

分子ビーコンを用いた低温ショック蛋白質・一本鎖核酸間の 低濃度での結合平衡解析

Analysis of binding equilibrium between cold shock protein and single-stranded nucleic acids at low concentrations using molecular beacons

長岡技科大・物質生物¹、小山高専・物質工学²、蛋白質物性研³

古賀伊織¹、加藤優貴¹、早乙女友規^{1,2}、〇城所俊一^{1,3}

Dept. Material Sci. & Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.¹ Dept. Materials Eng., Oyama Natl. College Tech.²,
Inst. Protein Phys.³: Iori Koga¹, Yuuki Katoh¹, Tomonori Saotome^{1,2}, 〇Shun-ichi Kidokoro^{1,3}

Cold shock protein (CSP) is a small globular protein that has strong binding ability to single-stranded nucleic acids. To enable highly sensitive measurement of this ability, we introduced a sequence that strongly binds to CSP into the stem of single-stranded DNA and created molecular beacon A, which has a fluorophore and a quencher attached to both ends, and molecular beacon B, which has a lower thermal stability due to the introduction of a mismatch into the stem. Using these molecular beacons, we succeeded in measuring the dissociation constant with CSP at nM-level concentrations. Furthermore, binding experiments with molecular beacon A suggested that two CSP molecules bind to the sequence at CSP concentrations of μM or higher, where ITC measurements are usually performed.

【研究背景・目的】

低温ショック蛋白質(CSP)は、一本鎖核酸に強く結合し、細胞中での核酸の立体構造を制御する重要な機能を持つことが知られており、その結合能の解析には、滴定熱量測定(ITC)や CSP の核酸結合部位にあるトリプトファン残基の蛍光が結合した核酸により消光する現象が利用されている。いずれの測定も、感度の問題から通常 μM 程度の CSP 濃度で行われている。これらのデータは単純な 1 対 1 モデルを用いて解析されるが、このように評価された解離定数の温度依存性から求めた van't Hoff エンタルピーと ITC で測定された熱測定エンタルピーとが一致しないという問題があった。本研究では、分子ビーコン(MB)を用いることで nM レベルの高感度での結合性の計測を試みた。

【方法】

CSP が強く結合することが知られている塩基配列 d(TCTTTT)をステム部分に持ち、5'末端に蛍光剤、3'末端に消光剤を配した分子ビーコン MB-A と、そのステム部分にミスマッチを導入して熱安定性を低下させた MB-B を依頼合成した。pH 7.0、100 mM KCl を含んだ 50 mM リン酸カリウム緩衝液中で、1 nM の濃度の MB の蛍光強度を測定した。本研究では FP-8250 (日本分光)を用いて、1 K/min の降温・昇温走査と、一定温度で CSP 濃度を变化させた測定を行った。なお、CSP は MB の解鎖した状態にしか結合できないため、CSP と結合配列との解離定数を評価する際には、MB の熱転移から評価した解鎖の平衡定数を用いて解析した。

【結果・考察】

MB-A,B の熱転移に伴う蛍光強度の変化から、15~25°Cでの解鎖の平衡定数を評価した。この平衡定数を用いて、CSP の濃度を高めたときの蛍光強度の増加から、それぞれの MB での CSP との解離定数を評価した。この結果、ミスマッチを導入して解鎖しやすくした MB-B では、「MB の解鎖を考慮した 1 対 1 の結合モデル」により、nM 程度の解離定数が得られた。この値は、ITC など μM レベルの濃度を用いて評価した値より 1 桁も小さな値であった。また、高い熱安定性を持つ MB-A では、より高い CSP 濃度が必要となり、実験データの解析には、1 個目に加えて 2 個目の CSP 分子が結合する状態を考慮したモデルが必要なことがわかった。この解析結果からも、1 個目の CSP の解離定数は nM 程度であり、更に 2 個目の CSP が μM 程度の解離定数で協同的に結合することが示された。また、MB-B から決めた解離定数の温度依存性や、MB-B と CSP とを共存させた際の見かけの熱転移の測定結果は、CSP の 1 個目の解離定数が nM 程度であり、従来 ITC で観測されていた 150 kJ/mol 程度の大きな解離エンタルピーを持つことでうまく説明できることがわかった。通常、ITC や CSP のトリプトファン蛍光を用いた測定では、 μM 程度の濃度が用いられることから、この濃度では、1 本の DNA 鎖に 2 分子の CSP が結合した状態が有意に存在することが考えられる。発表では、この状態を中間状態とする 3 状態モデルを用いた、ITC データの解析についても議論したい。