

二次元蛍光相関分光によるシトクロム c 折れ畳み
ダイナミクスの定量的解析

(理研、田原分子分光) 乙須 拓洋、石井 邦彦、田原 太平

Quantitative analysis of folding dynamics of cytochrome c by two-dimensional
fluorescence correlation spectroscopy

(Mol. Spectrosc. Lab., RIKEN) Takuhiro Otsu, Kunihiko Ishii, and Tahei Tahara

【序】20種類のアミノ酸の組み合わせからなるポリペプチド鎖が、いかにして特有の高次構造を獲得し機能を発現するかは蛋白質科学の重要命題である。この折れ畳み機構の解明に向けて、近年では一分子計測による自発揺らぎ解析からのアプローチが盛んに行われている。一分子計測の利点は構造変化の実時間追跡が可能な点にあるが、従来の手法は十分な時間分解能、もしくは定量的解析法の欠如により、マイクロ秒から秒のオーダーで起こる複雑な蛋白質折れ畳み機構の研究には不十分であった。この点に関して最近我々が独自に開発を行った蛍光寿命相関解析法は、単一光子相関解析による高い時間分解能(〜100ns)と定量性を兼ね備えた手法であり、蛋白質折れ畳み研究に最適である^{1,2}。昨年の討論会では、本手法の蛋白質研究への初めての応用としてシトクロム c (cyt c) の酸性変性条件下での構造転移ダイナミクスの研究を行った結果について報告し、本手法の有用性と cyt c 構造揺らぎに関して得られた新たな知見について議論を行った³。本研究では昨年得られた結果をより定量的に解析すべく、二次元蛍光相関解析により検出された各蛍光寿命成分について、自己相関関数、ならびに成分間の相互相関関数を抽出する方法を考案したので、その結果について報告する。

【実験】 cyt c の 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。蛍光相関分光法において解析される相関関数 ($G(\Delta T)$) と二次元蛍光相関解析において得られる蛍光寿命の二次元相関マップ $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ の関係は以下のように示される³。

$$G(\Delta T) = \frac{\langle I(T)I(T+\Delta T) \rangle}{\langle I(T) \rangle^2} = \frac{\iiint \tilde{M}_{cor}(\Delta T; \tau', \tau'') \exp(-t'/\tau') \exp(-t''/\tau'') d\tau' d\tau'' dt' dt''}{\iiint \tilde{M}_{uncor}(\Delta T; \tau', \tau'') \exp(-t'/\tau') \exp(-t''/\tau'') d\tau' d\tau'' dt' dt''} + 1 \quad (1)$$

同様に二次元蛍光相関解析により抽出される各蛍光寿命成分の自己相関、ならびに相互相関関数は以下のように表せる。

$$G_{ij}(\Delta T) = \frac{\langle I_i(T)I_j(T+\Delta T) \rangle}{\langle I_i(T) \rangle \langle I_j(T) \rangle} = \frac{\tilde{M}_{cor}(\Delta T; \tau_i, \tau_j)}{\tilde{M}_{uncor}(\tau_i, \tau_j)} + 1 \quad (2)$$

$i=j$: 自己相関
 $i \neq j$: 相互相関

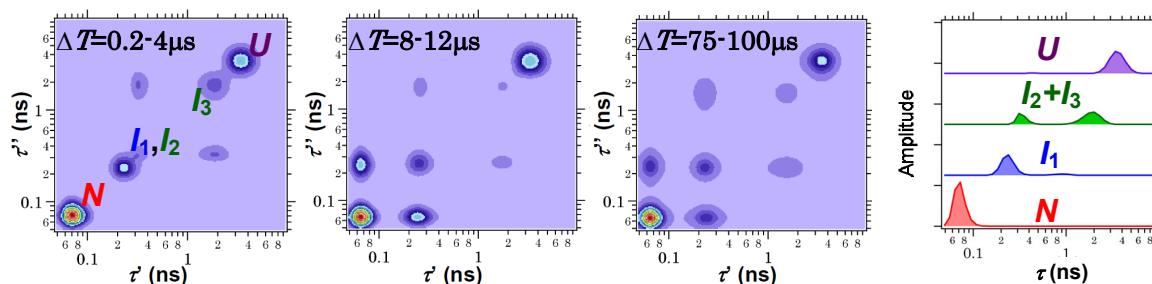


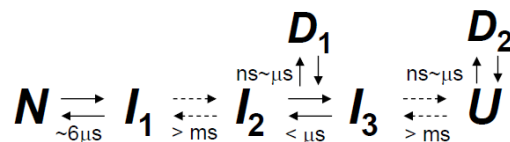
図1 異なる ΔT での $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ と $\Delta T = 0.2-4\mu\text{s}$ で検出された4つの独立蛍光寿命成分

各蛍光寿命成分の $\tilde{M}(\Delta T, \tau_i, \tau_j)$ は $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ 上の各ピークの積分値に対応する。解析においては異なる ΔT において二次元蛍光相関解析を行い、得られた $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ より各成分のピーク強度を算出、式 2 より各成分の自己相関、相互相関関数を抽出した。

【結果と考察】二次元蛍光相関解析の結果、解析を行った最も短い ΔT において 4 つの独立蛍光寿命成分が検出され、そのうちシトクロム c の天然構造状態に対応する N と変性中間体の一つに対応する I_1 は数 μs で揺らいでいることを昨年 の 討 論 会 で 報 告 し て い る (図 1)。今回はこれら 4 つの独立蛍光寿命成分の自己相関関数と数 μs での揺らぎが検出された N と I_1 間の相互相関関数を抽出、解析を行った。

図 2 には抽出した各独立成分の自己および相互相関関数と理論式によるフィッティング結果を示している。 N と I_1 については二次元蛍光相関解析でみられた数 μs での平衡過程を考慮に入れた理論式により良好にフィットすることができた(図 2a)。一方で I_2+I_3 、および U については、二次元蛍光相関解析の結果観測時間内 ($\mu\text{s} \sim \text{ms}$) での他成分との平衡過程が確認されなかったにもかかわらず、その自己相関関数は拡散項のみを含む理論式では説明できず、反応項を含む理論式によってのみ説明が可能との結果を得た(図 2b,c)。この一見矛盾する結果については、過去の研究報告を参考にした考察より、色素と芳香族アミノ酸の ground state complex による蛍光消光⁴の関与によるものと結論した。これまでに ground state complex 形成により色素の蛍光寿命は本測定装置の検出限界よりも短い寿命となることがわかっており、そのような短寿命成分は $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ でピークとして検出することはできない。つまり I_2+I_3 、および U の自己相関関数における反応項は、色素—芳香族アミノ酸間の ground state complex を形成するような変性中間体(D_1 and D_2)と I_2+I_3 、および U 間での構造転移に起因する相関を表していると結論した。

以上、各独立蛍光寿命成分の自己相関、相互相関解析の結果、最終的に以下のような cyt c folding scheme が得られた。



得られた folding scheme ならびに短蛍光寿命種(D_1 and D_2) について、異なる pH 条件での実験結果を含めその妥当性について当日議論を行う。

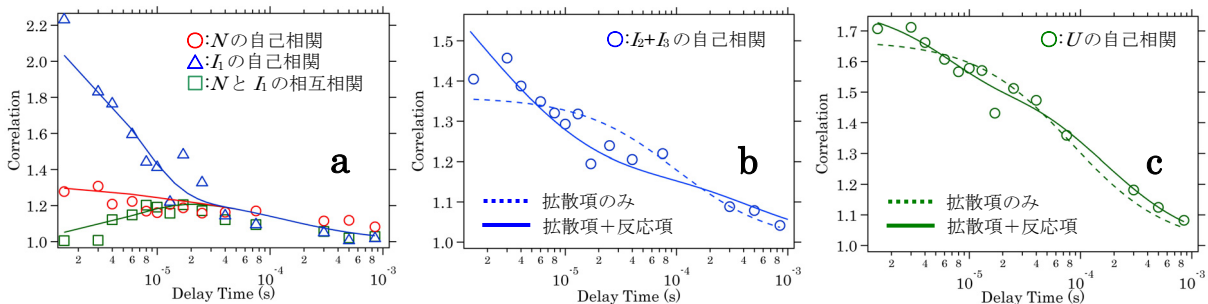


図 2 各独立蛍光寿命成分の自己および相互相関関数、ならびにフィッティング結果

【参考文献】

1. K. Ishii and T. Tahara *J. Phys. Chem. B* (2010) **114**, 12383-12391
2. K. Ishii and T. Tahara *Chem. Phys. Lett* (2012) **519-20**, 130-133
3. T. Otosu, K. Ishii and T. Tahara 第 5 回分子科学討論会 2011 札幌 1B10
4. N. Marmé et al. *Bioconjugate Chem* (2003) **14**, 1133-1139