

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17814

研究課題名(和文) 蛍光寿命の相関解析による蛋白質 リガンド複合体形成機構解明

研究課題名(英文) Protein-ligand complex formation revealed by fluorescence lifetime-correlation analysis

研究代表者

乙須 拓洋 (OTOSU, Takuhiro)

埼玉大学・研究機構研究企画推進室・助教

研究者番号：90564948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の構造揺らぎは生体機能発現と深くかかわっていることから、近年盛んに研究が行われている。本研究では平衡状態での構造揺らぎ解析の重要なツールである二次元蛍光寿命相関分光法を非平衡状態ダイナミクス研究に応用可能な手法へと拡張することを目的とした研究を行った。特に本研究ではリガンドの結合により誘起される蛋白質の構造変化追跡を目的とし、ケージド化合物の光解離に基づくリガンド放出を可能とする紫外光パルスと、蛋白質の構造変化追跡用の可視光パルスを同軸入射する新たな蛍光寿命相関分光装置の立ち上げに成功した。

研究成果の概要(英文)：Conformational fluctuations of proteins are highly relevant to their biological functions. To this aim, we developed two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (2D FLCS) which analyze the conformational dynamics of biomolecules in an equilibrium by the correlation analysis of fluorescence lifetime. The aim of this study is to extend 2D FLCS to analyze the conformational dynamics in a non-equilibrium condition. For this purpose, I developed new 2D FLCS instrument which utilizes two laser pulses (UV pulse and visible pulse). UV pulse is used for uncaging the caged compound to transiently increase the ligand concentration in the focal region. The conformational change of protein caused by the interaction with the ligand is then monitored through visible pulse. Preliminary results clearly showed that the instrument developed here is applicable to analyze the ligand-induced conformational changes of proteins with 2D FLCS.

研究分野：生物物理

キーワード：蛍光寿命相関分光 蛋白質 構造ダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

蛋白質をはじめとする生体高分子の構造は、溶液中では絶えず揺らいている。この揺らぎは機能発現と深く関わっていることから、近年盛んに研究が行われている。特に生体高分子のような複雑な分子の詳細な解析には、集合平均測定ではなく、個々の分子の挙動を観察し、その統計平均による解析が最適解を与えうるとの観点から、一分子計測による解析が多く行われている。しかしながら、一分子計測、特に蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した解析においては、一分子から検出される蛍光光子の数が限られていることから、高い時間分解能での検出が困難である。

この点に関して、研究代表者は高い時間分解能で定量的な構造ダイナミクス解析を可能とする二次元蛍光寿命相関分光法(2D FLCS)の開発に携わった。この手法は生体分子の構造揺らぎを蛍光寿命の相関解析を通して検出する手法であり、マイクロ秒からミリ秒にわたる広い時間範囲で詳細な解析が可能な手法である。実際、申請者が行った研究では、ヘム蛋白質であるシトクロム *c* の天然状態における5マイクロ秒での構造揺らぎをはっきりと捉えることができた(図1)。

この研究により、2D FLCS は平衡状態での蛋白質の複雑なダイナミクスを定量的に解析する手法として非常に有用であることが示された。しかしながら、特にシグナル伝達などに関与する蛋白質においては、各種イオンや小分子、ペプチドといったリガンドとの相互作用ならびに複合体形成に伴う構造変化が機能発現に重要であり、このような構造変化を追跡するためには非平衡状態での詳細な解析が必要とされる。しかしながら、これまでの2D FLCS 研究では平衡状態での構造揺らぎの研究のみがおこなわれており、非平衡状態でのダイナミクス研究への応用が強く求められていた。

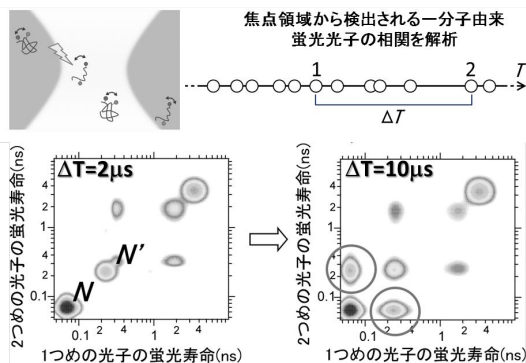


図1：2D FLCS の概略図(上)とシトクロム *c* の蛍光寿命相関マップ(下)。2 マイクロ秒では見えていなかった二つの天然状態 (*N*, *N'*) 間の相関が、10 マイクロ秒のデータでは見えている(図中丸で囲んだクロスピーク)。

2. 研究の目的

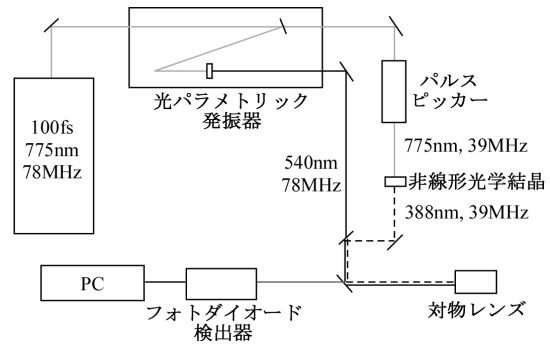


図2：新規 2D FLCS 装置

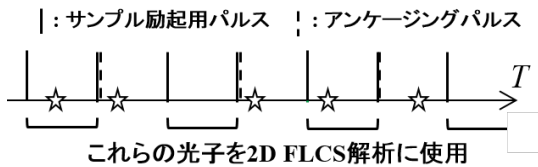


図3：サンプル上でのパルス列

本研究の目的は、生体高分子の構造ダイナミクス解析の重要なツールである 2D FLCS を非平衡状態でのダイナミクス研究に適用可能な手法へと拡張する事である。特に本研究では蛋白質-リガンド複合体形成における蛋白質動的性質の関与についての 2D FLCS 適用による定量的な解析を目的とした装置開発、ならびに応用をめざす。複合体形成における動的性質の関与についてはこれまで大きく分けて二つのモデル (conformational selection, induced-fit) が提唱されてきたが、既存の手法では時間分解能、構造分解能が低いことなどから実験的な実証は困難であった。本研究ではこの点に着目し、2D FLCS が有する高い分解能と FRET 解析による高い構造分解能を利用してこの問題に挑戦する。このような装置開発、解析手法の確立を実現することで、リガンド結合に伴う蛋白質の構造変化等平衡状態では捉えにくい構造ダイナミクスを詳細に研究する事が可能になると期待される。

3. 研究の方法

研究目的を達成するために、本研究ではケージド化合物を用い、光解離により焦点領域内のリガンド濃度を瞬間的に増加させ、同焦点内で起こる蛋白質-リガンド複合体形成過程を 2D FLCS で解析する。本研究ではそのための装置開発、手法開発、ならびに応用を行う。(1)装置開発、手法開発：本目的を達成するための装置開発として、ケージド化合物の光解離反応に必要な紫外光パルスと蛋白質構造プローブ用の可視光パルスを対物レンズに同軸入射する新たな測定装置の開発を行う。また、非平衡状態では平衡状態でのデータ解析とは異なる解析が必要となることから、新しい解析法の開発も行う。

(2)応用：応用として、本研究ではカルシウムイオン濃度に依存したカルシウム結合蛋白

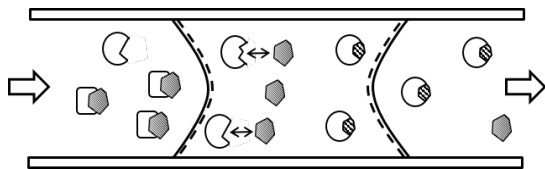


図4：焦点領域内のイメージ図．実線はサンプル励起光の可視光，点線はアンケーシング用の紫外光を表している．

質(カルモジュリン)の構造変化を解析する．そのために，蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づくダイナミクス検出のための蛍光色素(ドナー，およびアクセプター)を結合させたカルモジュリンの作成を行い，その後本測定を行う．

4. 研究成果

まず本研究を達成するために必要な装置開発を行った．開発を行った装置を図2に示す．2D FLCSは蛍光寿命の相関解析を行うため，蛍光寿命測定可能なパルス光を励起光源とする．775 nmの基本波(100 fs, 78 MHz)は光パラメトリック発振器を用いて蛋白質中 FRETドナーの励起光となる 540 nm に波長変換する．一方で基本波の残りはパルスビッカーを使って繰り返し周波数を半分にしたのち，非線形光学結晶を用いてアンケーシング用の紫外光パルスが発生させる．これら両パルス光は同軸を通し対物レンズに入射する．本装置の特長として，紫外光の繰り返し周波数を可視光の周波数の半分にしていることがあげられる．これにより入射光のパルス列は図3のようになる．図3のようにサンプル励起用の可視光パルスのみが入射しているときに得られた信号だけを解析に使うことで，紫

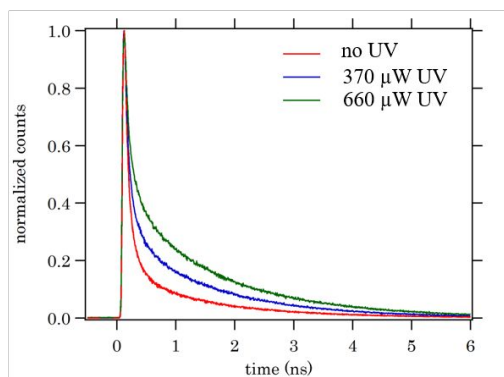
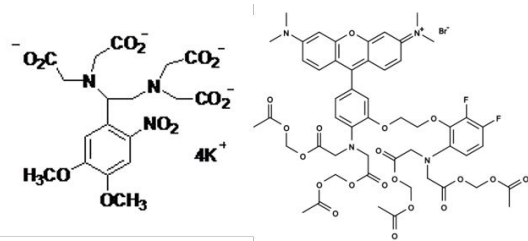


図5：DMNP-EDTA(左上)ならびに Rhod FF(右上)の化学構造．(下)UV照射(DMNP-EDTAからカルシウムイオン放出)直後の Rhod FFの蛍光減衰カーブ

外光パルスの影響なく正確な計測が可能となる．

可視光パルスで励起された分子由来の信号は単一光子検出器で検出することにより，実験開始から光子検出までの時間である絶対到着時間と励起パルスから発光までの時間に対応する相対遅延時間を全光子に対して記録することが可能となる．後者が蛍光寿命の情報をもっていることになる．2D FLCSではこの2つの時間情報をもとに解析を行う．

サンプルセルにはマイクロ流路セルを用い，蛋白質サンプルとケージド化合物の混合溶液を一方向からゆっくりとフローさせることにより，常に一定濃度のケージド化合物が焦点領域内に入るシステムを構築した(図4)．本装置の開発により，試料溶液の同位置にケージド化合物光解離用の紫外光(388 nm)と蛋白質構造変化プローブ用の可視光(540 nm)を入射できるシステムが完成した．

次に本装置の性能を評価した．性能評価では，ケージド化合物の解離によるカルシウム放出が焦点領域で起こっているかどうかを調べるために，カルシウムセンサーとなる蛍光色素を用いた．具体的には，カルシウムのケージド化合物である DMNP-EDTA とカルシウムセンサーである Rhod FFをバッファ

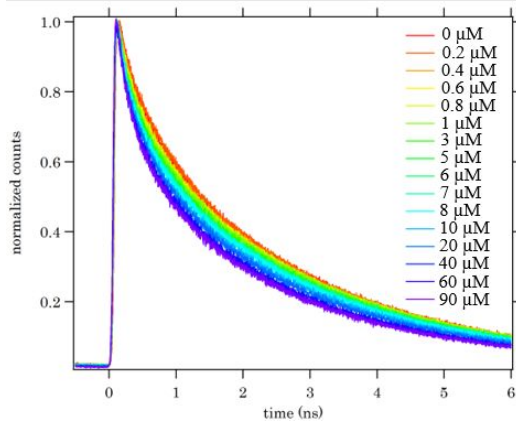
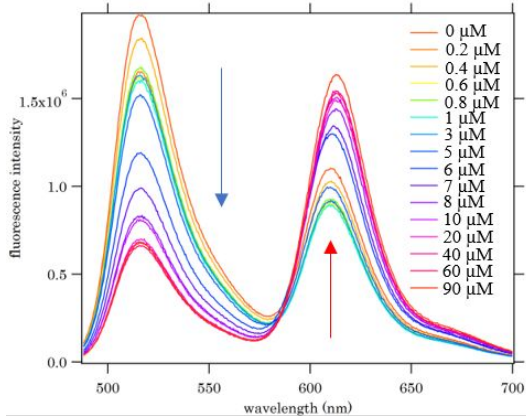


図6：(上)カルシウム濃度に依存したドナー(青矢印)ならびにアクセプター(赤矢印)の蛍光強度変化(下)カルシウム濃度に依存したドナーの蛍光減衰カーブ．カルシウム濃度は図中に記している．

に溶かしたのちマイクロ流路セル中を流し(図5上), UV照射によるDMNP-EDTAの解離ならびにカルシウム放出を, 可視光励起によるRhod FFの蛍光寿命の増加を指標として評価した. 図5下にはUV光強度に依存したRhod FFの蛍光減衰カーブを示している. 結果よりRhod FFの蛍光寿命はUV光の強度に比例して長くなった. この結果より, 焦点領域内でUV照射による過渡的なカルシウムイオンの増加が起こっていることが強く示唆された. このデータ, ならびにバルク溶液中でのカルシウム濃度依存の蛍光寿命測定の結果をもとに焦点領域内でどのくらいカルシウムイオンが放出されているかを評価した.

以上より本装置が目的を十分に達成可能なことが分かったので, 次にカルシウム結合蛋白質であるカルモジュリンの発現, 精製, ならびに色素結合を行った. 本研究では色素結合用に2つのシステインを導入したカルモジュリン変異体を大腸菌で大量発現し, カルモジュリンのみを単離精製したのち, FRETのドナー, ならびにアクセプターとなる色素を1つずつ結合させた. 未反応の色素についてはサイズ排除クロマトグラフィーで除去した. これによりカルシウム結合による構造変化をドナー蛍光寿命の変化から計測することが可能になると期待される. そこで実際にカルシウム濃度を変えながら両色素の蛍光強度, ならびにドナー蛍光寿命の測定を行った.

測定の結果を図6に示す. 図6上からわかるようにドナーならびにアクセプターの蛍光強度はカルシウム濃度に依存して大きな変化を示した. このことはこれら色素がカルモジュリンのカルシウム結合に基づく構造変化を敏感に反映していることを強く示唆する結果となった. しかしながら, 図6下に示すようにドナーの蛍光寿命は蛍光強度変化で見られたような大きな蛍光寿命の変化を示さなかった. ドナー蛍光の変化がFRETのみに起因するのであれば蛍光強度の変化と同様の蛍光寿命が観察されるはずである. つまりこの結果は, FRET以外の蛍光クエンチングが起こっていることを示す結果となった. 2D FLCSは蛍光寿命の変化を解析する手法であることから, この結果は今回作成したカルモジュリン変異体または使用したFRET色素が2D FLCSに不相当であることを示す結果となった. さらなる研究を行うには, 変異体箇所の再選定, FRET色素の選定などが必要とされる.

<引用文献>

Kunihiko Ishii and Tahei Tahara "Two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy. 1. principle" Journal of Physical Chemistry B (2013) 117 (39), 11414 ほか

Takuhiro Otsu, Kunihiko Ishii, and Tahei

Tahara "Microsecond protein dynamics observed at the single molecule level" Nature Communications 6, 7685 (2015) DOI: 10.1038/ncomms8685

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1件)

Takuhiro Otsu, Kunihiko Ishii, and Tahei Tahara "Microsecond protein dynamics observed at the single molecule level" Nature Communications 6, 7685 (2015) DOI: 10.1038/ncomms8685

[学会発表](計5件)

Takuhiro Otsu, and Shoichi Yamaguchi "Standing evanescent-wave fluorescence correlation spectroscopy for analyzing the translational diffusion in biomembranes" 252th american chemical society national meeting & exhibition, Philadelphia, Pennsylvania, USA (August 23, 2016)

猿田 萌子, 乙須 拓洋, 山口 祥一 「PEG 脂質を導入した支持脂質二重膜の拡散特性」 第54回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 茨城県つくば市 (2016年11月25日)

乙須 拓洋, 山口 祥一 「新規蛍光相関分光法に基づく生体膜分子の拡散計測に向けた観測サイズ補正法の開発」 第10回分子科学討論会, 神戸ファッションマート, 兵庫県神戸市 (2016年9月13日)

Takuhiro Otsu, Shoichi Yamaguchi "Translational diffusion in lipid membranes analyzed by standing evanescent-wave fluorescence correlation spectroscopy" 32nd Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (June 1, 2016) 大宮ソニックシティ, 埼玉

乙須 拓洋, 山口 祥一 「定在エバネッセント波を用いた蛍光相関分光装置の開発と脂質二重膜への応用」 日本化学会第96回春季年会, 同志社大学京田辺キャンパス, 京都府京田辺市 (2016年3月26日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乙須 拓洋 (OTOSU, Takuhiro)

埼玉大学, 理工学研究科・助教

研究者番号: 90564948