2P085

蛋白質の折り畳み運動の長時間測定を目指した一分子蛍光検出装置の開発

○前田 晃央¹、木下 雅仁¹、今野 卓²、後藤 祐児¹、高橋 聡^{1,3} (¹ 阪大・蛋白研、² 福井大・医、³ CREST/JST)

我々のグループでは蛋白質の折り畳み過程における運動の特性を理解することを目指し、新しい一分子測定装置の開発に取り組んできた。これまでに開発した測定装置を用いて一分子の折り畳み運動を解析したところ、蛋白質のある時点での運動にはそれ以前の運動の履歴が影響することを示唆する結果が得られた。つまり微視的な折り畳み運動は完全なランダムではなく、方向性をもつ可能性がある。しかし現在の装置では一分子あたりの連続観測時間が100 ms程度と短いため、運動の履歴に関して十分な検討ができない。そこで本研究では、高い時間分解能を保ちつつ一分子運動を長時間観測できる手法の開発に取り組んだ。

これまでに開発した手法による測定では、蛍光色素修飾した蛋白質の希薄溶液をキャピラリーに一定流速で流し、試料の発する蛍光をCCDにより輝線として観測する。そのため流速を速くすることで高い時間分解能のデータが得られるが、一分子の総観測時間が輝線の長さに限られるという問題があった。本測定では長時間観測のために、流速を遅くして観測範囲に分子が留まる時間を長くするとともに、フレーム転送型CCDを使うことでデータの読み出し速度を非常に速くした。この場合、一分子の蛍光は多数枚の画像として取得されるため、読み出し速度が時間分解能に対応する。現段階では蛍光色素を用いた実験において3 msの時間分解能で1.2 s間の連続測定を達成した。得られた蛍光強度は十分強く、さらなる時間分解能と観測時間の向上が可能である。この装置を用いてβシートを多く含む一本鎖モネリン(SMN)の折り畳み転移を観測するために、SMNのN末端ヘキサプター色素としてCy5を、C末端にドナー色素としてCy3の修飾を試みている。現在のところ、反応条件の調整によりN末端へ選択的にCy5を修飾することに成功した。

A.Maeda, M.Kinoshita, T.Konno, Y.Goto, S.Takahashi : Development of the fluorescence detection device to observe single molecule dynamics of protein folding for extended periods

2P087

AFMによる蛋白質フォールディング過程の動的観測

○石井 孝明、片野 厚人、村山 能宏、佐野 雅己 (東大・理学系・物理)

蛋白質のフォールディングは、ポリペプチド鎖の巨視的な遅い運動から主鎖や側鎖の微視的な速い運動まで、さまざまな時間スケールの過程を含んでいる。フォールディング過程の中間状態を観測することは、その動的なメカニズムの解明にとって重要であるが、バルク状態では速い仮定が遅い過程に隠れてしまい、その観測が困難である。我々は原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて蛋白質1分子を溶液中で伸張し、その力学応答を観測する実験を行った。これにより熱力学的に不安定な中間状態をつくり出し、より詳細なフォールディング過程の性質を明らかにすることが可能となる。実験に用いる蛋白としてStaphylococcal Nuclease (SNase) を用いる。SNaseは分子量 1.7×10^4 kDa、アンフォールド時の全長50nmの比較的低分子量の蛋白質である。そのためフォールディング過程も単純であると予想され、これまでバルク実験や構造解析が多く行われてきた。我々はSNaseの両末端にシステインを導入した変位蛋白質を精製し、金とチオール基との結合を用いて、AFM基盤とカンチレバーの間に蛋白質を固定した。一定速度での引き伸ばし実験で力-伸張曲線を得ることができ、そのパターンからの統計的解析からフォールディング経路の性質を調べた。またSNaseには複数の経路をとることがバルク実験から予測されている。このことを確かめるため、伸張実験によりフォールディング経路を特定し、とりうる経路の力学的性質を調べた。

T.Ishii, K.Atsuto, Y.Murayama, M.Sano : Dynamic observation of protein folding on AFM

2P086

系統的分析によるタンパク質耐熱化機構の解明

○横田 恭宣¹、佐藤 賢二¹、大木 進野² (¹ 北陸先端大・知識、² 北陸先端大・ナノマテリアルテクノロジーセンター)

[目的] タンパク質の熱安定化機構を明らかにすることは、タンパク質のフォールディング原理の解明や酵素の工学的応用に重要である。しかしこれまでのところタンパク質の熱安定化に関する一般的原則といえる分子機構は見つかっていない。本研究では生育温度の異なった生物種に由来するホモログタンパク質の立体構造を特定構造部位によって分類しそのアミノ酸組成の差異を解析した。

[方法] 常温性生物 (20℃~50℃)、好熱性生物 (50℃~) に由来するホモログの立体構造が解かれている種のタンパク質をProtein Data Bank(PDB)から取り出し、さらにStructural Classification of Proteins(SCOP)により異なるフォールドのタンパク質を抽出した。これらのホモログタンパク質を用い、タンパク質の二次構造あるいは表面、内部によってアミノ酸組成の頻度や頻度傾向の差を解析した。

[結果] 解析の結果、好熱性生物由来のタンパク質で表面に露出したαヘリックスでのグルタミンの減少や、内部でのアラニンの増加、外部でのアラニンの減少など、様々な差異がみられた。

[考察] 好熱性生物由来のタンパク質は、一つの要因で耐熱性を獲得しているのではなく、様々な要因を組み合わせで獲得しているようにみえる。

本年度ではホモログタンパク質の変異ポイントなども併せて議論する。

K.Yokota, K.Sato and S.Ohki : Analysis of factors responsible for enhanced thermostability of protein :systematical analysis

2P088

連続光プローブを用いたナノ秒分解能レーザー温度ジャンプシステムの開発

○鎌足 雄司、中村 寛則、松本 友治、桑田 一夫 (岐阜大・感染研)

蛋白質構造形成の初期過程の観測は、これまで一般的に用いられて来た高速混合法の時間分解能では、不十分な場合が多い。たとえば、マウスプリオンのフォールディング反応の場合、ヘリックスB,Cの形成反応は50 μsの時定数で起きるが、ヘリックスAの形成反応はさらに早く、これまでに時定数を求める試みは成功していない。一方、我々の計算機シミュレーション結果は、非指数関数的な速度過程がフォールディングの初期に出現することを示している。我々は、蛋白質の速いフォールディング反応を追跡するため、ナノ秒分解能をもつレーザー温度ジャンプシステムの開発を行った。本システムでは、YAGレーザーにより発振された波長1064nmのパルスレーザー光が、水素ガスを封入されたラマンシフターを通り1907nmに変換される。このレーザー光は、サンプル水溶液に吸収され、サンプルの温度を上昇させる。観測光はXeランプを用いた白色の連続光を用いている。検出側は、ナノ秒時間分解能を持つ光電子増倍管を用いている。このシステムにより、温度ジャンプに伴う蛋白質のナノ秒スケールでの応答を、紫外吸収、あるいは、蛍光を用いてモニターすることが可能となった。我々は本システムを用いて蛋白質β-ラクトグロブリンの低温変性からの巻き戻り反応を観測し、30 μs程度の時定数をもつ新たな相をみいだした。この新たな相の性質について、議論する。

Y.O.Kamatari, H.K.Nakamura, T.Matsumoto and K.Kuwata : Development of the nanosecond resolution laser temperature-jump system using continuous wavelength light probe