

酸素センサータンパク質 FixL のアロステリックダイナミクス

(阪大院・理¹, 理研・横浜², 兵庫県立大学³)○山脇竹生¹, 水野操¹, 石川春人¹, 中村寛夫², 城宜嗣³, 水谷泰久¹

Allosteric Dynamics of the Oxygen Sensor Protein FixL

(Osaka University¹, RIKEN Yokohama², University of Hyogo³) ○Takeo Yamawaki¹, MisaoMizuno¹, Haruto Ishikawa¹, Hiro Nakamura², Yoshitsugu Shiro³, Yasuhisa Mizutani¹

序論 FixL はマメ科植物と共生する根粒菌に含まれる酸素センサータンパク質で、細胞内酸素濃度を感知する。その立体構造は、センサードメインとリン酸化ドメインの 2 つのドメインから構成される。酸素濃度が高まると、センサードメインに含まれるヘムに酸素が結合し、センサードメインの構造変化が誘起される。そして、この構造変化がリン酸化ドメインへと伝達し、リン酸化ドメインのリン酸化活性が抑制されると考えられている。われわれは、構造変化と機能活性との相関をもとにして FixL の機能制御メカニズムを調べている¹。ドメイン間のアロステリックな構造変化による機能制御は興味深いが、FixL の立体構造や構造変化の情報がこれまでに報告されていなかったため、酸素の脱着に伴う FixL のアロステリックダイナミクスはわかっていなかった。本研究では、酸素の脱離に伴う FixL の構造ダイナミクスを時間分解共鳴ラマン測定によってとらえ、ドメイン間のアロステリックな構造変化を明らかにした。

実験 タンパク質試料は大腸菌発現したものをカラムクロマトグラフィーで精製した。時間分解共鳴ラマンスペクトル測定は、ポンプ光に波長 532 nm、プローブ光に波長 233 nm のパルス光を用いて行った。ポンプ光、プローブ光ともにパルス幅は約 20 ns であった。

結果 酸素のヘムからの脱離に伴う野生型 (WT) FixL の構造変化を調べるため、酸素の光解離に伴う時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを観測した。スペクトル変化を詳しく調べるため、生の時間分解スペクトルからプローブ光のみを照射して得たスペクトルを引いた差スペクトルを計算した。このとき、934 cm⁻¹に観測された過塩素酸イオン由来のバンドを用いて自己吸収の効果を補正した。計算された差スペクトルを図 1 に示す。酸素脱離後 0.16–25 μs の間でチロシン (Tyr) 残基由来の Y1, Y7a, Y8a, Y9a バンドの強度が時間とともに減少した。

WT で観測された Tyr 残基由来のバンド強度変化について、FixL に含まれる複数の Tyr 残基のうち、各 Tyr 残基の成分を次のようにして求めた。特定の Tyr をフェニルアラニン (Phe) 残基に置換することで、その Tyr 残基のスペクトルへの寄与を除くことができる。Tyr 残基の置換が、タンパク質の立体構造およびダイナミクスに影響を及ぼさないと仮定すると、WT のスペクトルと、Tyr を Phe 残

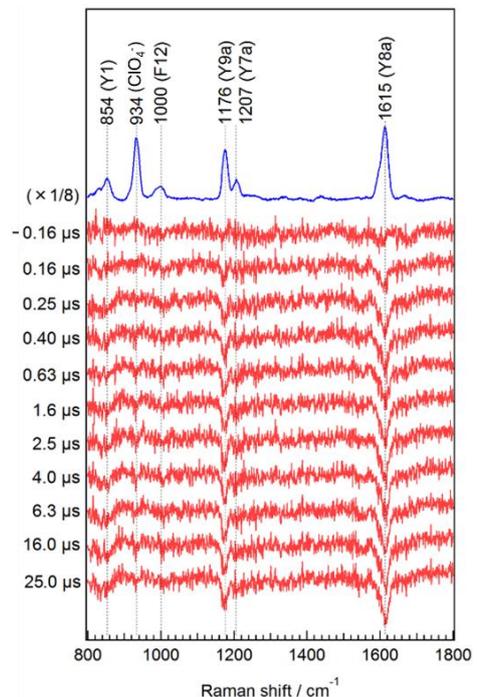


図 1: 酸素結合形 WT-FixL の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。生の時間分解スペクトルからプローブ光のみを照射して得たスペクトルを引いた差スペクトルを赤で示す。比較のため酸素結合形のスペクトルを青で示す。

基に置換した変異体のスペクトルとを比較することで、スペクトル中に含まれる個々の Tyr 残基の成分を計算することができる。アミノ酸置換による立体構造の変化を最小限にするため、アミノ酸置換は特定の Tyr 残基 1 カ所のみとし、さらに、置換によってリン酸化活性が失われないことをリン酸化活性測定により確認した。

センサードメインに含まれる Tyr201 残基のスペクトル変化を解析した結果を図 2 に示す。WT で強度変化の大きかった Y8a バンドに着目し、酸素結合形におけるバンド強度に対する、差スペクトルのバンド強度の比を計算した。それを■で示す。また、Y201F 変異体についての強度比を▲で示す。●は両者の差で、Tyr201 の成分を表している。Tyr201 の成分は、装置応答時間 (約 50 ns) 内の強度変化と、時定数 $5.2 \pm 0.4 \mu\text{s}$ の指数関数的変化でよく表された (実線)。この他に、センサードメインに含まれる Tyr190、リン酸化ドメインに含まれる Tyr297、Tyr379、Tyr496 の成分を同様に解析した。いずれも一成分の指数関数的変化を示した (表 1)。

考察 センサードメインのみのタンパク質についての時間分解紫外共鳴ラマン分光法の研究では、主として Tyr201 の寄与を反映した Y8a バンドの強度減少が観測され、その時定数は約 $0.1 \mu\text{s}$ であることが報告されている³。今回観測した、リン酸化ドメインも含むタンパク質では、それより 1 桁大きな約 $5 \mu\text{s}$ の時定数の強度減少がみられた。このことは、リン酸化ドメインが、センサードメインの動きに影響を与えていることを示している。

また、時間分解可視共鳴ラマン分光法でヘムおよびヘム周辺の構造を調べた研究²では、センサードメインのみの場合、時定数 $0.2-0.3 \mu\text{s}$ 、リン酸化ドメインも含む場合、時定数 $1-3 \mu\text{s}$ の変化が観測されており、今回観測された時定数とほぼ整合している。このことは、ヘムと Tyr201 周辺の構造変化が連動していることを示唆する。

表 1 をみると、センサードメインに含まれる Tyr190 および Tyr201、リン酸化ドメインに含まれる Tyr297 および Tyr379 の変化の時定数はどれもマイクロ秒のオーダーであることがわかる。上に述べたようにヘムの構造変化は時定数 $1-3 \mu\text{s}$ の成分を持つことから、FixL において、酸素の脱離に伴って、ヘム、センサードメインおよびリン酸化ドメインの一部 (Tyr297 と Tyr379 の周辺構造) は、ほぼ一体となって構造変化を起こすことが示唆される。これは、リン酸化ドメインの有無によってセンサードメインの構造変化の速さが影響を受けることも整合する。一方、Tyr496 が 10 マイクロ秒のオーダーで変化していることから、ヘムの構造変化と連動したタンパク質構造の変化のうち、リン酸化ドメインにはさらに構造変化が起きることがわかった。

以上のように、各 Tyr 残基に由来するスペクトルの成分を求めることで、ドメイン間に互いに連動した構造変化があることを明らかにした。このようなドメイン間の連動した構造変化は FixL の機能制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

(1) Yamawaki, T.; Ishikawa, H.; Mizuno, M.; Nakamura, H.; Shiro, Y.; Mizutani, Y., *Biochemistry* **2016**, 55, 4035. (2) Hiruma, Y.; Kikuchi, A.; Tanaka, A.; Shiro, Y.; Mizutani, Y., *Biochemistry* **2007**, 46, 6086. (3) Yano, S.; Ishikawa, H.; Mizuno, M.; Nakamura, H.; Shiro, Y.; Mizutani, Y., *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 15786.

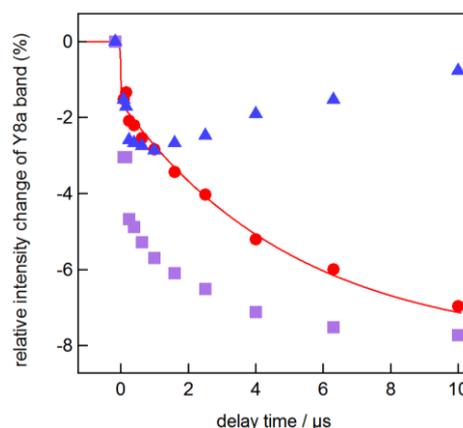


図 2: 酸素脱離に伴う WT-FixL (■)、Y201F 変異体 (▲) の Y8a バンド強度の時間変化。WT から Y201F の強度を引いて計算した強度 (●) を Tyr201 の成分と考えた。

表 1: 各 Tyr 残基のスペクトル変化の時定数

		時定数 / μs
センサードメイン	Tyr190	2.8 ± 0.2
	Tyr201	5.2 ± 0.4
リン酸化ドメイン	Tyr297	1.6 ± 0.4
	Tyr379	2.6 ± 0.4
	Tyr496	20.1 ± 11.4

2F04

パルス交替励起方式を用いた二次元蛍光寿命相関分光法の開発

(¹理研・田原分子分光、²理研・光量子工学領域、³Carleton College)

○石井邦彦^{1,2}、水野耀^{1,3}、坂口美幸¹、Bidyut Sarkar¹、田原太平^{1,2}

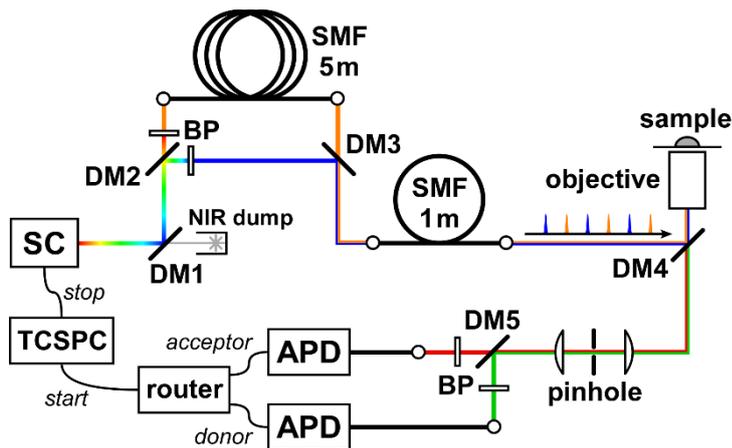
Development of two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy with pulsed interleaved excitation

(¹Mol. Spectrosc. Lab., RIKEN; ²RIKEN Center for Advanced Photonics; ³Carleton College)

○Kunihiko Ishii^{1,2}, Hikaru Mizuno^{1,3}, Miyuki Sakaguchi¹, Bidyut Sarkar¹, Tahei Tahara^{1,2}

【序】生体高分子などの複雑な分子系の物理化学においては、不均一な構造分布や構造間の自発的な遷移が重要なテーマになる。我々は最近、蛍光寿命を利用した一分子レベルの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 測定と光子相関計測を組み合わせた二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) を開発し、生体高分子の構造多様性とマイクロ秒オーダーの構造間遷移の観測に応用してきた[1-4]。FRET を用いた実験では測定対象をドナー・アクセプターの二種類の蛍光色素で標識するが、現実にはすべての分子に確実に標識することは難しく、また測定中に色素の褪色が進むため、片方の色素しか含まない分子の共存が避けられない。最近一分子 FRET の分野では、より精度の高い計測を行うため、パルス交替励起 (PIE) の実験が提唱され、成果が上げられている[5,6]。PIE の特長は、アクセプターを直接励起するパルス光を新たに導入することで、アクセプターが失活した分子の影響やドナー色素とアクセプター色素の吸収/蛍光スペクトルの重なりの影響を定量的に評価でき、FRET 効率を正確に定められる点である。本研究では、2D-FLCS に PIE を取り入れるために新たな装置を製作し、得られた光子データの二次元相関解析を試みた。

【装置】構築した装置の概略を図 1 に示す。光源としてドナー励起用・アクセプター励起用の二色のパルス光が必要になるため、スーパーコンティニウム光源 (Fianium WL-SC400-8PPC) を用いて 20 MHz の白色パルス光出力を得、これを二分割してそれぞれ異なるバンドパスフィルターを用いて波長を選択した。PIE では二色の光パルスを時間的にずらして同一分子に交互に照射し、これらの光に対する応答を調べる。そこで本装置では長波長側 (563 nm) の光を 5 m のシングルモードファイバーに通して約 25 ns の遅延を与えた。これを短波長側の光 (482 nm) と合わせて別のシングルモードファイバーに通し、二色の光の空間的な重なりを確保した。この光パルス列をデュアルバンドダイクロイックミラー (DM4, Chroma ZT488/561rpc) を用いて水浸対物レンズ (Nikon Plan Apo VC 60×A WI) に導き、希薄な FRET 標識試料溶液 (数 nM) に集光した。DM4 を透過した蛍光光子のドナー/アクセプター成分を分離し、それぞれ別の光子検出器で検出した。各光子の到着時刻と 20 MHz の参照信号からの遅延時間を時間相関光子計数モジュール (Becker & Hickl SPC-130EM) を用いて記録した。



SC: supercontinuum light source
 DM: dichroic mirror
 BP: bandpass filter
 SMF: single-mode fiber
 APD: avalanche photodiode
 TCSPC: time-correlated single-photon counting module

図1 PIE-2D-FLCS 装置の概略。

【解析】二次元相関解析は、既報の 2D-FLCS および二色検出 2D-FLCS[7]に準じて行った。光子列データを検索して任意の時間間隔 (ΔT) で検出された光子対を抽出し、それらの検出波長 (D:525nm/A:609nm) と参照信号からの遅延時間に従って分類した二次元ヒストグラムを作成した (図2)。さらに無相関バックグラウンドを差し引き、以降の解析に用いた。

【測定例】試料として、相補的な配列をもつ2種類の一本鎖DNAオリゴマーに FRET 対をなす蛍光色素 (ドナー: 6-FAM、アクセプター: TAMRA) を片方ずつ標識し、2:1の濃度比で混合したものを用いた。図2a-dは $\Delta T=10-500 \mu s$ での二次元相関マップである。482nm 励起時のドナー蛍光光子の遅延時間分布は対をなす蛍光光子の種類ごとに変化しており (図3)、アクセプター励起光を導入した効果が見られる。講演ではこのデータの詳細な解析について述べる。

【参考文献】[1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414-11422; 11423-11432 (2013). [2] T. Otsu, K. Ishii, and T. Tahara, *Nat. Commun.* **6**, 7685 (2015). [3] 乙須・石井・小井川・新井・高橋・田原、第8回分子科学討論会 3A13 (2014). [4] Cheng・石井・田原、第8回分子科学討論会 3A14 (2014). [5] J. Hendrix and D. C. Lamb, *Methods Enzymol.* **518**, 205 (2013). [6] L. Olofsson and E. Margeat, *Opt. Express* **21**, 3370 (2013). [7] 石井・Cheng・田原、第7回分子科学討論会 2D20 (2013).

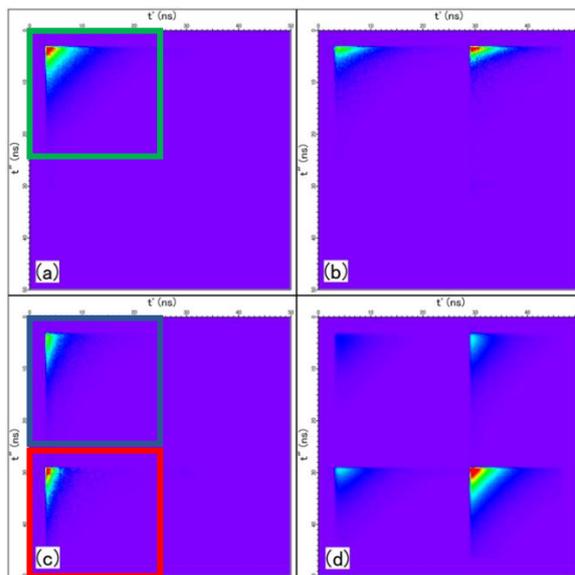


図2 二次元光子相関マップ。各パネルに2つの検出波長での自己/相互相関を示す ((a) D-D, (b) A-D, (c) D-A, (d) A-A)。各パネルの左(上)側が482nm 励起時(prompt)、右(下)側が563nm 励起時(delayed)の蛍光信号を表す。

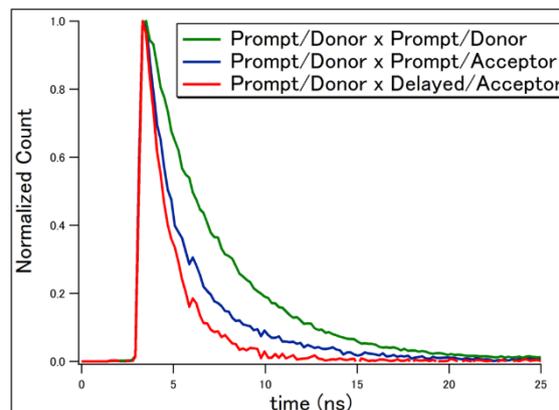


図3 図2に示した3つの領域を縦に積分して得たドナー蛍光の遅延時間分布。

独立成分分析 tICA によるヒストンテールのダイナミクス解析： 遅い運動の特徴と多様性

(横浜市大院・生命医科学) ○ 瀧上 壮太郎

Conformational dynamics of histone tails investigated by time-structure based independent component analysis: Characteristics and diversity of slow dynamics

(Yokohama City University) ○ Sotaro Fuchigami

【序】ヒストンテールは DNA をコンパクトに収納する役割を担うヒストンの末端部分であり、特定の構造をとらない天然変性領域である。DNA の転写はヒストンテールの様々な翻訳後修飾によって誘起・制御されている。その実現にはヒストンテールの柔軟さが重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子機構は十分に解明されていない。そこで本研究では、ヒストンテールの動的挙動を解明すべく、分子動力学(MD)シミュレーションを実行した。時間構造に基づいた独立成分分析(tICA)を用いて、得られた結果から遅い時間スケールの運動を抽出し、その特徴と多様性を明らかにすることを旨とした。

【方法:分子動力学シミュレーション】ヒストン H2A/H2B 二量体の3つのテール、H2A の N 末端テール(14 残基)および C 末端テール(31 残基)、H2B の N 末端テール(34 残基)、を対象として、水を陽に含んだ系(図1)の全原子 MD シミュレーションを行った。シミュレーションの実行には MD シミュレーションソフトウェア MARBLE を使用し、力場は CHARMM22/CMAP を用いた。系に周期境界条件を課し、静電相互作用は Particle Mesh Ewald 法で計算した。作成した初期構造をエネルギー最小化し、NPT アンサンブル(圧力: 1 atm, 温度: 300 K)で平衡化を行った後、1 μ s の本計算を5回実行した。

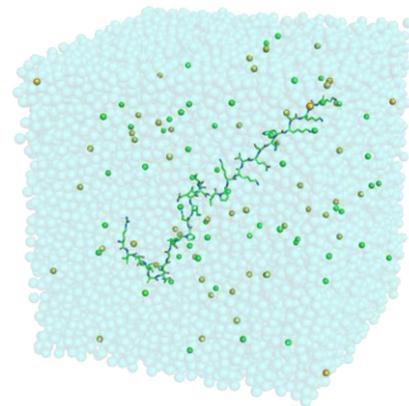


図1: 水溶液中のヒストン H2A の C 末端テール。

【方法: tICA の概略】時系列データ $x(t)$ を tICA で解析するには、まず共分散行列 $C = \langle (x(t) - \langle x(t) \rangle) {}^t(x(t) - \langle x(t) \rangle) \rangle$ と時間遅れ共分散行列 $\bar{C} = \langle (x(t) - \langle x(t) \rangle) {}^t(x(t+t_0) - \langle x(t) \rangle) \rangle$ を計算し、続いて一般化固有値問題 $\bar{C}F = CFK$ を解く。ここで、 F は固有ベクトル行列、 K は固有値行列。本研究では、遅延時間パラメーター t_0 を 1 ns とした。tICA では、固有ベクトル f_i は非直交基底をなしており、対となるベクトル $g_i = Cf_i$ が独立成分の運動方向を表わすモードベクトルとなる。固有値は独立成分の運動の時間スケールを特徴づけている。主鎖二面角の時系列データを解析する場合、座標の周期性のため単純平均が意味をなさず、そのままでは上記の解析を適用することができない。そこで、各二面角 θ_i を二次元の座標 $(\cos \theta_i, \sin \theta_i)$ に変換し、その時系列データを解析の対象とした。

【結果】3つのヒストンテールを対象とした5回のシミュレーションの結果いずれにおいても、ヒストンテールが特定の構造で安定することなく、大きく揺らいでいる様子が観察された(図2)。また、揺らぎの時間スケールに注目すると、サブマイクロ秒オーダーの遅い時間スケールの揺らぎが含まれていることがわかった。

続いて、このヒストンテールの遅い運動の実態を調べるべく、主鎖二面角 ϕ , ψ の時系列データを tICA で解析した。得られた独立成分(IC)で表される運動のうち、上位のもの時間スケールを調べたところ、どのシミュレーションにおいても数十ナノ秒以上の遅い運動が起きていることが判明し、tICA によって遅い運動が確かに抽出できていることが確認できた。また、主鎖二面角の時間変化から、これらの遅い運動が実際に起こっていることも確認できた。

以上のように tICA で特定された遅い運動は、複数の状態間の構造転移として特徴づけられることも明らかとなった。例えば、図3左に示した H2A の C 末端テールの結果では、第1独立成分(IC1)によって構造分布が大きく2つの状態に分けられることがわかる。IC1 はこれらの状態間の構造転移の運動を表していると考えられる。IC1 で特定された2つの状態は、第2独立成分(IC2)によって、さらに複数の状態へと分割される様子が見てとれ、より詳細な状態間の構造転移としてヒストンテールの運動を捉えることが可能となっている。一方、主成分分析(PCA)では、状態を明瞭に区別することはできないことがわかる(図3右)。

続いて、複数回実行したシミュレーションそれぞれの解析結果を比較したところ、期待に反して、共通する遅い運動はごくわずかしか見つからず、シミュレーションごとに異なった遅い運動が起きていることがわかった(図4)。この事実は、ヒストンテールが示す遅い運動が多様であることを意味していると同時に、ヒストンテールが取り得る構造を経巡るためには1 μ s という時間は十分でないことを示唆している。

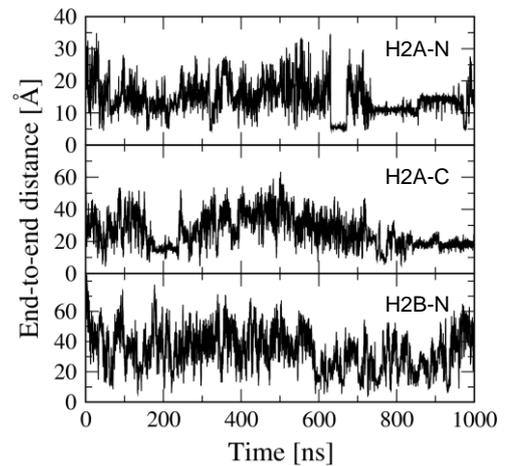


図2：末端間距離の時間変化。3つのヒストンテールそれぞれの1本目の結果。

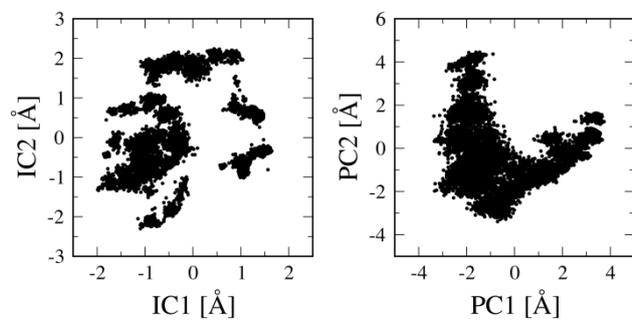


図3：tICA(左)およびPCA(右)で定義された低次元空間における構造分布。対象:H2AのC末端テールの1本目。

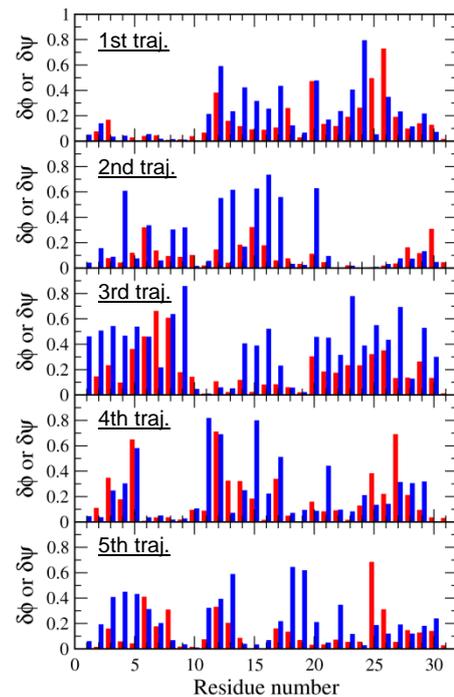


図4：IC1における主鎖二面角の変位の大きさ。対象:H2AのC末端テール。

2F06

ライン共焦点顕微鏡によるタンパク質の構造形成運動の一分子蛍光観察
(東北大学・多元研) ○高橋 聡、齊藤 雅嵩、鎌形 清人、小井川 浩之

Single molecule fluorescence investigation on the folding process of proteins based on line confocal microscopy

(IMRAM, Tohoku University) ○Satoshi Takahashi, Masataka Saito,
Kiyoto Kamagata, Hiroyuki Oikawa

タンパク質は、アミノ酸が一次的につながった高分子鎖であり、無数の構造を持つ変性状態から、唯一の構造を持つ折り畳まれた状態に構造形成する（フォールディングする）能力をもつ。タンパク質フォールディングの分子機構を理解することで、タンパク質の構造予測やデザインなどに役立つ知見が得られると期待される。多くのタンパク質のフォールディングは協同的に起こり、変性した状態と折り畳まれた状態の二状態を仮定することで説明が可能である。この事実は、変性タンパク質が持つ多数の構造間に速い交換があるために平均化が起こり、変性状態が単一の状態と見なせるからと理解される。一方で、変性タンパク質の運動性や構造特性について、互いに矛盾するデータが報告されコンセンサスが得られない状況が続いているほか、フォールディング転移の協同性が成立する根拠に疑問が持たれる場合もある。

変性タンパク質の物性に関して様々な議論がなされている[1]。第一の議論点は、変性したタンパク質の大きさに関するものである。X線小角散乱法によると、変性したタンパク質の回転半径は大きく、変性剤がない溶液中においてもコイル状態の高分子鎖に期待される大きさを保っている。一方で、一分子蛍光観察法による二残基間の距離測定によると、変性剤が存在しない環境下における変性タンパク質の回転半径は小さいことが推定される。第二の議論点は、変性したタンパク質が変性状態内において示す揺らぎ運動の時定数に関するものである。蛍光相関分光法を用いることで、変性したタンパク質にラベルした二つの蛍光色素間の揺らぎ運動は数十ナノ秒の時定数を持つことが測定されている。一方で、マイクロ秒やミリ秒の時間領域におけるゆっくりした揺らぎ運動が示唆されるデータも報告されている。第三の議論点は、変性したタンパク質の不均一性に関するものである。変性したタンパク質は、ランダムで多数の構造を持つけれども、異なる構造間の交換の時定数が十分に短い場合は、平均構造のみが観察されるはずである。一方で、変性タンパク質の二残基間の距離として、一分子蛍光観察法では広い分布が観察されることが多い。従来の一分子蛍光観察法の時間分解能が数ミリ秒程度であることを考えると、変性タンパク質にはミリ秒以上の寿命を持つ構造の不均一性が残っていることを示唆する。

我々は、蛍光一分子分光法を用いることで、タンパク質のフォールディング運動の解明に取り組んできた。我々の手法の特徴は、ライン共焦点顕微鏡という独自の計測手段により、一分子連続蛍光測定における時間分解能を従来の数ミリ秒から数十マイクロ秒にまで短縮したことである[2]。また、一

分子蛍光測定における構造情報の分解能も劇的に向上させた。この装置を用いることで、従来法では解明が難しかった変性タンパク質における構造、揺らぎ運動の時定数、さらに、不均一性等について知見が得られると期待される。

ユビキチンについて得られた結果の例を説明する[3]。76 残基長のユビキチンの 1 番目と 65 番目のアミノ酸に異なる蛍光色素を部位特異的にラベル化した試料について、色素間の励起状態移動 (FRET) 効率を一分子レベルで測定し、変性剤濃度の異なる溶液中における効率分布を測定した。変性剤濃度が低い場合には、効率 0.8 付近に折り畳まれた状態にアサインできるピークが観察された。このピークの線幅は狭く、構造が均一であることが示された。一方で、変性剤濃度が高い場合には、FRET 効率が 0.4 から 0.6 にわたり幅広いピークが観察された。このピークは変性状態にアサインできるが、データを 1ms の時間幅で平均化した後のピークの線幅が、単一構造を仮定した場合のノイズ幅よりも明らかに広がった。この事実は、ユビキチンの変性状態において構造の不均一性が存在すること、さらに、不均一な構造間の転移がミリ秒以上のゆっくりした時定数で起きることを示している。

変性状態のタンパク質における不均一性とゆっくりした構造揺らぎは、プロテイン A の B ドメインにおいても観察された[4]。また、他のタンパク質についても類似した現象が示唆されている。一方で、変性したタンパク質において、非常に速い構造の交換が起きることも確立された観察事実である。幾つものタンパク質で、タンパク質にラベル化した色素間の距離が数十ナノ秒の時間領域で揺らぐことが観察されている。速い構造揺らぎが起きることと同時に、なぜミリ秒よりも長い寿命を持つ構造の不均一性が観察されるのだろうか？

我々は、変性したタンパク質の主鎖の収縮と伸張を伴う大規模な運動はマイクロ秒以下の時定数で起きるものの、ペプチド鎖の局所的な構造の寿命は長く、ラベル化を導入した色素周辺の構造の不均一性を引き起こすのではないかと解釈した。蛍光相関分光法で観察された速い揺らぎは前者を、我々が観察した遅い揺らぎは後者を観察したものであり、変性タンパク質の運動の異なる側面を捉えたものであると解釈した。

我々の提案が正しければ、変性剤が低濃度の条件において、局所的な構造転移の時定数がユビキチンのフォールディングの時定数よりも長い値になる可能性がある。今後、一分子蛍光観察装置と溶液混合装置を組み合わせることで、より詳しい解析が可能になると思われる。また、我々の観測の時間分解能をさらに向上させることも重要な課題である。これらの試みについても報告する。

引用文献

- [1] Takahashi, S.; Kamagata, K.; Oikawa, H. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *36*, 1–9.
- [2] Oikawa, H.; Suzuki, Y.; Saito, M.; Kamagata, K.; Arai, M.; Takahashi, S. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2151.
- [3] Saito, M.; Kamonprasertsuk, S.; Suzuki, S.; Nanatani, K.; Oikawa, H.; Kushiro, K.; Takai, M.; Chen, P.-T.; Chen, E. H.-L.; Chen, R. P.-Y.; Takahashi, S. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *in press*.
- [4] Oikawa, H.; Kamagata, K.; Arai, M.; Takahashi, S. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 6081–6091.

クライオ1分子蛍光イメージングによる高精度三次元位置決定

(東工大・物理¹,京大院 医²,理研CLST³)本橋 和也¹・古林 琢¹・若尾 佳祐¹・松下 道雄¹・石川 冬木²・喜井 勲³・〇藤芳 暁¹“Precise Three-Dimensional Localization of Individual Molecules
by Cryogenic Fluorescence Microscope”¹Department of Physics, Tokyo Institute of Technology, ²Department of Gene Mechanism, Kyoto University, ³RIKEN, Center for Life Science Technologies (CLST).K. Motohashi¹, T. Furubayashi¹, K. Wakao¹, M. Matsushita¹, F. Ishikawa², I. Kii³ & S. Fujiyoshi¹

生命現象では、多種多様な生体分子が相互に作用しながら、三次元ネットワークをつくり生理機能を発現・調整していると考えられている。このような複雑系を理解するためには、その現場である細胞内部を分子レベルで知ることが不可欠である。しかし、既存法ではこのような観察は不可能である。例えば、細胞が観察できる最も高解像度なクライオ電子線トモグラフィー(cryo-ET)でも、その解像度は4-5 nmと分子レベルに達していない[1]。その結果として分子の帰属もできない。そこで我々は分子解像度の三次元イメージングを目指して、クライオ1分子蛍光顕微鏡の独自開発を続けている。蛍光イメージングにはcryo-ETにない3つの利点がある。第一に1分子の感度が実現している点である[2]。解像度を突き詰めていくと最終的には1分子からの信号を観察しなければならないため、1分子の感度は必須条件である。第二に、蛍光イメージングでは分子の帰属が可能である点である。たとえば、Green Fluorescent Protein (GFP)をターゲットのタンパク質に融合させれば、生細胞中でターゲット分子のみを選択的に可視化できる。つまり解像度と無関係に分子の帰属が可能である。第三に、細胞のような厚さ(約十ミクロン)のある試料の観察が可能である点である。これらの利点がある反面、欠点は解像度の低さである。現在、蛍光顕微鏡の解像度は、固定化した細胞に対して超解像顕微法を用いれば約20 nmに改善するが[3]それでもcryo-ETにははるかに及ばない。生細胞ではさらに悪化することが報告されている[4]。解像度を悪くしているのは(1)分子の動きと(2)顕微鏡の不安定性である。そこで我々は(1)について、cryo-ETと同様、試料を急速凍結することで分子の動きを完全に止めて観察することを考えている。(2)について、対物レンズや低温槽、顕微光学系の部品を、機械的安定性が得られるように、独自に開発することでナノメートルの安定性を実現した[5]。これらの結果、ごく最近、我々は標準偏差(σ) \sim 1 nmで3次元位置を1分子ごとに決定できるクライオ蛍光顕微鏡を開発した。そこで、本講演ではこの顕微鏡の詳細を報告する。

目標とする分子解像度について説明する。図1Aは原点(0 nm, 0 nm)にある蛍光分子を $\sigma = 1$ nmの精度で50回測定を繰り返した場合に、観察される分子の位置のシミュレーション結果である(ピンクの十字)。一般的に、画像の解像度は 2σ ないし半値全幅(2.4σ)で定義され、視覚的にも半径 $2\sigma = 2$ nmの円(白線)内にほとんどの点が集まっているのが分かる。この結果とGFPの立体構造[PDB code: 1EMA](図1b)を比較すると、半径 2σ の円はGFPの大きさとほぼ等しく、 σ が1 nmあれば分子を見分けることができることが分かる。そこで、ここでは $\sigma \leq 1$ nmを分子解像度と定義する。

実験 観察に用いた顕微鏡はすでに報告したクライオ蛍光顕微鏡[2]をベースにしている。報告した顕微鏡との大きな違いは光検出器が一次元のもの(アバランシェフォトダイオード)から二次元(CCD)になったことである。

図2に、開発したクライオ蛍光顕微鏡の光学系をしめす。対物レンズの焦平面方向をxy、深さ方向をzと定義する。図2aに、xy方向の位置決めをするための光学系をしめす。波長637 nmの励起光をビームスプリッター(DM)によって反射させ、クライオスタット中に設置した対物レンズによって、試料へ集光する。試料は、静電容量センサーによって安定化させたピエゾスキャナーに載っている。ターゲットからの蛍光(波長 \sim 700 nm)を同じ対物レンズで集める。ターゲット1分子からの蛍光はDMを通過し、凹面鏡によってCCD面内に結像させる。この像を正規分布でフィッ

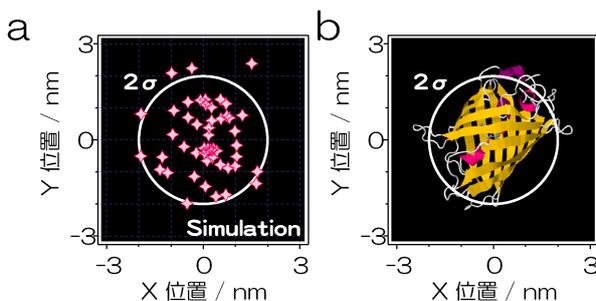


図1. 分子解像度とは。原点にある分子を標準偏差 $\sigma = 1$ nmの精度で50回測定を繰り返した時に観察される分子の位置のシミュレーション(a).GFPの立体構造(b).

ングすることで、ターゲットの位置を1分子決定できる[6]。深さ z の位置を決める場合には、図2bの位置に凸面単レンズ ($f = 5,000 \text{ mm}$) を挿入すると、このレンズと CM との合成焦点は CCD の手前に来る。このように、CCD 上ではぼやけた像とすると、深さ z 方向の位置情報をスポットの幅として取得することができる[7]。この系での光学シミュレーションなどの結果は本討論会ポスター発表 (3P095) で議論する [8]。

顕微鏡を評価するテスト試料には量子ドット (Qdot705, Thermo Fisher) 緩衝溶液のスピコート膜を用いた。Qdot を1分子観察すると、一般的な色素よりも2桁以上強く蛍光する。そこで、色素での実験を想定して蛍光量が $\sim 5,000 \text{ s}^{-1}$ になるように励起光強度を調整した。測定温度は 1.7 K で、試料と対物レンズは液体ヘリウム中に浸して測定した。

結果 図3に、3次元方向に対する Qdot の1分子位置決定の実験結果をしめす。試料の温度が 1.7 K であるため、Qdot は基板に完全に固定されている。顕微鏡の性能を評価するため、Qdot の位置を低温ステージによって $5 \sim 10 \text{ nm}$ ずつ動かし、蛍光イメージから得られた分子の位置を観察した。図中の丸 (○) が蛍光イメージから求めた色素の位置であり、黒線 (—) がセンサーによって求めたステージの位置である。図3を見ると、ステージの位置の移動量だけ、蛍光イメージで得られた分子の位置も動いていることが分かる。それぞれの図の下に、蛍光イメージから求めた位置からセンサーから求めた位置を引き算した結果を丸 (○) で示す。これらのデータの標準偏差 σ を求めると、 1.1 nm (z 軸)、 1.0 nm (x 軸)、 1.1 nm (y 軸) となった。これが顕微鏡の精度になる。この測定の1点あたりの積算時間は 192 s (z 方向)、 4 s (xy 方向) であり、同じ精度を得るのに、 z 方向と xy 方向では 50 倍も積算時間 t が違う。これは、主に、この顕微鏡で得られる蛍光イメージが、回折現象によって z 方向に伸びた楕円形をしているからである。以上より、開発したクライオ蛍光顕微鏡を用いれば、 xyz すべての軸に対して、分子解像度で1分子イメージングできることが確認できた。

参考文献

- [1] S. Nickell, C. Kofler, A.P. Leis & W. Baumeister, *Nature Review* **7**, 225 (2008).
- [2] W.E. Moerner & L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535 (1989).
- [3] E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davison, J.L. Schwartz, H.F. Hess, *Science*, **313**, 1642, (2006).
- [4] H. Shroff, C.G. Galbraith, J.A. Galbraith & E. Betzig, *Nat. Meth.* **5**, 417 (2008).
- [5] H. Inagawa, Y. Toratani, K. Motohashi, I. Nakamura, M. Matsushita & S. Fujiyoshi, *Sci. Rep.* **5**, 12833, (2015).
- [6] R.E. Thompson, D.R. Larson & W.W. Webb, *Biophys. J.* **82**, 2775 (2002).
- [7] H.P. Kao & A.S. Verkman, *Biophys. J.* **67**, 1291 (1994).
- [8] ○古林琢、松下道雄、藤芳暁、分子科学討論会 2016, 3P095.

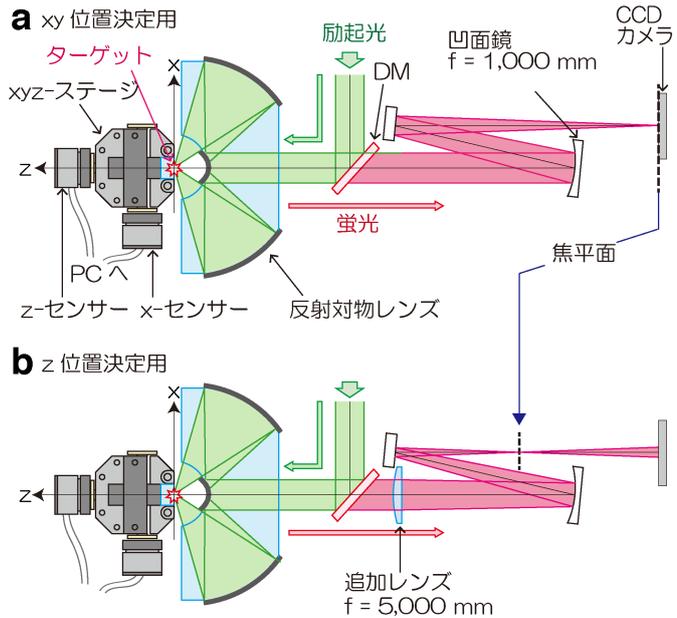


図2. xy 位置決定および z 位置決定のための光学系。

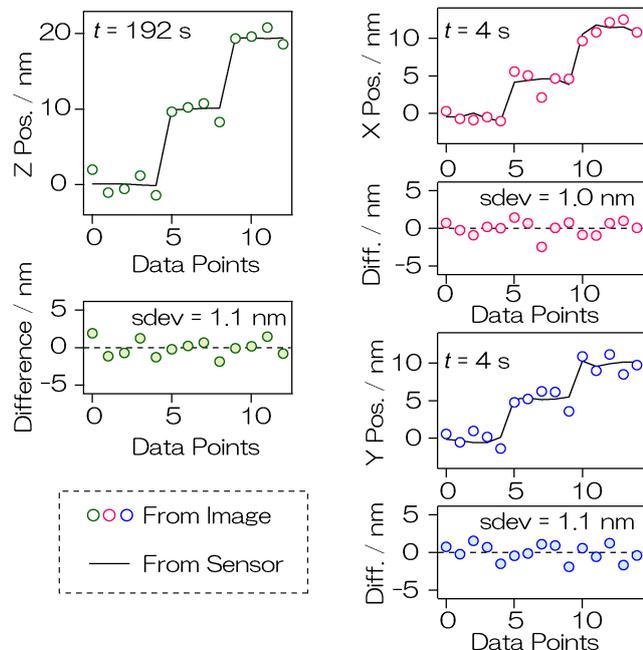


図3. 温度 1.7 K における Qdot の xyz 位置の一分子観察。丸が蛍光イメージから求めた色素の位置、黒線が静電容量センサーから求めた低温ステージの位置。それぞれのデータの下に、イメージから得られた位置からセンサーから得られた位置を引き算したものをしめす。

2F09

タンパク質間相互作用の粗視化モデルに関する理論的研究

(金沢大・理工) ○川口一朋、長尾秀実

Theoretical study of a coarse-grained model for protein-protein interaction

(Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ.) ○Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao

【序】細胞中のタンパク質内あるいはタンパク質間には様々な相互作用が働く。これらの相互作用はタンパク質のフォールディングや会合・解離を促進するため、タンパク質の機能にとって重要な役割を果たす。特に、タンパク質表面に存在する親水性領域、疎水性領域のために、タンパク質間相互作用は複雑なものとなり、会合・解離過程や複合体構造を予測することは簡単ではない。大規模なタンパク質複合体の会合・解離過程や構造安定性を議論するためには、粗視化モデルを用いたシミュレーションが有効である。しかし、タンパク質の粗視化モデルでは、原子レベルの構造情報が失われておりタンパク質間の相互作用を十分に取り入れることが難しい。そのため、アミノ酸残基レベルでの相互作用ポテンシャルの構築が必須である。

我々はこれまでに、水溶液中のタンパク質と基質分子間に働く有効相互作用を、全原子分子動力学(MD)シミュレーションと熱力学的積分法を用いた自由エネルギー計算により求め、タンパク質と基質の間に実効的な引力が働くことを明らかにしてきた[1, 2]。そこで本研究では、大規模なタンパク質の会合・解離による複合体形成過程をシミュレーションにより議論するために、タンパク質間に働く有効相互作用の単純な粗視化モデルを構築する。水溶液中で、疎水性アミノ酸であるアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンの側鎖間に働く有効相互作用を全原子分子動力学シミュレーションにより求める。得られた自由エネルギー曲線を分子間距離の関数でフィッティングし、モデルポテンシャルを決定する。得られたポテンシャルを用いてGCN-pLI四量体の会合に関する粗視化シミュレーションを行い、我々の粗視化モデルの妥当性を示す。

【方法】水溶液中で、疎水性アミノ酸側鎖間に働く有効相互作用を側鎖間距離の関数として求める。有効相互作用の計算には全原子分子動力学シミュレーションと熱力学的積分法を用いた自由エネルギー計算を用いる。全原子分子動力学シミュレーションにより得られた平均力 $\langle F(r) \rangle$ を以下に示すように四つの相互作用に分割する。

$$\langle F(r) \rangle = \langle F_{\text{vdw}}^{\text{dir}}(r) \rangle + \langle F_{\text{vdw}}^{\text{ind}}(r) \rangle + \langle F_{\text{clb}}^{\text{dir}}(r) \rangle + \langle F_{\text{clb}}^{\text{ind}}(r) \rangle$$

ここで、添え字'dir'および'ind'は側鎖間の直接相互作用および側鎖と溶媒分子間の間接相互作用を表す。添え字'vdw'および'clb'はVDW相互作用および静電相互作用を示す。これら四つの平均力をモデルポテンシャルでフィッティングし、ポテンシャルパラメータを決定する。

得られたポテンシャルとパラメータを用いて、GCN-pLI四量体の会合シミュレーションを行う。GCN-pLIは33残基からなり一つの α ヘリックスを持つタンパク質で、疎水性相互作用により会合することがわかっている。GCN-pLIのX線結晶構造(PDB ID: 1UO2)を用いて、四つのタンパク質をランダムに配置する。タンパク質内の相互作用にはG \ddot{o} -likeモデルを適用する。タンパク質間の相互作用として、疎水性アミノ酸残基間には本研究で得られた粗視化ポテンシャルを用いる。それ以外のすべてのアミノ酸残基間の相互作用には斥力のみポテンシャルを用いる。疎水性引力のみでGCN-pLIが複合体を形成することを示す。タンパク質の拡散係数を $1.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ と仮定し、時間刻みを10 fsとしてランジュバン方程式を解く。

【結果と考察】全原子分子動力学シミュレーションと熱力学積分法による自由エネルギー計算により得られたアミノ酸残基間の有効相互作用を以下の式でフィッティングした結果、タンパク質間相互作用

用として以下のモデルポテンシャルを決定した。

$$V_{\text{inter}} = \sum_{i,j} \varepsilon_{ij}^{\text{LJ}} \left\{ \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right\} - \frac{\pi p_0}{12} \sum_{i,j} (r_{ij} - l_{ij})^2 (r_{ij} + 2l_{ij}) \\ + \sum_{k=1}^2 \left[\varepsilon_{ij}^{\text{G}(k)} \exp \left\{ - \left(\frac{r_{ij} - \lambda_{ij}^{(k)}}{\sigma_{ij}^{(k)}} \right)^2 \right\} \right] + \sum_{i,j \neq \text{hydrophobic}} \varepsilon_{\text{rep}} \left(\frac{C}{r_{ij}} \right)^{12}$$

r_{ij} は二つのアミノ酸側鎖の重心間距離を示す。その他のパラメータを有効相互作用計算の結果から決定する。右辺第一項はアミノ酸残基間の直接VDW相互作用をフィッティングしたもので、その他の項は溶媒からの間接VDW相互作用をフィッティングしたものを表す。疎水性アミノ酸では静電相互作用の効果はほぼ0であったため、タンパク質間相互作用には取り入れなかった。

得られたタンパク質間相互作用をGō-likeモデルと組み合わせてGCN-pLI四量体の粗視化シミュレーションを行った。X線結晶構造を参照構造として、シミュレーションで得られた四量体構造のRMSDの時間変化を図1に示す。ランダムに配置した状態からシミュレーションをはじめ、1 μs程度で複合体を形成していることがわかる。図2A、Bに粗視化シミュレーションで得られた構造とX線結晶構造を重ね合わせたものを示す。RMSDの値から示されているように、X線結晶構造に近い複合体構造が得られている。図2C、Dに示す球はGCN-pLIの疎水性アミノ酸を示している。各タンパク質が疎水性領域を内側に向けて会合していることがわかる。我々の提案したタンパク質間相互作用の粗視化モデルポテンシャルが疎水性相互作用によって形成されるGCN4-pLIの複合体構造を再現できることを示した。

【参考文献】

- [1] K. Kawaguchi, H. Saito, H. Nagao, JPS Conf. Proc., 1 (2014) 012056.
 [2] K. Kawaguchi, H. Saito, H. Nagao, Molecular Simulation, 42 (2016) 896-901.

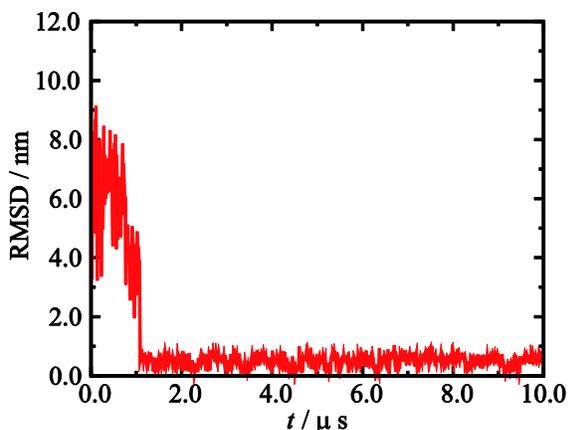


図1: 複合体構造のRMSDの時間変化。

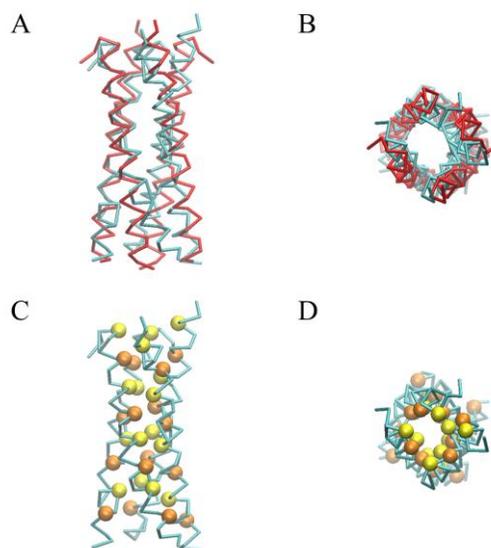


図2: シミュレーションで得られた複合体構造とX線結晶構造 (PDB ID: 1UO2)。

2F10

タンパク質 DNA 複合体のマルチスケールモデリング：

粗視化モデルから原子モデル構造の構築

(京都大学大学院理学研究科) ○清水将裕、高田彰二

Multiscale modeling of protein-DNA complexes:

From coarse-grained model to atomic model structure

【序】 生体高分子における粗視化分子動力学計算では、比較的長い時間スケールの分子動態、または多数の生体分子を含む系を解析できる。それにより、実測が困難な生体高分子の準安定状態、あるいは大きな生体分子複合体の解析が可能である。私たちは今まで、アミノ酸をそれぞれ一粒子で表現するタンパク質モデル(AICG2+モデル(1))、塩基・リン酸・糖をそれぞれ一粒子で表現する DNA モデル(3SPN.1 モデル、3SPN.2C モデル(2,3))を組み合わせることで、構造が未解明の DNA-タンパク質複合体の全体像を研究してきた。

生体分子の大きなスケールの運動が見え、未知の構造を探索しやすいことが粗視化計算の利点である。他方、見つけた構造の安定性を評価するには詳細な原子配置が分かっているほうがよい。そこで、粗視化モデルを原子モデルに変換する方法が必要になる。

本研究では、粗視化モデル (AICG2+モデルと 3SPN.2C モデル) で表された DNA-タンパク質複合体に対して、全原子の配置を推定する方法を構築した。次に、この手法で生成した原子モデルを初期状態として全原子分子動力学計算を行った。それにより、構築した手法を用いることで粗視化 DNA-タンパク質複合体の安定性をより詳細に解析できるかどうか、検討した。

【実験】 まず初めに、DNA 粗視化モデルである 3SPN.2C モデルを原子モデルに変換する方法を検討した。以下の 3 種を試した。3SPN.2C モデルは、塩基、リン酸、糖、それぞれの重心に粗視化粒子を配置する。このモデルは B 型 DNA に近い場合の挙動を解析するのに用いられる。

- デオキシリボヌクレオチド(dAMP, dGMP, dTMP, dCMP)の、B 型 DNA での原子配置を調べた。そしてその原子配置での塩基・リン酸・糖の重心を求めた。この重心 3 点を粗視化モデルの一つのヌクレオチドに重ね合わせ、そこから各原子の位置を決定した。これをすべてのヌクレオチドに対して行うことで、粗視化モデルから原子モデルを構成した。
- タンパク質の C α 原子の座標から主鎖の構造を構築する BBQ(4)の手法を参考に、PDB データバンク (<http://www.rcsb.org/pdb/>) 上の構造を用いて原子配置を予測する手法を模索した。
- a)と同様、各ヌクレオチドの原子セットを塩基・リン酸・糖の重心座標を用いて粗視化モデルに重ね合わせた。今回は C3'-O3' 結合や C1'-N9 結合を回転させることで、各重心座標の位置関係が粗視化モデルの粒子の位置関係により近くなるよう、ヌクレオチドの原子セットを調節した。また、糖の五員環のコンフォメーションについても複数のパターンを用意した。

それぞれの方法で原子モデルが精度よく構築できるかどうかは、PDB データバンクからダウンロードした DNA 構造のデータセットを用いてテストした。

次に、DNA-タンパク質複合体の原子モデル構築法を検討した。タンパク質の粗視化モデルである AICG2+は C α 炭素の位置に粗視化粒子を配置する。C α 炭素の位置から主鎖の構造を構築する方法、さらに側鎖を付加する方法は以前に報告されている(4-6)。私たちは DNA には開発した手法を用い、タンパク質には既存の方法を用いて粗視化 DNA-タンパク質モデルを原子モデルに変換した。変換したモデルで全原子分子動力学計算が可能かどうか、検討した。特に分子間の接触面で粗視化モデルから全原子モデルを構築した際に立体衝突が生じる可能性があり、その場合 DNA-タンパク質複合体は非常にエネルギーが高い状態になる。この問題を分析した。

【結果と考察】 粗視化 DNA モデルから原子モデルを構築する方法について、a) では DNA の概形は粗視化モデルと合致していた。また、ヌクレオチド間の原子間距離もそれほど不自然ではなかった。タンパク質との複合体においても、全原子分子動力学計算を行うことが可能であった。ただ、元の粗視化モデルの粒子の位置と、原子モデルの塩基・リン酸・糖の重心の位置は少しずれており、改善の余地があることが分かった。これは、重ね合わせに用いたヌクレオチドの原子モデルが、すべて同一のコンフォメーションであることに起因する。b) での結果は、糖・塩基の環のサイズの拡大・縮小が起こるという点で、良い結果は得られなかった。c) の構築法を用いた場合に、粗視化モデルとよく合致し、PDB データバンクの構造をよく再現した。また、DNA-タンパク質複合体をモデリングした際に、全原子分子動力学計算で解析が十分可能であった。

1. Li W, Terakawa T, Wang W, Takada S. Energy landscape and multiroute folding of topologically complex proteins adenylate kinase and 2ouf-knot. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(44):17789-94.
2. Sambriski EJ, Schwartz DC, de Pablo JJ. A mesoscale model of DNA and its renaturation. *Biophys J*. 2009;96(5):1675-90.
3. Freeman GS, Hinckley DM, Lequieu JP, Whitmer JK, de Pablo JJ. Coarse-grained modeling of DNA curvature. *J Chem Phys*. 2014;141(16).
4. Gront D, Kmiecik S, Kolinski A. Backbone building from quadrilaterals: A fast and accurate algorithm for protein backbone reconstruction from alpha carbon coordinates. *J Comput Chem*. 2007;28(9):1593-7.
5. Moore BL, Kelley LA, Barber J, Murray JW, MacDonald JT. High-quality protein backbone reconstruction from alpha carbons using gaussian mixture models. *J Comput Chem*. 2013;34(22):1881-9.
6. Krivov GG, Shapovalov M V, Dunbrack Jr. RL. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. *PROTEINS-STRUCTURE Funct Bioinforma*. 2009;77(4):778-95.

