

新規一分子蛍光検出装置による一本鎖モネリンの 折り畳み運動の長時間観察

○前田 晃央¹、木下 雅仁¹、鎌形 清人¹、今野 卓²、後藤 祐児¹、高橋 聡^{1,3}

(¹阪大・蛋白研、²福井大・医、³CREST・JST) E-mail: m-akio@protein.osaka-u.ac.jp

【序論】 蛋白質の折り畳み反応をバルクの手法で観察すると、多くの場合に二状態的挙動が測定されるため、折り畳み反応は変性状態からの速度論的過程として記述される。しかし、蛋白質が持つ変性状態の自由度の多さや、天然状態で取り得る相互作用の数を考えると、折り畳み反応が通常の化学反応と同様に進行するとは考えにくい。すなわち、バルクの観察では分子集団の平均化により個別分子の重要な運動が平均化され、二状態的な挙動しか検出されていない可能性がある。我々のグループでは、一分子の蛋白質を観測することで折り畳み運動に関する新たな知見を得ることを目指してきた。これまでに開発した手法により、サブミリ秒の時間分解能で固定化しない試料一分子の折り畳み運動の観測が可能になった。その測定結果から、蛋白質の折り畳みに周期的な運動が存在することが示唆されたが、観測可能な最大時間が 100ms と比較的短く、十分な検討ができなかった。そこで本研究では、高い時間分解能を保ちつつ一分子の運動を長時間観測できる手法の開発を目指した。観測の対象としては、 α/β 蛋白質であり折り畳み速度が比較的遅い一本鎖モネリン (SMN) を用いた。

【装置開発】 これまでの測定方法では、蛍光色素修飾した蛋白質の希薄溶液をキャピラリーに一定流速で流し、試料の発する蛍光を CCD により輝線として観測した。そのため、一分子の総観測時間が輝線の長さに限られるという問題があった。本測定では試料の流速を遅くして観測範囲に分子が留まる時間を長くするとともに、フレーム転送型 EMCCD を使うことでデータの読み出しを高速にした。この場合、一分子の蛍光は多数枚の画像として取得されるため、読み出し速度が時間分解能に対応する。開発した装置を使うことで、色素一分子の蛍光強度変化を 1ms の時間分解能で約 5 秒間観測することに成功した。これは従来法の観測時間と比較して 10 倍以上の改善となった。

【実験と結果】 SMN の折り畳み運動を蛍光強度の変化で観測するために、SMN の C 末端にシステインを導入し、蛍光プローブである Cy3 の修飾を行った。作成した Cy3 修飾 SMN (Cy3SMN) の折り畳み反応を調べるために、Cy3 由来の蛍光を用いてバルク観察によりグアニジン塩酸塩 (GdmCl) による平衡変性実験を行った。その結果、図 1(A)に○で示すように、1.5M GdmCl 存在下で蛍光強度が天然状態の 1.2 倍に増大し、3.0M GdmCl 存在下で 0.7 倍まで減少した。1.5M GdmCl 存在下における蛍光強度の増大は中間体の形成を示し、3.0M における減少は変性状態の増加を示すと考えられる。このように、Cy3 の蛍光が Cy3SMN の変性過程を反映することを確認した。

次に、Cy3SMN の折り畳み運動を一分子レベルで調べるために、開発した装置を用いて GdmCl 濃度 0.5M, 1.5M, 2.0M, 3.0M における蛍光強度変化を測定した。図 1(A)に各 GdmCl 濃度で得られた一分子の蛍光強度の平均値を▽で示す。これらの値がバルクの測定で得られた平衡変性曲線と定性的に一致することから、観測されたのは Cy3SMN 一分子であることが強く示唆された。

さらに、一分子の蛍光強度がどのような状態に対応するのかを調べるために、蛍光強度の頻度分布をプロットした [図 1(B)]。得られたプロットから、蛍光強度の弱い「状態 1」と強度の強い「状態 2」の二つの状態の存在が示された。状態 2 の頻度は 0.5M から 1.5M GdmCl にかけて増加し、1.5M から 3.0M にかけて減少した。このことから、状態 2 の増加は中間体の増加を反映すると考えた。一方で「状態 1」の頻度は、0.5M から 3.0M にかけて顕著な変化を見せなかった。これは、天然状態と変性状態の蛍光強度が近いいため、本測定精度では区別ができないためと考えた。

【考察】 図 2(A) に Cy3SMN 一分子の代表的な時系列データを示した。上から 0.5M, 1.5M, 3.0M GdmCl 存在下で得られたデータに対応する。各データに潜む運動の時間スケールを見積もるため、自己相関係数を計算した。図 2(B)に示すように、全てのデータには時定数が数十 ms の比較的速い緩和が観測された。この緩和は、強度変化を伴わないデータでも観測されたことから、一つの状態内の運動だと考えられる。一方で、相関時間 100ms 以降の領域において、特徴的な周期運動が観測された。周期には GdmCl 濃度依存性があり、0.5M, 1.5M, 3.0M においてそれぞれ 100ms, 160ms, 300ms であった。このような周期運動は単純な反応速度論では説明ができず、蛋白質特有の運動を表していると考えられる。SMN の疎水的コアと Cy3 修飾部の C 末端は天然状態および中間体において距離的に近いと考えられるため、疎水的コアの形成および解離運動と同期して蛍光強度の振動が生じている可能性を提案する。

本研究から、SMN の折り畳み運動はバルクの実験で得られるような単純な反応ではなく、複雑な周期運動を内在することが明らかになった。今後、これらの周期運動が SMN の折り畳み過程にどう寄与するのかを検討する予定である。

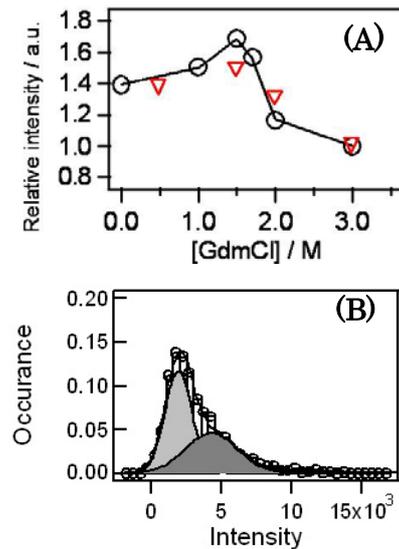


図 1. Cy3SMN の蛍光強度
A) 多分子系の測定(○)と一分子測定(△)で得られた Cy3SMN の蛍光強度の比較。**B)** 0.5M GdmCl 存在下における Cy3SMN 一分子の蛍光強度の頻度。

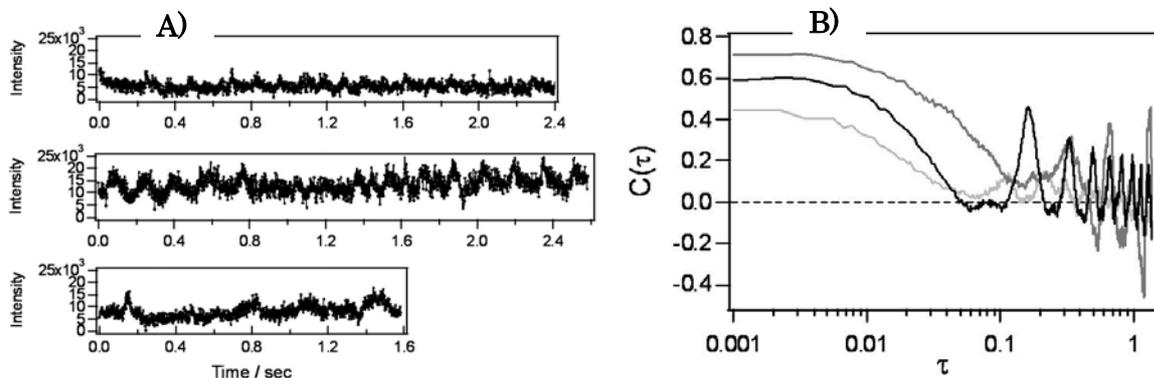


図 2. Cy3SMN 一分子の蛍光強度変化。開発した装置を用いて各 GdmCl 濃度における Cy3SMN の蛍光強度変化を測定した。(A)代表的な時系列データ。上から 0.5M, 1.5M, 3.0M GdmCl 存在下に対応する。(B)各時系列データの自己相関係数。薄い灰色が 0.5M, 黒が 1.5M, 濃い灰色が 3.0M GdmCl 存在下に対応する。