

弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージング

—生体分子間相互作用の解明に立脚したタンパク質機能の理解—

1. 研究の目的

(1) 本研究の背景

生命科学の研究現場において生体分子を生きたままイメージングできる蛍光顕微鏡はなくてはならないツールとなっている。とりわけ、蛍光標識した生体分子1分子を直視できる蛍光1分子イメージングは、個々の生体分子の運動・相互作用・多量体形成・構造変化などのダイナミクスを集団平均することなく実時間で観察できる強力な蛍光顕微鏡法である。

多くの生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージングでは、あらかじめガラス基板にまばらに固定した生体分子(DNAやタンパク質)と、溶液として後から導入した別の生体分子(タンパク質やリガンド)の間の結合や解離などの相互作用を、後者の生体分子の輝点の蛍光強度変化の時系列として観察できる。

(2) 本研究の目的

本研究では、高濃度(数 μM)の生体分子溶液存在下で蛍光1分子イメージングできる直径100 nmのナノ開口アレイからなるゼロモード導波路の溶液貫流系や、弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージングをガラス基板に固定する生体分子の表面固定密度を高くすることで全反射照明蛍光顕微鏡法で可能とする系を確立し、DNA修復やDNA組換えに関わるDNA結合タンパク質とDNA間、および膜タンパク質であるイオンチャンネルとそのリガンド間の1分子間相互作用を実時間観察して、その時系列から相互作用の基本的な反応速度論パラメータである結合速度定数 k_{on} 、解離速度定数 k_{off} 、解離定数 K_{d} や、何分子の生体分子が相互作用に関わっているのかを1分子数定量し、解明されていない相互作用とタンパク質機能発現の関係に迫ることを目的としている。

2. 研究の計画

本年度の研究計画を以下に示す。

(1) 蛍光1分子イメージング系の構築

① ゼロモード導波路溶液貫流系の構築

我々はゼロモード導波路を用いて、高濃度のタンパク質やリガンド溶液存在下で蛍光1分子イメージングを行ってきた。しかし、溶液交換はゼロモード導波路基板上でピペットチップを用いて直接行ってきたため、溶液交換直後の観察が困難であった。そこで、溶液交換直後の結合解離イベントの観察を可能にするため、溶液貫流が可能なゼロモード導波路基板が一体となった試料セルを構築する。

② 弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージングが可能な全反射照明蛍光顕微鏡法の構築

希薄濃度条件では結合イベントがほとんど起こらない弱い生体分子間相互作用の全反射照明蛍光顕微鏡法での観察を可能にする系を、ゼロモード導波路溶液貫流系の相補的な系として構築する。この系では、溶液中の生体分子の濃度を高くする代わりに、基板に固定する生体分子の表面密度を高くし相互作用の頻度を上げ、基板に固定した生体分子に結合解離する溶液中の生体分子の輝点のみを観察する戦略をとる。

(2) DNA修復タンパク質の蛍光1分子イメージング

非六量体型スーパーファミリー1ヘリカーゼUvrDは、大腸菌のDNA修復で損傷やミスマッチ部位を切り出す役割を果たす。ほかの非六量体型ヘリカーゼと同様にDNA巻き戻しの機能単位に関して相反する単量体モデルと多量体モデルが提唱されてきた。

本研究では、UvrD希薄溶液条件では頻度が多くなかった多量体形成を、生体内の濃度に近い高濃度条件で明らかにする。またUvrDのDNA巻き戻しを促進するMutLの蛍光1分子イメージングを、高濃度のMutL存在下で行う。

① UvrDの高濃度条件下観察・MutLの蛍光標識

2023年度は、高濃度条件下でUvrDのDNAへの結合解離とDNA巻き戻しの観察を行う。また

MutLの発現・精製・蛍光標識を行う。

(3) DNA 相同組換えタンパク質の蛍光 1 分子イメージング

本研究では、大腸菌の相同組換えの中間体であるホリデイジャンクション DNA を成熟した組換え DNA にする過程に関与している RuvA、RuvB、RuvC の 3 つのタンパク質の DNA への結合解離と結合分子数定量的な観察を行い、これらのタンパク質の相互作用と機能発現の関係を明らかにする。

①RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合の観察・RuvAの蛍光標識

2023年度は、RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合を観察する。また、RuvAの蛍光標識を行う。

(4) 膜タンパク質イオンチャネル KcsA-リガンド間相互作用の蛍光 1 分子イメージング

本研究では膜タンパク質として、細菌由来の K⁺チャネルである KcsA チャネルを取り上げ、サソリ毒であるアジトキシン-2 との相互作用を観察する。X 線結晶構造が得られている KcsA チャネルは K⁺チャネルのモデルチャネルであり、毒素や薬との相互作用を 1 分子レベルで明らかにすることは生理的に重要な K⁺チャネルの特性を理解する上で重要である。

①KcsA 観察系の構築・KcsA 変異体の蛍光標識

2023 年度は、(1)で構築した系に脂質二重膜を導入し、KcsA 観察系の構築を行う。また、野生型 KcsA チャネルとアジトキシン-2 の相互作用はかなり弱いため、K_d 値が野生型よりは高いという報告がある 3 つの変異をもつ KcsA 変異体の発現・精製・蛍光標識を行う。

3. 研究の成果

(1) 蛍光 1 分子イメージング系の構築

①ゼロモード導波路溶液貫流系の構築

ゼロモード導波路を用いて溶液交換直後の結合解離イベントの観察を可能にするため、溶液貫流が可能なゼロモード導波路基板が一体となった試料セルを構築した。具体的には、全反射照明蛍光顕微鏡法の溶液貫流系で用いている試料セルの対物レンズに接する底面のカバーガラスの代わりに、レーザー加工で直径5 mmの穴をあけたガラス基板や、直径5 mmの穴があいたシム板（機械製作などにおいて隙間などを埋めたりする高さ調整のために用いられる金属製のプレート）を用い、その穴にドーナツ型の両面テープでゼロモード導波路基板を固定して構築した。

②弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージングが可能な全反射照明蛍光顕微鏡法の構築

ゼロモード導波路溶液貫流系の相補的な系として、希薄濃度条件では結合イベントがほとんど起こらない弱い生体分子間相互作用の全反射照明蛍光顕微鏡法での観察を可能にする系を、以下の(4)-②で述べるイオンチャネルとリガンドとの1分子間相互作用の観察系で実証した。この系では、溶液中の生体分子の濃度を高くする代わりに、基板に固定する生体分子（イオンチャネル）の表面密度を高くし相互作用の頻度を上げた。

(2) DNA 修復タンパク質の蛍光 1 分子イメージング

①UvrDの高濃度条件下観察・MutLの蛍光標識

ゼロモード導波路を用いて全反射照明蛍光顕微鏡法では観察が難しい数10 nMのUvrD存在下でのUvrD-DNA間相互作用とDNA巻き戻し完了を蛍光1分子イメージングした。またUvrDのDNA巻き戻しを促進するMutLの蛍光1分子イメージングを行うことを目的に、MutLの発現・精製・蛍光標識を行った。

(3) DNA 相同組換えタンパク質の蛍光 1 分子イメージング

①RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合の観察・RuvAの蛍光標識

RuvAとRuvBの発現・精製・蛍光標識とRuvCの発現、ホリデイジャンクションDNAの作製を行った。野生型RuvAにはCys残基を1つもつが蛍光標識されないため、N末に別のCys残基を挿入した。野生型RuvBにはCys残基がないため、S39Cの変異やN末にCys残基を挿入した。精製したRuvAとRuvBのDNA結合やDNA巻き戻し活性はゲルシフトアッセイによって確認した。そして、RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合の観察をゼロモード導波路を用いて行った。

②RuvAのホリデイジャンクションDNAとの相互作用の観察

当初の計画に先んじて、蛍光標識したRuvAの希薄溶液条件下（数nM）にて全反射照明蛍

光顕微鏡法を用いて、RuvAとガラス基板にまばらに固定したホリデイジャンクションDNAとの結合解離を蛍光1分子イメージングした。

(4) 膜タンパク質イオンチャネル KcsA-リガンド間相互作用の蛍光1分子イメージング

① KcsA観察系の構築・KcsA変異体の蛍光標識

チャンネルのポア領域にあるアミノ酸のうちアジトキシン-2との親和性を上昇させる3つの変異をもつKcsA変異体の発現・精製・蛍光標識を行った。この変異体にはビオチン化タグも挿入しており、基板表面固定のためのビオチン化も行っている。

② KcsA-リガンド間相互作用の蛍光1分子イメージング

このKcsA変異体をアビジン-ビオチン相互作用によって脂質二重膜に包囲された状態でガラス基板上に固定し、蛍光標識したリガンドとの相互作用を観察できる系の構築を行った。さらに、ガラス基板表面にKcsA変異体を大量に固定した全反射照明蛍光顕微鏡法の系（(1)-(2)で先述）とゼロモード導波路の系で、蛍光標識アジトキシン-2との相互作用の蛍光1分子イメージングに当初の計画に先んじて取り組んだ。

4. 研究の反省・考察

(1) 蛍光1分子イメージング系の構築

① ゼロモード導波路溶液貫流系の構築

ゼロモード導波路の試料セルに用いるために行ったガラス基板の穴あけはレーザー加工で行ったが、ガラス基板はクラックが入りやすく割れやすい。また穴をあけたガラス基板にはタンパク質の非特異吸着を抑制するために表面修飾が必要である。一方、シム板は金属製のため強度が強く、DNAやタンパク質が非特異吸着しないことを見出した。これらの2つの特性から、シム板のほうが使い勝手がよいことがわかった。

② 弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージングが可能な全反射照明蛍光顕微鏡法の構築

弱い生体分子間相互作用の全反射照明蛍光顕微鏡法での観察を実証したが、効率的な定量解析に向けて、画像解析プログラムが必要である。

(2) DNA修復タンパク質の蛍光1分子イメージング

① UvrDの高濃度条件下観察・MutLの蛍光標識

ゼロモード導波路を用いて、より高濃度条件下でUvrD-DNA間相互作用の観察を行える道筋がついた。MutLの発現・精製・蛍光標識を行ったが、MutLに複数あるCys残基のどれに標識されているのかは不明である。より精度の高い定量的な解析に向けて、単一の特異的標識を進める必要がある。

(3) DNA相同組換えタンパク質の蛍光1分子イメージング

① RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合の観察・RuvAの蛍光標識

RuvAとRuvBの活性のある状態での蛍光標識を行ったが、蛍光標識率が20%程度と高くなかった。RuvAとRuvBの多量体の解析のためには、より高い蛍光標識率を達成する条件検討が必要であると考えている。

② RuvAのホリデイジャンクションDNAとの相互作用の観察

当初の予想通り、蛍光標識したRuvAの希薄溶液条件下にて全反射照明蛍光顕微鏡法を用いて、RuvAとホリデイジャンクションDNAへの結合を観察することができたことから、RuvAのホリデイジャンクションDNAへのアフィニティがかなり高いことがわかった。

(4) 膜タンパク質イオンチャネル KcsA-リガンド間相互作用の蛍光1分子イメージング

① KcsA観察系の構築・KcsA変異体の蛍光標識

全反射照明蛍光顕微鏡法およびゼロモード導波路を用いた系で脂質膜が基板上に存在していることは、蛍光標識脂質を少量混合した系で確認できた。一方、固定したKcsAの多量体の状態は未確認のため、KcsAに標識した蛍光1分子の褪色の段階数を定量するなどして確認していく必要がある。

② KcsA-リガンド間相互作用の蛍光1分子イメージング

全反射照明蛍光顕微鏡法系において、KcsAとアジトキシン-2の相互作用を蛍光1分子イメージングできたが、表面に固定する生体分子の適度な濃度条件の絞り込みが必要である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①横田浩章：弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージング 第19回バイオオプティクス研究会 大濱信泉記念館（石垣市）・オンライン併催 2024年3月（招待講演）

(3) 出版物

なし