

タンパク質構造変化の遷移経路追跡を目指した 一分子蛍光測定装置の開発

¹東北大・多元研, ²東北大院・生命科学, ³東大院・総合文化
○小井川 浩之¹, 高橋 巧^{1,2}, 須河 光弘³, 高橋 聡¹

Towards the tracking of transition path of protein conformational changes by using single-molecule fluorescence spectroscopy

○Hiroyuki Oikawa¹, Takumi Takahashi^{1,2}, Mitsuhiro Sugawa³, Satoshi Takahashi¹

¹*Institute of multidisciplinary research for advanced materials, Tohoku University, Japan*

²*Department of Biomolecular Sciences, Tohoku University, Japan*

³*Department of Life Sciences, The University of Tokyo, Japan*

【Abstract】 Single-molecule fluorescence spectroscopy is a powerful method for the investigation of biopolymer dynamics. However, the time resolution of previous single-molecule methods is usually limited to a few milliseconds. We developed the line-confocal microscope combined with a microfluidic chip and hybrid photo detectors, which enabled us to trace the time evolution of FRET efficiency from single molecules with the time resolution of 10 μ s and with the observation time of more than 10 ms. One of the targets for the single molecule investigation is the transition event across the energy barriers. As the target for the microsecond tracking of the transition path, we observed the conformational changes of F₁-ATPase induced by the ATP hydrolysis. We tried the several pairs of donor and acceptor dyes for the labeling of F₁-ATPase. Only the sample labeled with the pair of Cy3 and Cy5 exhibited the fluctuation of FRET efficiency triggered by the ATP hydrolysis.

【序】 一分子蛍光測定は生体高分子のダイナミクスを追跡することができる強力な手法であるが、通常の一分子蛍光測定の時間分解能は、数 ms に制限されていた。私達はマイクロ流路チップとライン共焦点顕微鏡を組み合わせることで、100 μ s の時間分解能で 5 ms の間、一分子の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効率の時間変化を追跡できる装置を開発した。¹ この装置を用いることで、二重蛍光標識されたプロテイン A の B ドメインとユビキチンの平衡変性条件下での構造変化を追跡し、これらのタンパク質の変性状態が比較的不均一な構造集団であることを明らかにした。^{1,2,3}

生体高分子がエネルギー障壁を超えて構造変化する際の構造遷移の瞬間をとらえることは、一分子測定の重要な目的の一つである。既存の研究において、タンパク質の構造遷移にかかる時間(transition path time)は 100 μ s より短いことが報告されている。加えて、構造転移は非常に稀なイベントであるため、構造遷移の瞬間を追跡するためには、時間分解能の改善と、一分子を観測する時間の延長の両方が必須である。

【方法 (実験・理論)】 観測時間を犠牲にせずに時間分解能を改善するため、これまでの装置で用いてきた EM-CCD カメラの代わりにハイブリッド光検出器(HPD)を導入した。HPD をライン共焦点顕微鏡に導入することで、一分子の FRET 効率時間変化を 10 μ s の時間分解能で 10 ms 以上の間追跡することができるようになった。

私達はこの 10 μ s の時間分解能をもつ新しい装置を用いて、F₁-ATPase の ATP 加水分解にともなう構造変化の遷移経路を追跡することを目指している。F₁-ATPase の α と β サブユニットは ATP の結合と加水分解にともなって、closed 型と open 型の間を構造変化する。新しい装置にとって都合が良いことに、ATP 高濃度条件下で F₁-ATPase は、ATP を数ミリ秒の時定数で加水分解する。 β サブユニットに L398C の変異が導入された thermophilic *Bacillus* 由来の F₁-ATPase の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体⁴ にドナーとアクセプターの蛍光色素を二重標識し、1 mM ATP 存在下で蛍光色素間の FRET 効率変化を追跡した。

【結果・考察】 一分子当たりの観測時間を延長するためには、マイクロ流路チップへのサンプル導入流速を低く抑えなければならない。しかし、低流速はチップ表面へのタンパク質の吸着の原因になり、背景光を上昇させる。EM-CCD を用いた旧装置では、背景光は多数のピクセルに分散するため、大きな問題になることはなかったが、HPD は一つの大きな検出部で構成されるため、背景光が全て積算され、背景光のわずかな上昇に影響されやすい。そこで、マイクロ流路チップの表面を MPC コポリマーでコートした。³ 幸運にも、F₁-ATPase はコートされた表面にほとんど吸着しないため、低い背景光で多くの一分子 F₁-ATPase を観測することができた。

F₁-ATPase の一分子 FRET 測定をするに当たり、最初の試みとしてドナーとアクセプター色素として、Alexa488 と Alexa594 で標識した試料を用いた。しかし、観測されたほとんどの F₁-ATPase 分子において、ドナーとアクセプターの蛍光強度変化に負の相関が見られず、顕著な FRET 効率時間変化をとらえることができなかった (Fig. 1)。そこで更に数種類のドナー、アクセプターの組み合わせを試したところ、Cy3, Cy5 の組み合わせだけが、ATP 加水分解にともなった FRET 効率変化を示すことが明らかになった。発表ではこの Cy3-Cy5 で標識された試料の結果について詳細に議論する予定である。

【参考文献】

- [1] Oikawa, H., Suzuki, Y., Saito, M., Kamagata, K., Arai, M., Takahashi, S., *Sci. Rep.* **3**, 2151, (2013).
- [2] Oikawa, H., Kamagata, K., Arai, M., Takahashi, S., *J. Phys. Chem. B*, **119**, 6081-6091, (2015).
- [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*, **120**, 8818-8829, (2016).
- [4] Sugawa, M., Okazaki, K., Kobayashi, M., Matsui, T., Hummer, G., Masaike, T., Nishizaka, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E2916-E2924 (2016).

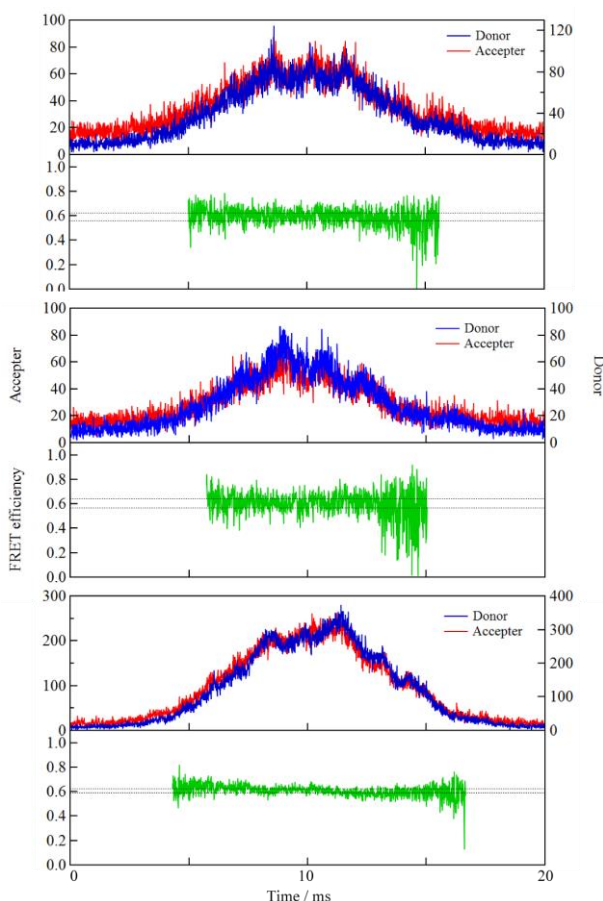


Fig. 1. Examples of the single-molecule FRET traces from F₁-ATPase labelled with Alexa 488 and Alexa 594.