OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Single molecular imaging of dynamics for a calcium binding protein complex
Author(s)	和沢, 鉄一
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40247
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	和沢鉄一（わざわてついち）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 13244 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学 研究科 物理系 専攻
学位論文名	Single molecular imaging of dynamics for a calcium binding protein complex （カルシウム結合蛋白質におけるダイナミクスの1分子イメージング）
論文審査委員	（主査） 教授 柳田 敏雄 （副査） 教授 葛西 道生　教授 村上富士夫

論文内容の要旨

水溶液中の蛍光色素1分子の蛍光スペクトル測定を行う1分子蛍光分光システムの構築を行い，このシステムを使って蛋白質分子の内部状態を蛍光エネルギー移動により観察した。1分子蛍光分光システムを，単一蛍光色素分子のイメージングに用いられている全反射蛍光顕微鏡に蛍光分光装置を導入することにより，構築した。このシステムにより，水溶液中の蛍光色素Cy3の1分子および蛍光エネルギー移動を起こしている単一のCy3／Cy5ペアの蛍光スペクトルを2.5 秒の積算で測定することができた。これにより，水溶液中の蛍光色素1分子の蛍光スペクトル測定に世界に先駆けて成功した。さらに，このシステムを使ってCa^{2+}結合蛋白質であるトロポニンにおけるサブユニット間相互作用を蛍光エネルギー移動によって観察した。トロポニンCのシステイン98にテトラメチルローダミンをドナーとして，トロポニンIのシステイン133にCy5をアクセプターとして導入して，蛍光性トロポニンを再構成した。1分子の蛍光性再構成トロポニンにおいて，1スペクトルにつき2.5 秒の積算時間で分光測定を行った結果，蛍光エネルギー移動効率が秒のオーダーで大きく変化していることがわかった。このような変化は，ドナーとアクセプターの距離の変化によるものであり，再構成トロポニンにおけるコンホメーションあるいはサブユニット間の相互作用が秒のオーダーで変化していることを反映している。すなわち，トロポニンにおいて，エネルギー極小の構造が複数存在し，その構造の間を秒のスケールで揺らいでいることが示唆される。この結果は蛋白質における従来の概念の再検討を迫るものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は，水溶液中の蛍光色素1分子の蛍光スペクトルを測定する装置の開発，およびその装置を用いた蛋白質サブユニット間相互作用のダイナミクスの研究について記述されたものである。

本論文の前半においては，1分子蛍光分光システムの開発に関して記述されている。1分子蛍光分光システムは，水溶液中の1蛍光分子を観察するために近年使われるようになってきた全反射蛍光顕微鏡に蛍光分光装置を導入することによって，構築された。低背景光の全反射蛍光照明によって励起された蛍光分子からの蛍光を，顕微鏡の対物レンズで取り込み，回折格子型ポリクロメーターで分散して，冷却CCDカメラで検出することにより，試料からの蛍

光スペクトルを測定するようにした。この装置により，テトラメチルローダミン，Cy3などの1蛍光分子からの蛍光スペクトル測定を可能にした。さらに，蛍光エネルギー移動を起こしているCy3およびCy5の単一蛍光色素ペアの蛍光スペクトル測定も可能になった。

後半では，筋収縮の制御蛋白質であるトロポニンのサブユニット間相互作用を，蛍光エネルギー移動法を用い，この1分子蛍光分光システムで観察した結果について記載されている。トロポニンCサブユニットのシステイン98にテトラメチルローダミンを蛍光エネルギー移動の供与体として，トロポニンIサブユニットのシステイン133にCy5を受容体として導入した。この蛍光標識したトロポニンの蛍光スペクトルの1分子測定を行った結果，その蛍光エネルギー移動効率が秒のスケールで変化することが示された。蛍光エネルギー移動効率はその供与体・受容体色素間の距離に依存することから，トロポニンのサブユニット間相互作用あるいはトロポニンのコンホメーションが秒のスケールで変化していることが示された。すなわち，トロポニンにはエネルギー極小の構造が複数存在し，その構造の間を秒のスケールで揺らいでいることが，この実験により示唆された。

蛋白質の構造のゆらぎは秒のオーダーでは完全に平均化されているという考え方が従来から支配的であるが，本研究はその概念に対して再検討を迫るものである。本研究は，蛋白質1分子の構造変化を観察する装置を開発し，蛋白質の構造と機能の発現のメカニズムに関する基本的な概念の検証を行ったもので，国際的にも非常に高く評価されているので，一連の研究をまとめた本論文は博士論文として価値あるものと認める。