

2P111

cytochrome c 分子の構造揺らぎの実時間単一分子蛍光計測

(京大院・理・化) ○岡本憲二, 西山雅祥, 寺嶋正秀

タンパク質分子のフォールディング過程では、無数にとり得る構造の中から最適な構造を選択するプロセスが比較的短時間のうちに完了する。そのメカニズムには幅広く興味を持たれ、長年にわたって研究がおこなわれている。その結果、過渡的に現れる中間状態の存在が重要な役割を果たすと考えられており、さまざまな物理量を計測することによって中間状態の情報を多角的に明らかにしていくことが今後の課題の1つである。分子構造の変化を検出する場合には、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を利用した蛍光計測が有効な手法の1つとして用いられる。さらに単一分子蛍光計測技術を併用することで、単一分子の構造変化の様子を直接観察することも可能となる。

ヘムタンパク分子の1つである cytochrome c (cyt c) は、これまでフォールディング過程の研究対象として数多くの研究に用いられてきた分子であり、すでに天然状態、変性したアンフォールド状態やモルテン・グロビュール状態をとる溶液条件がよく知られている。それらの中間の溶液条件下では、状態間を可逆的に遷移する平衡状態になると考えられている(図1)。たとえば天然状態とアンフォールド状態の間の平衡状態では、フォールディング過程に見られる中間状態が繰り返し現れていると考えられる。図1では簡単のため中間状態は1つだけ描かれているが、実際には複数の段階や複数の経路が存在すると考えられており、実際に溶液混合法や過渡回折格子法などの多分子計測では複数の中間状態の存在が確認されている。本研究では、単一分子蛍光計測技術を用いて、平衡状態にある cyt c 分子の実時間直接観察をおこなう。多分子計測では平均化により失われ観察が困難な、中間状態のより詳細な情報を得ることを目指す。

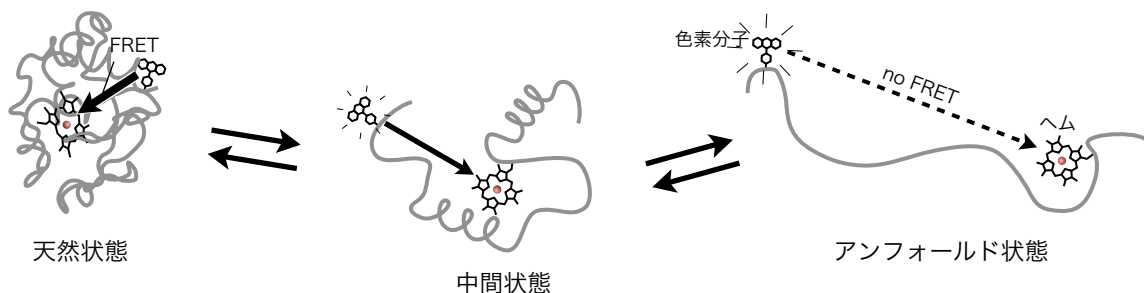


図1 アンフォールディング-リフォールディング平衡状態

酵母由来の cyt c 分子の C-末端近くを色素分子 (AlexaFluor546, Invitrogen) で標識し、蛍光観察を可能とした。cyt c 分子は鉄イオンを含んだヘム領域を持ち、色素を光励起したとき、色素をドナー、ヘムをアクセプタとした FRET 現象が起きる。FRET 効率は色素-ヘム間距離に依存して変化するため、蛍光信号を計測することにより分子構造の変化を検出することができる。

観察には APD フォトンカウンティング検出器を備えたコンフォーカル顕微鏡を用い、波長 532nm の固体レーザーを励起光源とした。試料走査によってまずガラス表面に固定された cyt c 分子の蛍光像を得た後、選択した分子にフォーカスを固定して蛍光の時系列信号を得る。

単一分子蛍光計測では信号がきわめて微弱なため、ショットノイズと呼ばれる確率誤差を無視できない(図2(a))。一般的には、S/N比を向上するため、時間分解能を犠牲にして信号の積算がおこなわれる。われわれは高時間分解での単一分子実時間計測を可能にする統計的解析手法の開発をおこなってきた。

分子のダイナミクスは複数の状態を連続的に遷移する過程であり、状態が瞬間的に遷移した時に信号が変化する、と考えてよい場合が多い。そのとき単一分子計測では信号はステップ関数的に変化する(図2(b))。そこで情報理論を駆使して蛍光信号を解析し、ステップ関数的に変化する状態遷移軌跡を復元する。

この解析法を適用した例を図3(a)に示す。この例では変性条件で、信号が比較的高いレベルで一定していることから、cyt c分子がアンフォールド状態をとっていると考えられる。フォトンカウンティング信号ではショットノイズによる揺らぎが無視できないレベルで存在し、状態の遷移を特定することは難しい。一方、統計解析の結果ではステップ関数的に連続的に変化する状態遷移の軌跡を復元することができている。また破線で囲んだ部分(右に拡大)に注目すると、この例では、幅約6ミリ秒の暗状態が分解できている。一方、フォトンカウンティング解析では時間分解能の制約で分解できていない。

図3(b)にモルテン・グロビュール状態と変性状態の間の平衡条件での測定結果の例を示す。変性条件の場合と比べると、より多数の信号レベルの異なる状態が存在し、それらの間で揺らいでいることが分かる。

一般的に分子ダイナミクスは、分子レベルで見た場合、ステップ的な遷移を繰り返す現象と見なせる場合が多く、本研究で用いた単一分子計測・解析手法は構造変化を伴う多くの生体分子ダイナミクスの計測に応用可能である。

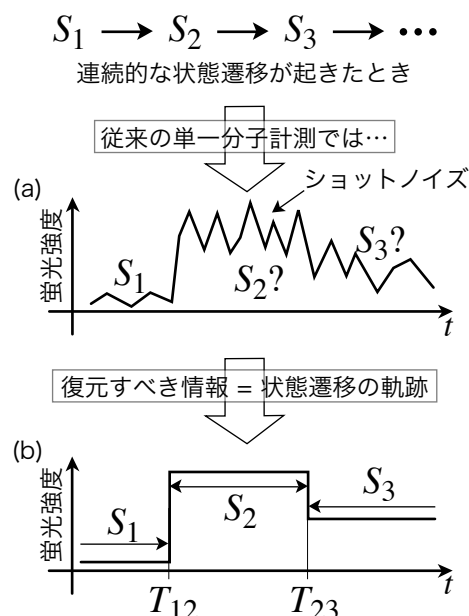


図2 単一分子ダイナミクス計測の信号

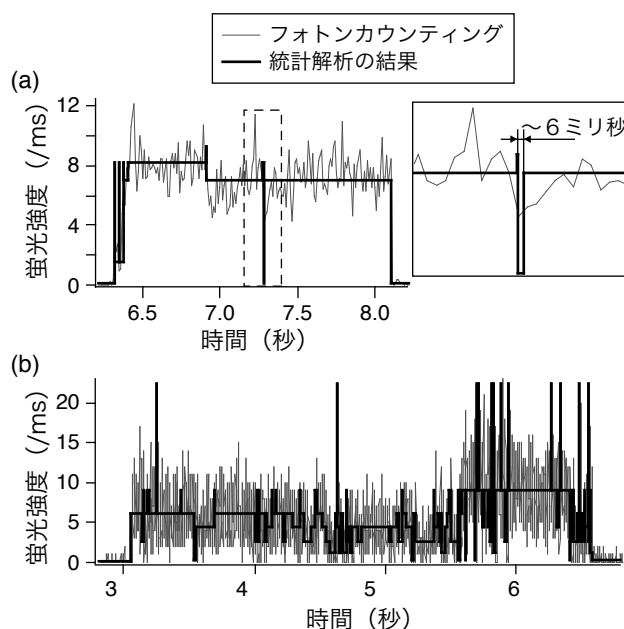


図3 解析結果の例 (a)変性条件 (b)平衡条件