

ユビキチンの折り畳みダイナミクスの一分子蛍光分光測定

(東北大院・理¹, 東北大多元研², IBC Academia Sinica³)

○齊藤 雅嵩^{1,2}, Chen Eric H.-L.³, Chen Po-Ting³, Chen Rita P.-Y.³,

鎌形 清人^{1,2}, 小井川 浩之^{1,2}, 高橋 聡^{1,2}

Folding dynamics of ubiquitin detected by single molecule fluorescence spectroscopy

(Grad. Sch. Sci., Tohoku Univ.¹, IMRAM, Tohoku Univ.², IBC, Academia Sinica³)

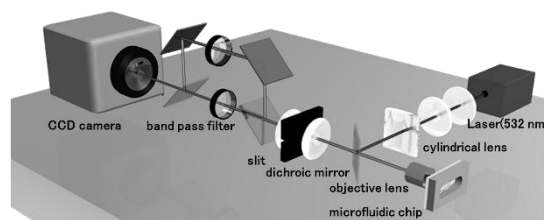
○Saito Masataka^{1,2}, Chen Eric H.-L.³, Chen Po-Ting³, Chen Rita P.-Y.³,

Kamagata Kiyoto^{1,2}, Oikawa Hiroyuki^{1,2}, Takahashi Satoshi^{1,2}

【序】 蛋白質は数十から数百のアミノ酸が連なった分子であり、多くの蛋白質が特有の構造に折り畳まれる。蛋白質はその構造の自由度とは対照的に、素早く折り畳まれることが知られている。そこで私たちは、折り畳みのモデル蛋白質であるユビキチンに注目して研究を行っている。Piana らによる全原子分子動力学シミュレーションによって、ユビキチンの折り畳み過程のミリ秒からサブミリ秒の時間領域における複雑なダイナミクスの存在が推測されている[1]。しかし、推測された複雑な過程を、通常の多分子測定で実験的に明らかにすることは困難である。そこで、私たちは一分子蛍光分光測定によりユビキチンの折り畳みダイナミクスを明らかにすることを考えた。ユビキチンに二種類の異なる蛍光色素を修飾し、それら色素間のフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を観測することで、ユビキチンの構造変化を一分子レベルで推定できる。本研究では、独自の一分子蛍光分光装置を用いることで、試料を高速で流しながら 100 μ s の高い時間分解能での測定を行った[2]。そのため、様々な変性剤濃度の平衡条件での一分子測定を行うことで、複雑なダイナミクスを検出できる可能性がある。

【実験】 ユビキチンの変異体に蛍光色素 ATT0532 と Alexa647 を一分子ずつ共有結合させ、色素間の FRET を観測した。

Fig. 1 に一分子蛍光分光測定装置の概略図を示す。励起光(532 nm)は、シリンドリカルレンズを透過したのちに対物レンズによってマイクロ流路内にライン状に集光される。試料溶液を流路内に流しながら測定を行うことで、試料分子は蛍光を放出しながら集光領域を進む。試料分子からの蛍光を、同じ対



Longer observation time: ~ 5 ms
Higher time resolution: less than 100 μ s

Fig. 1 一分子蛍光分光測定装置の略図

物レンズにより集光し、その波長によりそれぞれの色素に分離して検出した。得られた蛍光強度の時系列データから、FRET 効率の時系列データを算出した。

【結果と考察】 蛍光色素標識されたユビキチンを用いて、一分子蛍光分光測定を行い、異なる変性剤濃度で多数の時系列データを得た (Fig. 2)。変性剤濃度が低い時には、得られたトレースは高い FRET 効率に分布しており、コンパクトな天然状態構造をとっていると考えられる。変性剤濃度が高くなるにつれて低い FRET 効率を示す分布が増え、高い変性剤濃度条件ではほとんどの分子が低い FRET 効率を示した。低い FRET 効率の分布は、変性により広がった構造を持つ分子に対応すると考えられる。FRET 効率の分布の変化が、天然状態構造から変性構造への転移を示すことから、ユビキチンは二状態的に折り畳まれることが結論できる。

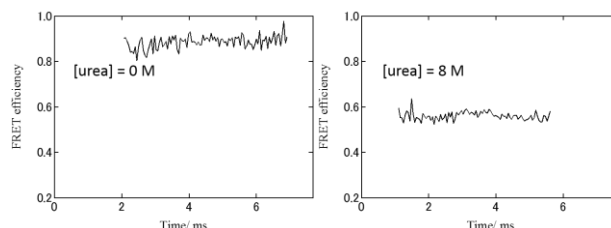


Fig. 2 FRET 効率の一分子時系列データの例

次に、それぞれの蛍光色素の平均の蛍光強度から予測される FRET 効率の分布幅を計算し、実験で得られた分布幅との比較を行った [3]。Fig. 3 の点線は、予測された天然状態の分布幅であり、実験結果とよく一致した。これは、天然状態の試料は均一であり、構造揺らぎによる FRET 効率の変化を示さないことを意味する。

一方で、変性剤濃度が高い条件では、実験で得られた分布幅が、予測された分布幅 (実線) よりも明らかに大きくなった。また、各トレースを調べると、ほぼ一定の FRET 効率を示す分子がほとんどだった。これらの結果は、変性状態の蛋白質が不均一な構造を持つ分子の集合体であることを意味する。

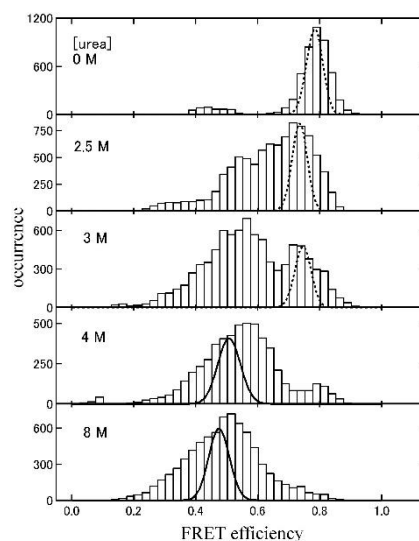


Fig. 3 FRET 効率のヒストグラム

変性した蛋白質はランダムコイルの性質を持ち、数十ナノ秒の時間スケールで素早く運動すると報告されている。そのため、ユビキチンの変性状態が単純なランダムコイルであるなら、我々の測定の時間分解能である 100 μ s の間に構造が時間的に平均化され、狭い分布を示すはずである。ところが、今回の結果はユビキチンの変性状態が不均一であることを示した。これらのことから、ユビキチンの変性状態は部分的な構造を保持しており、それらの遷移は観測時間数ミリ秒以上の長い時間スケールで起こると考えられる。ユビキチンの高度な安定性は、部分的な二次構造の壊れにくさによるものかもしれない。