。次に、緑膿菌由来のチトクロムcでは、5ミリ秒の時間分解能を持ち、全長が数秒程度の一分子時系列データが約150本得られた。データを局所平衡状態解析で分析したところ、複数の局所平衡状態を特定でき、それらの状態間の遷移も観測された。これらの結果は、

過渡的な、ある特定の構造を持つ準安定状態が変性状態には有意に存在することを示唆する。さらに、過渡的な状態は、折り畳みの核として働くと推測され、天然変性蛋白質では基質認識を促進する因子であると考えられる。

次に、一分子観測装置を使用し、基質結合に伴う糖質関連蛋白質の構造変化を測定した。上記と同様に、蛋白質に付加した蛍光色素の蛍光強度変化を測定し、基質結合過程を測定した。解析の結果、基質が存在しないときに、蛋白質の開閉運動がミリ秒の時間領域で観測された。基質結合時間と比較し、観測された運動が遅いことから、この蛋白質はinduced fit型の基質結合様式を持つことが示唆された。天然変性蛋白質は基質がない状況下で特定の構造を持たないことから、同様のinduced fit型の基質結合様式をもつと推定される。

最後に、本研究では、天然変性蛋白質の基質認識機構を明らかにする実験手法を確立した。今後、天然変性蛋白質に応用することで、その基質認識機構を明らかにできると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

1. 【査読あり】Takahashi, S. and Kamagata, K., "Staring at a Protein: Ensemble and Single Molecule Investigations on Protein Folding Dynamics", *Adv. Chem. Phys. in press*.
2. 【査読なし】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(化学同人)、1巻、p68-69 (2011)
3. 【査読あり】鎌形清人、木下雅仁、高橋聡「一分子測定によるタンパク質の折りたたみ研究の展開」生物物理 **49**, 282-286 (2009).

[学会発表] (計29件)

1. Kamagata K., Baba A., Komatsuzaki T., Takahashi S., "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*, Maryland, USA, March 5-9, (2011)

2. 鎌形清人、高橋聡 「新規一分子蛍光観察法は蛋白質の折り畳みを解き明かす」、第13回生命化学研究会シンポジウム「生命・生体を医学・化学する」、仙台、2011年1月7日
3. 鎌形清人、「高橋聡蛋白質一分子の長時間蛍光観察法の開発：蛋白質の折り畳みへの応用」、第10回東北大学多元物質科学研究会研究発表会、仙台、2010年12月1日
4. 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」揺らぎと生体機能第4回公開シンポジウム、滋賀、2010年11月30日-12月1日
5. 鎌形清人、高橋聡、「蛋白質一分子の長時間蛍光観察：蛋白質の折り畳みへの応用」、特定領域研究「高次系分子科学」第4回公開シンポジウム、東北大学、2010年11月24日-25日
6. 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」、「高次系分子科学」第4回公開シンポジウム、仙台、2010年11月24日-25日
7. Kamagata K., Baba A., Komatsuzaki T., Takahashi S., “Long-time observation of a single molecule trapped in a capillary cell: application for protein folding”, 第48回日本生物物理学会年会、仙台、2010年9月20日-22日
8. 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、仙台、2010年9月20日-22日
9. 安藤詞音、小井川浩之、櫻井一正、後藤祐児、鎌形清人、高橋聡、「一分子測定法によるβ-ラクトグロブリンの蛍光強度変化と拡散の観察」第48回日本生物物理学会年会、仙台、2010年9月20日-22日
10. 川口敏文、鎌形清人、小井川浩之、三本木至宏、高橋聡、「長時間分解能一分子測定による緑膿菌由来シトクロムcの変性状態内の運動観察」、第48回日本生物物理学会年会、仙台、2010年9月20日-22日
11. 矢田哲也、山森明弘、飯島一生、芳坂貴弘、小井川浩之、鎌形清人、高橋聡、「二重標識したマルトース結合タンパク質の基質結合の一分子観察」第48回日本生物物理学会年会、仙台、2010年9月20日-22日
12. 鎌形清人、高橋聡 「新規蛍光一分子観測装置による膜輸送体の動的構造の観測に向けて」、特定領域「高次系分子科学」第9回ミニ公開シンポジウム、広島、2010年8月30日-31日
13. Takahashi S., Oikawa H., Kamagata K., “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*, San Diego, USA, August 5-9, (2010)
14. 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、札幌、2010年6月16日-18日
15. Kamagata K., Takahashi S., “Development of single molecule detection based on flow system and its application to protein structural dynamics”, *International Symposium of Joint Research Network on Advanced Materials and Devices 周“Chou”*, Hokkaido, Japan, March 25-26, (2010)
16. 鎌形清人、「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」、蛋白質の基質結合や構造変化における分子揺らぎの意義を討論する会、仙台、2010年3月4-5日
17. Kamagata K., “long time observation for a single molecule trapped in a capillary cell: application for protein folding”, *Gordon Research Conference "Protein Folding Dynamics"*, Ventura, CA, January 10-15, (2010)
18. Kamagata K., “long time observation for a single molecule trapped in a capillary cell: application for protein folding”, *Gordon Research Seminar "Protein Folding Dynamics"*, Ventura, CA, January 9-10, (2010)
19. Kamagata K., “long time observation for a single molecule trapped in a capillary cell: application for protein folding”, *NIH Seminar*, Bethesda, Maryland, January 8, (2010)
20. Kamagata K., Goto Y., Takahashi S., “long time observation of a single molecule trapped in a capillary cell: application for protein folding”, *The 3rd international Symposium Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions*, Nagoya, Japan, December 20-21, (2009)
21. Oikawa H., Kamagata K., Goto Y., Takahashi S., “Microsecond-resolved single-molecule time traces of protein

- folding by a line-illuminated confocal microscopy”, *The 3rd international Symposium Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions*, Nagoya, Japan, December 20-21, (2009)
22. Yamamori A., Kamagata K., Iijima I., Hohsaka T., Goto Y., Takahashi S., “Single molecule observation of the ligand binding dynamics of maltose binding protein doubly labeled by a cell free system”, *The 3rd international Symposium Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions*, Nagoya, Japan, December 20-21, (2009)
23. Kamagata K., Takahashi, S., “long time observation of a single molecule trapped in a capillary cell: application for protein folding”, *Watching Biomolecules in Action single molecule biology symposium 2nd Kanazawa Bio-AFM workshop*, Osaka, Japan, December 15-17, (2009)
24. Kamagata K., Goto Y., Takahashi S., 「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」、日本生物物理学会第47回年会、徳島、2009年10月30日-11月1日
25. Yamamori A., Kamagata K., Iijima I., Hohsaka T., Goto Y., Takahashi S. 「二重標識したマルトース結合蛋白質の基質結合と折り畳みの一分子測定」、日本生物物理学会第47回年会、徳島、2009年10月30日-11月1日
26. Kadoaki T., Kamagata K., Oikwa H., Sakurai K., Goto Y., Takahashi, S. 「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察」、日本生物物理学会第47回年会、徳島、2009年10月30日-11月1日
27. Oikwa H., Kamagata K., Goto Y., Takahashi S. 「ライン共焦点顕微鏡による蛋白質の折り畳みのマイクロ秒分解一分子追跡」、日本生物物理学会第47回年会、徳島、2009年10月30日-11月1日
28. 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の折り畳み運動の観察」、第36回生体分子科学討論会、北海道、2009年6月19-20日
29. 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回日本蛋白質科学会年会、熊本、2009年5月20-22日

〔図書〕(計0件)
〔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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：