

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570178

研究課題名(和文) 周波数領域蛍光偏光法によるアクトミオシン動作中の水和層粘性変化の反応速度論的解析

研究課題名(英文) Kinetic analyses of the local viscosity of the hydration layer of actomyosin at work studied by frequency-domain fluorescence polarization

研究代表者

和沢 鉄一 (Wazawa, Tetsuichi)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授

研究者番号：80359851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質周囲の水和水は、タンパク質の構造の安定性やダイナミクスに大きく影響することでその動作メカニズムに寄与している。本研究では、タンパク質周囲の水和水の性質を解析する手法を開発し、筋タンパク質であるアクチンの水和水の解析を行った。柔軟なリンカーを介して蛍光色素をアクチンに結合することで蛍光色素を水和層中に係留し、LN光変調器を使って開発した高精度周波数領域蛍光装置で時間分解蛍光偏光測定を行った。ここで得られた蛍光色素の回転ブラウン運動の解析値から、アクチン周囲の水和層の流体特性についての情報が得られた。本研究で開発した手法は、タンパク質に対する水和の役割の研究を進めるのに有用である。

研究成果の概要(英文)：Hydration water is closely involved in the stability and dynamics of protein and plays a vital role in the mechanism of protein function. Here we develop a technique to analyse physical properties of the hydration water around protein and apply this technique to actin, a muscle contractile protein. A fluorescent dye is conjugated to actin through a flexible linker so that the dye is tethered in the hydration layer, and its time-resolved fluorescence polarisation is measured by a newly in-house built high-precision frequency-domain fluorometer that uses an LN light modulator to generate modulated excitation light. The dye undergoes rotational Brownian motion in the hydration layer of actin that can be analysed by the measurement, and the analysis reveals a hydrodynamic property of the hydration layer around actin. The technique developed in this study is useful to move a step closer to understanding the role of hydration water around protein.

研究分野：生物物理学

 キーワード：アクチン 周波数蛍光法 回転ブラウン運動 水和 wobbling-in-coneモデル 蛍光異方性 時間分解  
 蛍光法 rhodamine 6G

1. 研究開始当初の背景

タンパク質周囲の水和水は、タンパク質に影響されてバルク水と異なった性質を示す水であり、典型的にはタンパク質1分子あたり数100～数1000個以上の水分子から構成される。水和水はタンパク質と相互作用することを通してタンパク質のコンフォメーションの安定性やダイナミクスを決定する主たる要因であり、タンパク質の様々な分子プロセスにおける水和水の関与の重要性が従来提唱されてきた。しかし、タンパク質の水和水の状態の有効な解析手段の不足により、タンパク質の分子プロセスにおける水和水の寄与の理解は十分ではないと思われる。

アクトミオシンは、ミオシンとF-アクチンから成るタンパク質複合体であり、ATPの加水分解で得られるエネルギーを力学仕事に変換することで筋収縮や細胞運動等において重要な役割を果たしている。最近の研究により、アクトミオシン周囲の水和水の運動性がF-アクチン上のミオシンの滑り運動のメカニズムに寄与していることが示唆されている。アクトミオシンの動作における水和水の役割を理解するには、ATP加水分解と併行して起こる水和状態変化の詳細を明らかにする必要がある。しかし、水和水研究のために従来広く用いられてきた方法(マイクロ波誘電緩和分光法、<sup>1</sup>H NMR、中性子散乱、熱力学測定など)の殆どは経時変化測定における時間分解能は低く、反応速度論的解析に向いていない。したがって、タンパク質動作に伴う水和状態変化の研究を進展させるには、十分な時間分解能をもつ新たな計測手段の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、蛍光測定法を使ってタンパク質周囲の水和層の性質を調べる手法を開発し、アクチンの水和層の性質を測定することである。具体的な研究項目は以下の通りである：

(1) 高精度な時間分解蛍光偏光測定装置の開発。本研究では、タンパク質に係留した蛍光プローブの回転ブラウン運動の解析から、タンパク質の水和層の流体的性質の情報を抽出する。蛍光色素の回転ブラウン運動を解析するには、時間分解蛍光偏光を高精度で測定する必要がある。この研究項目では、独自の光学系を有する周波数領域蛍光偏光測定装置の開発を行う。

(2) 周波数領域蛍光偏光測定のためのデータを用いた蛍光プローブの回転ブラウン運動解析手法の確立。この研究項目では、周波数領域蛍光偏光測定データから、蛍光寿命および時間分解蛍光異方性減衰の成分分析を行うためのソフトウェア開発を行う。さらに、ここで得られた時間分解異方性パラメータより、蛍光プローブの回転ブラウン運動の回転拡散

係数や円錐角を導出する方法論の確立をする。

(3) タンパク質に係留された蛍光プローブの回転ブラウン運動データとタンパク質周囲の水和層の流体的性質の相関を明らかにする。

(4) アクチン周囲の水和層の流体的性質の情報を抽出する。

3. 研究の方法

(1) 高精度周波数領域蛍光測定装置。周波数領域蛍光測定装置は、変調励起光発生源、変調蛍光検出系、そして変調蛍光復調系で構成した。変調励起光は、高周波信号源と安定化電源で駆動されたLN光変調器を用いてレーザー光を変調することで、発生した。変調励起光を照射することによって試料で発生した変調蛍光は、高速応答性の光電子増倍管で検出した。変調蛍光を受光した光電子増倍管が出力する変調信号から、ロックインアンプを用いた位相検波と数値処理によって変調位相と変調振幅を算出した。

(2) オリゴエチレングリコールリンカーを有するチオール反応性蛍光色素の合成。アクチンのシステイン残基374を標識するためのチオール基反応性蛍光色素として、Rhodamine 6G (R6G)とマレイミド基をオリゴエチレングリコールリンカーで架橋した誘導体を合成した。第1段階目の反応として、R6G-スクシンイミジルエステル(R6G-OSu)とオリゴエチレングリコール・ジアミンを3級アミン存在下で反応させてR6Gアミン誘導体を合成し、逆相液体クロマトグラフィーで精製した。R6GアミンとN-succinimidyl 3-maleimidopropionateを3級アミン存在下で反応させて、R6G-オリゴエチレングリコール-マレイミド誘導体を生成し、逆相液体クロマトグラフィーで精製した。

(3) 周波数領域蛍光測定データからの蛍光寿命成分の解析。周波数領域蛍光測定で得られたデータより、蛍光強度の変調振幅と変調位相を変調周波数の関数として算出した。これらの実測の変調振幅と変調位相に対してモデル化した関数のフィッティングによって、蛍光寿命成分の解析を行った。励起光強度の変調を

$$L_f(t) = p \cos(2\pi ft) + q$$

とし、過渡蛍光強度を指数減衰項の線形結合

$$F(t) = \sum_j c_j \exp(-t/\tau_j)$$

とモデル化し、これによって発生する蛍光変調は畳み込み

$$F_{\text{mod},f}(t) = \int_0^{\infty} dt' L_f(t-t') F(t')$$

で与えた。ここで、 $t$  は時間、 $f$  は変調周波数、 $p, q$  は装置定数、 $\tau_j$  は蛍光寿命、 $c_j$  は減衰振幅である。フィッティングは、FORTRAN を用いて独自に開発したプログラムを用いて行った。

(4) 周波数領域蛍光偏光測定データからの蛍光異方性減衰成分の解析。周波数領域蛍光偏光測定で得られたデータより、変調異方性と変調偏光位相シフトを変調周波数の関数として算出し、モデル関数のフィッティングを行った。過渡異方性減衰は、指数減衰の線形結合として

$$r(t) = \sum_j r_j \exp(-t/\theta_j)$$

でモデル化した。ここで、 $r_j$  は各異方性減衰成分の減衰振幅、 $\theta_j$  は減衰時定数である。これと過渡蛍光強度関数  $F(t)$  との畳み込み演算を行い、変調蛍光異方性と変調偏光位相シフトのモデル関数を得た。さらに、モデル関数を実測値に対してフィットすることで、過渡異方性減衰の減衰振幅と減衰時定数を決定した。

(5) 蛍光プローブの回転ブラウン運動情報抽出。上述の方法(3)、(4)の解析で得られる異方性減衰成分の振幅と減衰時定数から、色素の回転拡散係数と円錐角を算出した。この解析には、Wobbling-in-cone モデルを使った[1]。

#### 4. 研究成果

(1) 高精度周波数領域蛍光偏光測定法の評価。本研究で開発した周波数領域蛍光偏光測定装置および解析値の精度を評価するために、水・グリセリン混合液中中の R6G の測定を行った。R6G の周波数領域蛍光および蛍光偏光のデータは、上述のモデルで良好に記述できた。さらに、粘度範囲 1–1000 mPa s で得られたデータの解析を行ったところ、R6G の蛍光寿命 3.5–3.9 ns および異方性減衰時定数 0.2–100 ns を変動係数 1% 程度の精度で決定することができた。さらに、異方性減衰時定数の粘度依存性は、1–1000 mPa s という 3 桁の範囲に渡って粘度に対して線形性を示すことを確認できた (図 1)。

(2) 長さの異なる 3 種のオリゴエチレングリコールリンカーでアクチンに係留した R6G の回転ブラウン運動の解析。G-アクチンの Cys-374 に係留された R6G の周波数領域蛍光偏光測定を行い、その回転ブラウン運動解析を行った。このような状況下の R6G の過渡異方性減衰は 2 つの指数減衰項の和で良好に記述され、これは R6G のローカルな回転運動とアクチン自身の回転が重なった結果である。R6G 過渡異方性減衰の解析によって

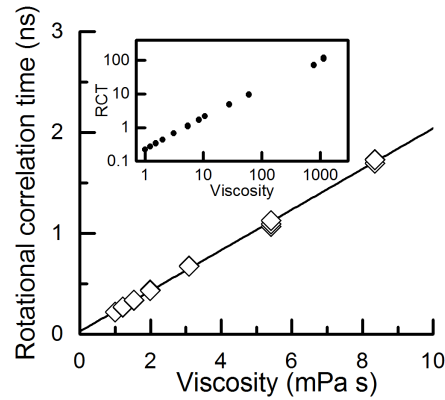


図 1. 水・グリセリン混合液中の R6G の異方性減衰時定数。

算出される異方性減衰振幅と時定数から R6G の回転ブラウン運動の情報を抽出する手法を検討した結果、本研究に必要な情報は Wobbling-in-cone モデルを使うことで抽出できることが分かった。情報抽出の結果、R6G のローカルな回転ブラウン運動の回転拡散係数は  $\sim 0.1 \text{ rad ns}^{-1}$  と算出された (図 2)。回転拡散係数や円錐角のリンカー長依存性を合わせて検討することにより、R6G のローカルな回転ブラウン運動は、アクチン周囲の水和層の流動性を反映していることを明らかにした。

(3) アクチンの重合に伴う水和層の特性変化。モノマー状態のアクチンが重合してフィラメントを形成することは、アクチンの重要な機能の一つである。そこでモノマー状態およびフィラメント状態のアクチンに係留され

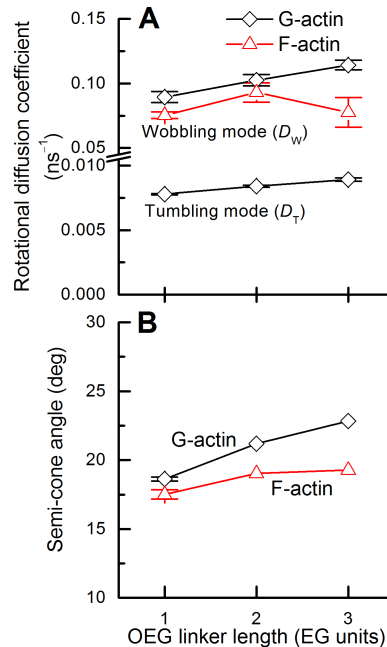


図 2. アクチンに係留された R6G の(A)回転拡散係数と(B)円錐角。

た R6G の時間分解異方性を比較した。その結果、R6G の回転拡散係数は、アクチンフィラメント形成に伴ってモノマー状態よりも 10–30%減少することが明らかになった (図 2)。

(4)アクチンの水和層に対する共溶媒効果。R6G 標識アクチンに共溶媒としてグリセリンを加えることによって、アクチン周囲の水和層の摂動を与え、水和層の性質の変化を調べた。グリセリン濃度の増加に伴い、バルク溶媒の粘度は単調に増加する。ところが、アクチンに係留された R6G の回転拡散は、グリセリン濃度の上昇に伴って加速することが明らかになった (図 3)。この結果は、共溶媒の溶媒流動性に対する効果が、アクチン周囲の水和層とバルク溶媒では異なることを示している。このデータは、アクチン周囲の水和水における hypermobility [2,3]や、選択的水和といったタンパク質周囲のローカルな溶媒効果の顕れであることが示唆される。この結果は、タンパク質の水和層の流体特性に対する共溶媒効果を実験的に捉えた初めての測定例であると思われる。

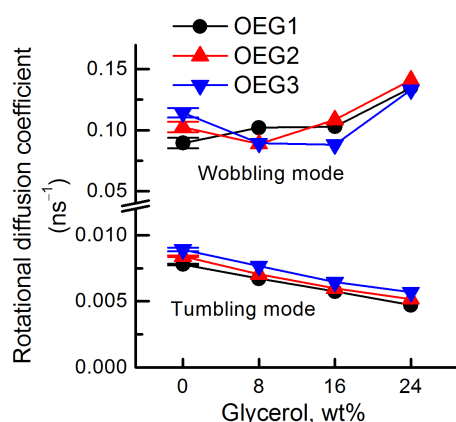


図 3 .アクチンに係留された R6G の回転拡散係数のグリセリン濃度依存性

#### <引用文献>

- (1) Lipari & Szabo (1980) *Biophys. J.* 30:489–506.
- (2) Wazawa et al (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404:985–990.
- (3) Suzuki et al (2012) *J. Phys. Soc. Jpn.* 81:SA003.

#### 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 7 件)

- (1) Wazawa, T., Morimoto, N., Nagai, T., Suzuki, M. Rotational motion of rhodamine 6G tethered to actin through oligo(ethylene glycol) linkers studied by frequency-domain fluorescence anisotropy. *Biophys.*

*Physicobiol.* Vol.12, 2015, pp.87–102, 査読有

DOI: 10.2142/biophysico.12.0\_87

- (2) Morimoto, N., Wazawa, T., Inoue, Y., Suzuki, M. Dynamic transformations of self-assembled polymeric microspheres induced by AC voltage and shear flow. *RSC. Adv.* Vol.5, 2015, pp.14851–14857, 査読有  
DOI: 10.1039/C4RA17056C
- (3) Morimoto, N., Sasaki, Y., Mitsunushi, K., Korchagina, E., Wazawa, T., Qiu, X.-P. Nomura, S., Suzuki, M., Winnik, F.M. Temperature-responsive telechelic dipalmitoylglycerol poly(N-isopropylacrylamide) vesicles: real-time morphology observation in aqueous suspension and in the presence of giant liposomes. *Chem. Commun.* Vol.50, 2014, pp.8350–8352, 査読有  
DOI: 10.1039/C4CC03199G
- (4) Morimoto, N., Muramatsu, K., Wazawa, T., Inoue, T., Suzuki, M. Self-assembled microspheres driven by dipole-dipole interactions: UCST type transition in water. *Macromol. Rapid Commun.* Vol.35, 2014, pp.103–108, 査読有  
DOI: 10.1002/marc.201300798
- (5) Wazawa, T., Yasui, S., Morimoto, N., Suzuki, M. 1,3-Diethylurea-enhanced Mg-ATPase of skeletal muscle myosin with a converse effect on the sliding motility. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol.1834, 2013, pp.2620–2629, 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.08.003
- (6) Mogami, G., Miyazaki, T., Wazawa, T., Matubayasi, N., Suzuki, M. Anion-dependence of fast relaxation component in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-halide solutions at low concentrations measured by high-resolution microwave dielectric spectroscopy. *J. Phys. Chem. A.* Vol.117, 2013, pp.4851–4862, 査読有  
DOI: 10.1021/jp4012119
- (7) Miyashita, Y., Wazawa, T., Mogami, G., Takahashi, S., Sambongi, Y., Suzuki, M. Hydration state change of horse heart cytochrome c corresponding to trifluoroacetic-acid-induced unfolding. *Biophys. J.* Vol.104, 2013, pp.163–172, 査読有  
DOI: 10.1016/j.bpj.2012.11.3825

〔学会発表〕(計6件)

- (1) Wazawa, T., Takauchi, H., Tiwari, D., Arai, Y., Matsuda, T., Nagai, T. Biocompatible superresolution imaging by polarization demodulation/excitation angle narrowing of fast photoswitching fluorescent proteins. 日本生物物理学会第53回年会, 2C1515, 石川県金沢市, 2015年9月14日
- (2) Wazawa, T., Morimoto, N., Suzuki, M. High-precision frequency-domain fluorescence anisotropy measurement using a waveguide LN modulator for dye rotational motion analysis. 日本生物物理学会第52回年会, 1P284, 2014年9月25日, 北海道札幌市
- (3) 和沢鉄一, 森本展行, 鈴木誠. アクチンに係留した蛍光色素の回転相関時間の周波数領域蛍光偏光解消法による測定. 日本生物物理学会東北支部会, 宮城県仙台市, 2013年12月13日
- (4) Wazawa, T., Morimoto, N., Suzuki, M. Rotational correlation time of a fluorophore tethered to actin as studied by frequency-domain fluorescence anisotropy measurements. 日本生物物理学会第51回年会, 1P166, 京都府京都市, 2013年10月28日
- (5) Wazawa T., Mogami, G., Morimoto, N., Ishida, N., Suzuki, M. Measurement of the local viscosity of the hydration shell around protein by time-resolved fluorescence spectroscopy. 日本生物物理学会第50回年会, 1PT182, 愛知県名古屋, 2012年9月22日
- (6) 和沢鉄一, 最上譲二, 佐川貴史, 森本展行, 鈴木誠. アクチンフィラメント周囲の高い運動性を有する水和水の蛍光法による検出. 日本蛋白質科学会年会, 3P-094, 愛知県名古屋市, 2012年6月22日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: 周波数領域蛍光測定装置  
発明者: 和沢鉄一, 鈴木誠  
権利者: 国立大学法人東北大学  
種類: 特許登録  
番号: 特許第5751563号  
出願年月日: 2014年1月8日

取得年月日: 2015年5月29日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biophys.jp/highschool/D-16.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和沢 鉄一 (WAZAWA, Tetsuichi)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授

研究者番号: 80359851