

二次元蛍光寿命相関分光で観る蛋白質自発ゆらぎ： シトクロム c のマイクロ秒構造転移ダイナミクス

(理研・田原分子分光) ○乙須拓洋、石井邦彦、田原太平

【序】生体高分子の自発ゆらぎに関する研究は構造－機能－ダイナミクスの相関を理解するうえで非常に重要である。生体高分子のような無限に近い自由度を有する分子の揺らぎ特性の理解には、従来の集合平均測定では不十分であり、個々の分子の実時間計測によるアプローチが必要であるとの観点から、一分子計測による研究が盛んに行われつつある。しかしながら従来の一分子計測では、時系列データの binning が必要なことから、構造機能相関の研究や、蛋白質折れ畳み機構の研究において注目されているマイクロ秒オーダーでのダイナミクスの検出が困難である。近年我々が独自に開発を行った蛍光寿命相関分光法は、一分子計測の利点と単一光子解析による高い時間分解能($\sim 100\text{ns}$)を兼ね備えた測定法であり、このような研究に最適である[1-3]。本研究ではこの新規分光法の蛋白質ダイナミクス研究への応用として、酸性変性条件下でのシトクロム c (cyt c) の構造揺らぎを取り上げた。折れ畳み研究のモデル蛋白質である cyt c は、これまでの研究により酸性変性条件下で特異的な変性中間体をとることが明らかになっている[4]。変性中間体の存在は蛋白質が効率的な折れ畳みを行ううえで重要とされているほか、生理機能との関連も報告されている[5]。そこで本研究では cyt c が変性中間体を取りうる pH3.5 条件下における、中間体を含む各構造間の構造転移ダイナミクスの測定、解析を行った。

【実験】本測定対象である cyt c (図 1) はヘムを内在していることから、C 端領域のシステイン残基(C102)に蛍光ドナーとなる Alexa546 を付与し、Alexa546-ヘム間の FRET による Alexa546 の蛍光強度、寿命の揺らぎを解析することで、cyt c の構造揺らぎを評価した。測定は自作の蛍光相関分光装置で行い、各蛍光光子の絶対到着時間 T と励起パルスからの相対遅延時間 t を記録した。得られた時系列データより、通常の蛍光強度相関関数 (G_I) と寿命の重み付けによる蛍光寿命相関関数 (G_L) の解析を行った。また、ある時間間隔 ΔT における異なる t 間の二次元相関マップ $M_{\text{corr}}(\Delta T, t', t'')$ を同データより求め、得られた $M_{\text{corr}}(\Delta T, t', t'')$ に対し最大エントロピー法(MEM)に基づく逆ラプラス変換を行うことで、異なる構造に由来する異なる寿命成分間の揺らぎを検出した[3]。

【結果と考察】図 2 には pH3.5 条件下での Alexa546_cyt c の蛍光強度相関、蛍光寿命相関および両相関の比を示しているが、計測された両相関データは明瞭な差異を示した。この差異については理論的な考察から系の不均一性を示していることが明らかとなっている[1]。よってこのデータより、酸性条件下において cyt c が異なる蛍光寿命を有するいくつかの構造をとっていることが明らかとなった。また相関比のデータは、マイクロ秒の遅延時間領域で値の大きな変化を示した。この結果はマイクロ秒の時定数で系の不均一性の変化が起こっている、つまり蛍光寿命

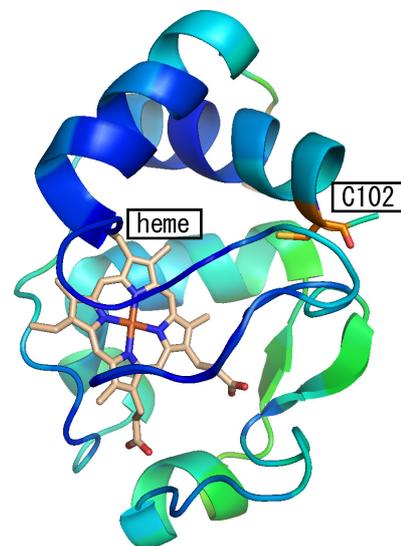
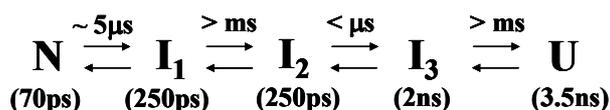


図 1. シトクロム c の立体構造
(PDB ID: 1YCC)

(Alexa546-ヘム間距離)の異なる構造間での揺らぎが起こっていることを明確に示している。この点について、どのような構造間での揺らぎが起こっているかを詳細に調べるため、相関比の値が変化する前後での t の二次元相関マップ ($M_{\text{corr}}(0.2\sim 4\mu\text{s}, t', t'')$) および $M_{\text{corr}}(50\sim 100\mu\text{s}, t', t'')$ を抽出し、MEM に基づく逆ラプラス変換を行った (図3)。得られたピークのうち、対角項のみの成分 (ΔT_1 における A, D) はその蛍光寿命を有する成分 (構造) が独立成分として検出されていることを示し、非対角項成分 (*) は、対応する2つの対角項成分 (ΔT_1 における B, C) が区別のつかない成分として検出されていることを示す [2,3]。つまり非対角項ピークの存在は、対応する対角項成分 (構造) 間の平衡が解析を行った遅延時間 (ΔT) よりも早い時定数を持つことを表している。相関比の変化前後でのデータ比較より以下の3つのことが明らかとなった。

1. マイクロ秒オーダーでの相関比の変化は $\sim 70\text{ps}$ 成分 (A) と $\sim 250\text{ps}$ 成分 (B) 間の平衡の時定数を表している。
2. $\sim 250\text{ps}$ 成分 (B) と $\sim 2\text{ns}$ 成分 (C) 間の揺らぎは $2\mu\text{s}$ 以下で起こっている。
3. $\sim 70\text{ps}$ 成分 (A) と $\sim 2\text{ns}$ 成分 (C) 間の揺らぎを表す非対角項成分が $\Delta T_2 = 50\sim 100\mu\text{s}$ の結果において確認されなかったことから、 $\sim 250\text{ps}$ の蛍光寿命を有する2つの異なる構造中間体が存在する。

以上の結果より酸性条件下での cyt c の構造転移ダイナミクスについて以下のようなモデルが考えられる。



N: native state, I: unfolded intermediate state, U: unfolded state

提案したモデルの妥当性については当日議論を行うが、本研究の結果はシトクロム c の構造転移ダイナミクスに関する新しい知見を示すとともに、蛋白質自発ゆらぎ研究における、蛍光寿命相関分光法ならびに二次元蛍光寿命相関解析の有用性を強く示唆するものである。

【参考文献】

1. K. ISHII and T. TAHARA, *J. Phys. Chem. B*, **114** (38), 12383-12391 (2010)
2. 乙須拓洋・石井邦彦・田原太平, 日本化学会第91春季年会, 2D1-13 (2011)
3. 石井邦彦・田原太平, 日本化学会第91春季年会, 2D1-11 (2011); 第5回分子科学討論会, 1B09 (2011)
4. J.H. Werner et al. *Proc. Natl. Acad. Soc.*, **103**, 1130-1135 (2006)
5. De Laureto PP et al. *FEBS J.*, **272** (9), 2176-2188 (2005)

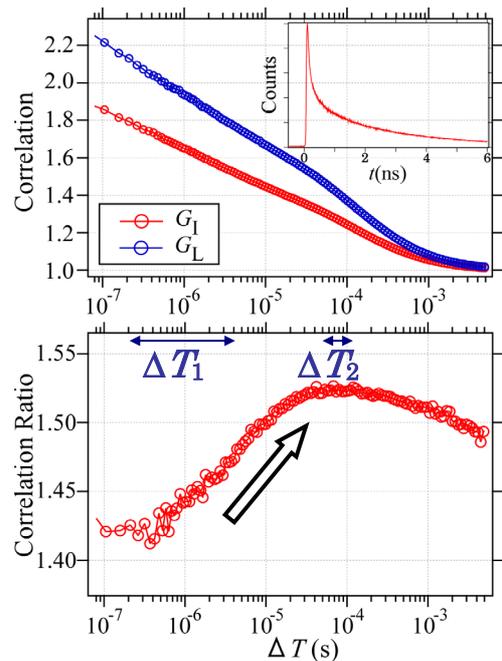


図2. (上) 蛍光強度相関と蛍光寿命相関 (下) 相関比

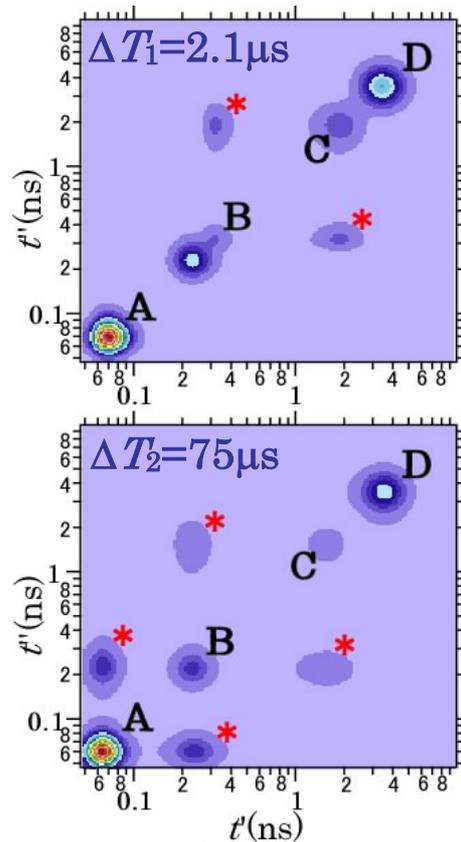


図3. 逆ラプラス変換による結果 (上) $\Delta T_1 = 0.2\sim 4\mu\text{s}$ (下) $\Delta T_2 = 50\sim 100\mu\text{s}$