

3P073

マイクロ秒分解一分子 FRET 測定による  
タンパク質折り畳みダイナミクスの追跡  
(東北大・多元研<sup>1</sup>, 東大院・総合文化<sup>2</sup>, 浜松ホトニクス<sup>3</sup>,  
光産業創成大学院大<sup>4</sup>, 岡山大院・自然科学<sup>5</sup>)

○小井川 浩之<sup>1</sup>, 新井 宗仁<sup>2</sup>, 深澤 宏仁<sup>3,4</sup>, 横田 浩章<sup>4</sup>, 井出 徹<sup>5</sup>, 高橋 聡<sup>1</sup>

Tracking microsecond single-molecule FRET dynamics on protein folding

(IMRAM, Tohoku Univ.<sup>1</sup>, Dept. Life Sci., Univ. Tokyo<sup>2</sup>, Hamamatsu Photonics<sup>3</sup>, GPI<sup>4</sup>, Grad. Sch. Nat. Sci. and Tech., Okayama Univ.<sup>5</sup>)

○Hiroyuki Oikawa<sup>1</sup>, Munehito Arai<sup>2</sup>, Atsuhito Fukasawa<sup>3,4</sup>, Hiroaki Yokota<sup>4</sup>, Toru Ide<sup>5</sup>, Satoshi Takahashi<sup>1</sup>

【序】タンパク質の構造変化と機能の関わりを理解するためには、タンパク質のダイナミクスの詳細を追跡することが有効である。近年、長時間の分子動力学計算によってミリ秒以内に起きる構造変化が重要な役割を果たすことが明らかになってきている。一方で、タンパク質の高速運動を観察し、分子動力学計算の結果と比較できるような実験的手法として、一分子蛍光測定が挙げられる。しかし、従来の一分子蛍光測定法では、時間分解能がミリ秒程度に制限されるため、ミリ秒以内の構造変化を、一分子追跡することは困難だった。

私達は、一分子蛍光分光法を用いることで、タンパク質の折り畳み運動の詳細を追跡することを目指している。私達はライン共焦点光学系とマイクロ流路チップを組み合わせることでフローセル中を高速で流れる一分子の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効率を100マイクロ秒以下の時間分解能で数ミリ秒間継続観察できる装置を開発した<sup>1</sup>。この装置を用いて二重蛍光標識したプロテイン A の B ドメイン(BdpA)の平衡変性における構造変化を追跡し、BdpA の変性状態がミリ秒以下の時間スケールで見ると比較的不均一な構造集団であることを示した<sup>1,2</sup>。

【実験】通常の共焦点光学系で溶液中の蛍光標識されたタンパク質を観察する場合、レーザーの励起スポットに拡散してきたタンパク質分子からの蛍光を検出する。このときの信号の継続時間は分子が励起スポットを横切る時間である数ミリ秒である。通常の実験条件では、試料溶液にレーザーを強く照射しても、得られる蛍光光子数には限度がある。しかし、試料溶液を高速で流しながら観測を行うと、試料溶液中の溶存酸素分子の働きにより単位時間内に観察できる蛍光光子数が格段に増加する。こ

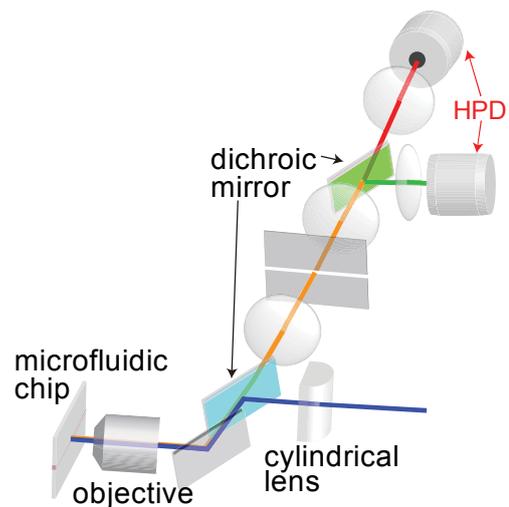


図 1 HPD とマイクロ流路チップを組み込んだ二色蛍光ライン共焦点顕微鏡

の現象を利用するために、私達が開発した装置では、石英ガラス製のマイクロ流路チップ使った試料のフロー装置と、レーザーの照射領域をフローセルの流路方向に伸長させたライン共焦点光学系組み合わせている。この工夫により単位時間内に得られる光子数は増やしつつ、試料分子が励起スポットに滞在する時間を延長することに成功した<sup>1</sup>。

しかし、私達がとらえたい折り畳み構造転移は、多くても数ミリ秒に一回程度しか起こらないまれな現象であり、またその構造転移も 100 マイクロ秒以下の時間スケールで終了してしまう。したがって、折り畳みの構造転移の詳細を追跡するためには、時間分解能のさらなる向上と一分子の継続観察時間の延長が必要である。

私達のこれまでの装置では流路を流れる一分子の軌跡を CCD カメラで撮影して、事前に測定した流速をもとに、蛍光強度の時間変化を求めていた。したがって、時間分解能を向上させるためには、より速く試料溶液を流す必要があった。しかし、それでは時間分解能は向上しても、一分子当たりの継続観察時間は短くなってしまう。そこで、光学系はほぼそのまま検出器を CCD から光子計数型の検出器であるハイブリッド光検出器(HPD)に変更した装置を開発した(図 1)。HPD は一分子からの蛍光を検出できる高感度と高速応答性を兼ね備え、しかも受光面が大きいという性質を持つため、CCD カメラを容易に置き換えることができる。また、HPD を使えば流速に関係なく蛍光強度の時間変化をマイクロ秒時間分解能で記録することができる。

**【結果】** HPD を使った装置で二重蛍光標識された BdpA 一分子の FRET 効率変化を測定した結果が図 2 である。10 マイクロ秒以下の時間分解能で、5 ミリ秒以上の間、一分子の FRET 効率を追跡することができた。

この改良によって得られた高時間分解能の測定結果について報告する。

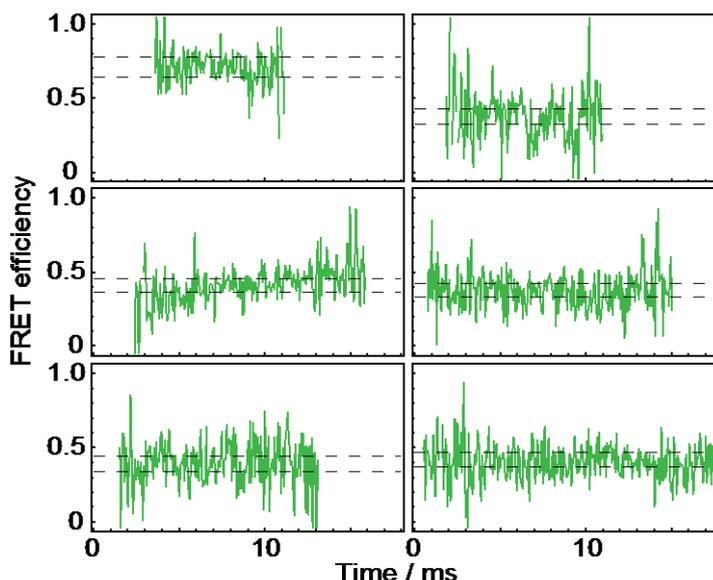


図 2 HPD を使った装置で測定した変性剤溶液中での二重蛍光標識された一分子 BdpA の FRET 効率変化

[1] H. Oikawa *et al.*, *Sci. Rep.*, 3, 2151, (2013). [2] H. Oikawa *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 119, 6081, (2015).