

3A10

ホタル生物発光関連分子の光ルミネッセンスの理論的研究

(東大物性研¹、名大院・情報科学²)

○樋山みやび¹、秋山英文¹、古賀伸明²

Theoretical study for photoluminescence of firefly-bioluminescence-related molecules

(¹ISSP, Univ. Tokyo, ²Nagoya Univ.)

○Miyabi Hiyama¹, Hidefumi Akiyama¹, Nobuaki Koga²

【序論】ホタル生物発光の理解のため、基質であるホタルルシフェリン（以下、ルシフェリンとする）の分光的性質にも古くから興味が持たれ研究されてきた[1-7]。近年、ルシフェリンの分光的性質が反映されていると考えられる光ルミネッセンスの詳細な実験スペクトルが報告された[6]。光ルミネッセンスとは、励起光エネルギーにより基底状態にある分子が励起され、励起状態で緩和がおき、発光する過程である。ルシフェリンのように水溶液中での緩和が起きる場合、図1に示すように複数の分子種の励起状態を経由する可能性があるため、その経路はわかっていない。そこで本研究では、ルシフェリンの光ルミネッセンス過程の解明を目的とした。ルシフェリンとその共役酸・塩基の理論吸収強度および励起状態における自由エネルギーを用いた蛍光スペクトルの解析方法を提唱し、典型的な350 nmの励起光エネルギーによる光ルミネッセンス経路とそのpH依存性を検証する。

【方法】基底状態(S_0)と第一励起状態(S_1)のルシフェリンとその共役酸・塩基の pK_a を得るために、密度汎関数法を用いて S_0 と S_1 状態それぞれの安定構造の振動解析を行った。振動解析計算から得られる酸解離反応のGibbs自由エネルギー変化から pK_a を見積った。さらに、 pK_a の値が実験的に知られた分子において pK_a の計算値がもつ誤差を利用して、 pK_a の補正を行った。 S_0 状態の補正された pK_a から得られるモル分率と振動子強度を用いて、350 nmの励起光エネルギーによる理論吸収強度を見積もった。

S_1 状態の相対自由エネルギーは、 S_1 状態における pK_a から得たモル分率を用いて求めた。こうして、理論吸収強度と S_1 状態の相対自由エネルギーを用いて、350 nmの励起光エネルギーによる吸収・発光経路を解析した。ただし、 S_1 状態では1個のプロトン付加・脱離がおきる可能性がある、と仮定した。

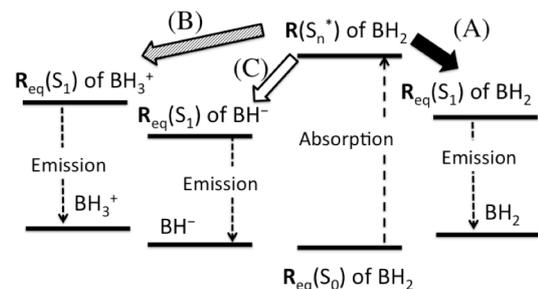


図1：光ルミネッセンス過程の概念図

【結果】 S_1 状態におけるフェノール型アニオンのプロトン脱離に対する pK_a 値は2.0となった。この値はMortonら[3]により報告されている-1.0より大きい値になっている。Mortonらは吸収エネルギーのみを考慮したFösterサイクル[8, 9]を仮定して pK_a 値を見積もっているが、本方法では吸収エネルギーだけでなく、 S_1 状態における緩和エネルギーも考慮しているため、Mortonらの結果と本結果とのずれは、この緩和エネルギーに起因している。

図2に350 nm光励起による理論吸収強度を、図3に S_1 状態での相対自由エネルギーを示す。これまで550 nm付近の緑色の蛍光スペクトルはpHの値によらずジアニオン(L^{2-})の発光であると考えられていた[1-6]。しかし、図2に示すように、 $pH < 3$ では中性ルシフェリン(LH_2)の吸収強度が大きい。図3より、 S_1 状態では LH_2 の相対自由エネルギーよりもプロトン脱離したフェノレート型アニオン(Phenolate- LH^-)の相対自由エネルギーが低い。また、Phenolate- LH^- の S_1 状態からの発光色は緑である[7]。以上のことから、 $pH < 3$ の発光は、 L^{2-} ではなくPhenolate- LH^- の発光であり、「 LH_2 の $S_0 \rightarrow S_1^* \rightarrow$ Phenolate- LH^- の S_1 平衡構造 \rightarrow 発光」という経路で起きていることがわかった。

□

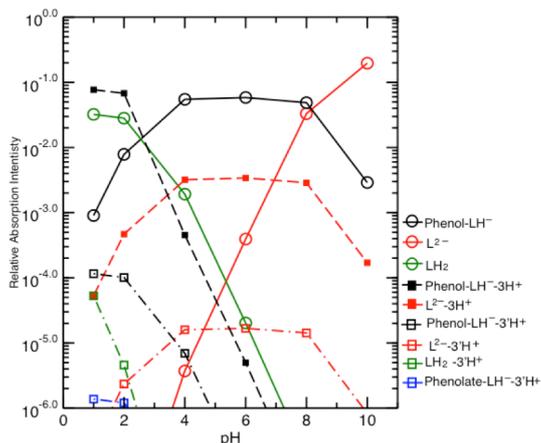


図2：理論相対吸収強度

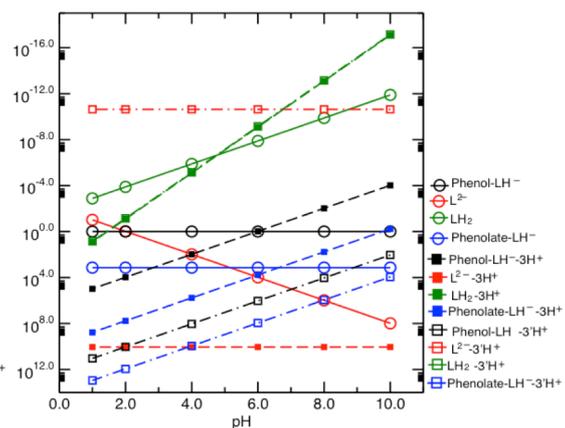


図3： S_1 における相対自由エネルギー

参考文献

- [1] Seliger, H. H. and E. W. McElroy (1960) Arch. Biochem. Biophys. 88, 136.
- [2] Seliger, H. H. et al. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47, 1129.
- [3] Morton, R. A. et al. (1969) Biochem. 8, 1598.
- [4] Jung, J. et al. (1976) J. Am. Chem. Soc. 98, 3949.
- [5] Gandelman, O. A. et al. (1993) J. Photochem. Photobio. B: Biol. 19, 187.
- [6] Ando, Y. and H. Akiyama (2010) Jpn. J. Appl. Phys. 49, 117002.
- [7] Hiyama, M. et al. (2012) Photochem. Photobio. 88, 889, 89, 571., 90, 35., 90, 820.
- [8] Föster V. T. (1950) Z. Elektrochem. 54, 42.
- [9] Jaffè H. H. et al., (1964) J. Am. Chem. Soc. 86, 2932.

3A11

共鳴ラマン分光法による蛍光タンパク質 Dronpa の発色団構造決定
(阪大院理) 東野飛鳥、○水野 操、水谷泰久

Structural determination of the chromophore in a fluorescent protein, Dronpa
(Osaka University) Asuka Higashino, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani

はじめに

蛍光タンパク質 Dronpa は、蛍光を発する明状態 B state と発しない暗状態 A₂ state との間でフォトクロミズムを示す。また、これらに加えて無蛍光性の A₁ state がある。A₁ state は中性条件で B state と共にわずかに存在し、酸性条件で存在比が増すことが報告されている (図 1) [1]。各状態での発色団の幾何構造は、B state ではシス形、A₂ state ではトランス形であることがすでにわかっている。しかし、A₁ state の発色団の幾何構造や、発色団のフェノール部分のプロトン化状態については、推測が行われているのみで、構造決定には至っていない。光変換機構を明らかにするためには、溶液試料での詳細な構造解析が必要である。

共鳴ラマン分光法はタンパク質中の発色団構造を調べるのに適している。しかし、Dronpa は強い蛍光を発し、可視共鳴ラマンスペクトルの測定が困難であるため、これまでにスペクトルの報告例はなかった。

本研究でわれわれは、共鳴ラマン分光法による Dronpa 発色団の構造決定を行うために、強い蛍光バックグラウンドを除去し、Dronpa 発色団の共鳴ラマンスペクトルの観測を試みた。観測されたスペクトルから、各状態の発色団と周辺アミノ酸残基の構造、さらにそれらの間の相互作用の pH 依存性について考察した。

実験

Dronpa は、大腸菌中で発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。B state から A₂ state への光変換は波長 514.5 nm の光を用いて行った。共鳴ラマンスペクトルは、波長 400 nm 及び 561 nm の励起光を、セル中をフローする試料溶液に照射し、液体窒素冷却 CCD 検出器で検出することで観測した。検出器の素子間の感度補正は、ラマンスペクトルの観測と同じ光学系の配置で、色素 (硫酸キニーネ、およびローダミン 6G) の蛍光を測定して行った。蛍光によるバックグラウンドは波長のべき関数を用いて除去した。

結果と考察

波長 400 nm の励起光で Dronpa の A₁ state と A₂ state、および比較のために蛍光タンパク質 GFP の共鳴ラマンスペクトルを測定した。得られたラマンスペクトルは、強い蛍光のバック

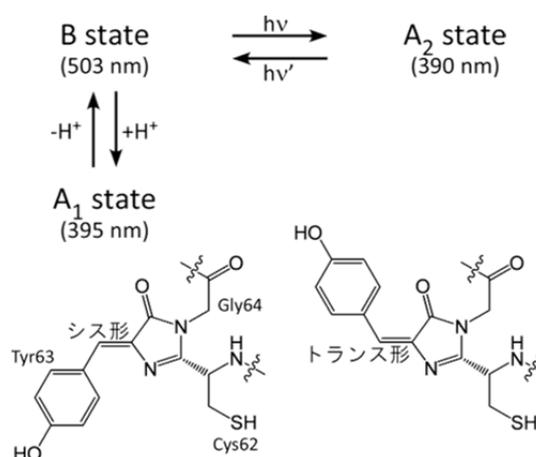


図 1. Dronpa の状態変化. 上: カッコ内は吸収極大波長. 下: 発色団の幾何構造.

グラウンドとともに観測されたが、そのままでも数本のラマンバンドの存在が確認できた。詳細な振動バンドの解析を行うために、蛍光の寄与を除いたスペクトルを図 2(a)に示す。それぞれのスペクトルには、発色団構造の違いを反映する差が観測された。特に、 A_2 state においてのみ 1145 cm^{-1} にバンドが現れた。GFP 発色団のモデル化合物に関する研究では、トランス形のラマンスペクトルでのみ 1125 cm^{-1} 付近にバンドが現れることが報告されている[2]。これらの結果から、 A_1 state がシス形の発色団を持つという推定を裏付けることができた。さらに、Dronpa 中の発色団についても、 1145 cm^{-1} のバンドがそのシス形とトランス形を区別するマーカーバンドとして利用できることが明らかになった。また、軽水緩衝液から重水緩衝液に置換することによって、 1560 cm^{-1} 付近に現れる C=N 伸縮振動バンドが低波数シフトした。これにより、 A_1 state と A_2 state が共に発色団中に交換しうるプロトンをもつことが示唆された。

波長 561 nm の励起光を用いて B state の前期共鳴ラマンスペクトルを測定した (図 2(b))。得られたスペクトルのマーカーバンドをもとに、B state の発色団がシス形であることを確認した。また、脱プロトン化した発色団を持つ GFP 変異体との比較から、B state の発色団が脱プロトン化していることが明らかになった。

A_1 state と B state との酸塩基平衡を調べるために、吸収、蛍光、および共鳴ラマンスペクトルの pH 依存性を調べた。pH 4 から pH 10 において、 A_1 state のスペクトル変化は一段階で起こることがわかり、 pK_a が 5.0 と求められた。GFP の吸収スペクトルは、pH 変化による明確な遷移を示さないことが知られており、Dronpa は GFP と異なる特徴をもつ。これは、発色団周辺の水素結合ネットワークが Dronpa と GFP では異なることに由来すると考えられる。プロトン化している野生型 GFP と比較して、中性で脱プロトン化していることが知られている GFP 変異体 (S65T) では、発色団周辺の水素結合ネットワークが変化している[3]。この GFP 変異体と同様に、Dronpa においても野生型 GFP とは異なる水素結合ネットワークが形成されており、これが Dronpa の pK_a が低く、脱プロトン化した発色団が安定である主な原因であると考えられる。脱プロトン化した GFP 変異体の pK_a が 6.0 と、Dronpa の値と比較的近いこともこの解釈を裏付けている。

参考文献

[1] Fron, E. *et al.* *JACS* **129**, 4870 (2007). [2] Luin, S. *et al.* *JACS* **131**, 96 (2009). [3] Brejc, K. *et al.* *PNAS* **94**, 2306 (1997).

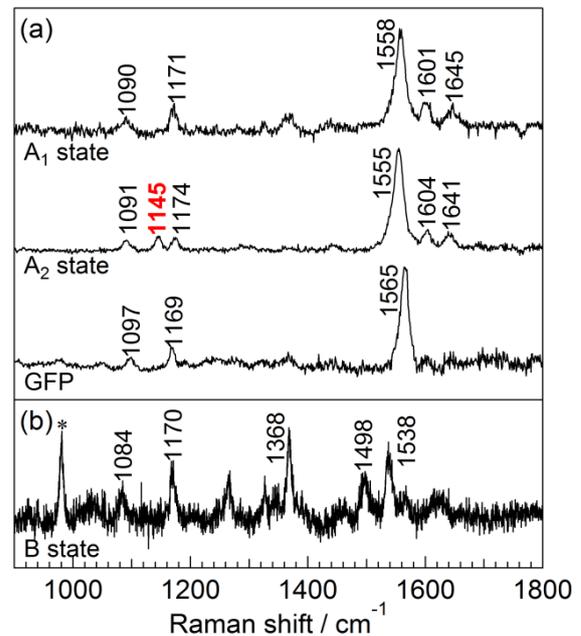


図 2. (a) Dronpa (A_1 state, A_2 state) および GFP の共鳴ラマンスペクトル. 励起光 400 nm . (B) Dronpa (B state) の前期共鳴ラマンスペクトル. 励起光 561 nm . 各スペクトルは蛍光の寄与を除いている。

BLUF タンパク質 SyPixD の反応への圧力効果

(京都大学院・理¹, 大阪府立大学院・理², 東京大学院・理³)○中島 翼¹, 黒井 邦巧¹, 岡島 公司^{2,3}, 池内 昌彦³, 徳富 哲², 寺嶋 正秀¹

The pressure effect on the reaction of the BLUF photoreceptor SyPixD

(Graduate School of Science, Kyoto University¹, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University²,
Graduate School of Arts and Science, Tokyo University³)○Tsubasa Nakajima¹, Kunisato Kuroi¹, Kouji Okajima², Masahiko Ikeuchi³, Satoru Tokutomi², Masahide Terazima¹

【序】地球上には高圧下で存在する生物が数多く存在し、彼らもつタンパク質は高圧条件に対応しながら生体の活動を支えている。こうした生物の活動を分子論的に明らかにするためにはタンパク質の高圧下での反応を明らかにすることが重要である。しかし高圧下での研究において、タンパク質の静的状態を調べる手法は多くあるが反応のダイナミクスそのものを調べる手法は少ない。またタンパク質反応における揺らぎの重要性が説かれており、揺らぎについて数値的な考察をすることは大きな意味をもつ。こうした点において、タンパク質の構造揺らぎと反応活性化体積はそれぞれ体積と反応速度定数の圧力微分を用いて表現されるため、圧力依存性の実験から常圧での揺らぎの性質を調べることは有用である。今回、我々は過渡回折格子 (TG) 法によって高圧下での反応ダイナミクスを調べると同時に体積変化量や反応速度定数変化を求め、そこから常圧における構造揺らぎや活性化体積などの熱力学量を調べた。

ここでは SyPixD と呼ばれる BLUF タンパク質を研究対象として選んだ。このタンパク質は、青色光を吸収することでシアノバクテリアの走光性を制御する光センサータンパク質である。常圧においては 10 量体と 2 量体の平衡状態で存在しており、青色光で励起すると発色団まわりの水素結合ネットワークの変化が誘起され、吸収スペクトルが約 10 nm 長波長側にシフトする。さらに、10 量体はおよそ 45 ミリ秒で体積収縮を起こし、励起光強度が強い場合にのみおよそ 350 ミリ秒で 2 量体への解離反応が起こる [1]。今回は強い励起光による反応に注目し、その反応への圧力効果を調べた。

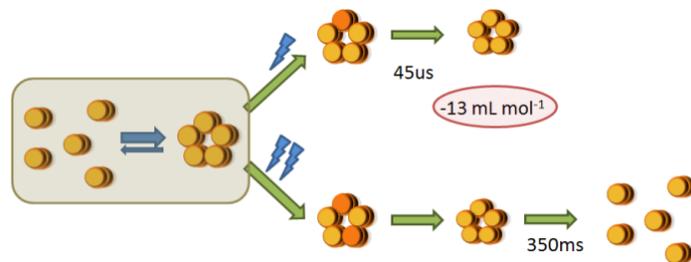


図 1. SyPixD の常圧での反応スキーム

と発色団まわりの水素結合ネットワークの変化が誘起され、吸収スペクトルが約 10 nm 長波長側にシフトする。さらに、10 量体はおよそ 45 ミリ秒で体積収縮を起こし、励起光強度が強い場合にのみおよそ 350 ミリ秒で 2 量体への解離反応が起こる [1]。今回は強い励起光による反応に注目し、その反応への圧力効果を調べた。

【実験】高圧セルを用いることで様々な圧力環境下での TG 測定を行った。TG 法測定に置いては、462 nm のパルスレーザーを用いてタンパク質を光励起し、反応を開始させた。その後の体積変化や拡散係数変化を、840 nm の連続発振レーザーでプローブした。今回はまずサンプルの分子拡散信号を測定し、圧力による反応量子収率と解離反応速度定数の変化を調べた。さらに TG 解析から得られた体積変化量や反応速度の圧力依存性より、タンパク質の持つ構造揺らぎや活性化体積の大きさを求めた。

【結果と考察】 図2に加圧による分子拡散によるTG信号の圧力依存性を示す。先行研究により、その信号の立ち上がりと減衰はそれぞれ生成物（2量体）と反応物（10量体）の拡散によるものであることが分かっている[1]。図より圧力を加えると信号強度が減少していることが分かる。この挙動は、光励起反応の収率が下がり生成物量が減少した影響であると推測でき、単一波長過渡吸収測定によりその推測が正しいことが確認された。

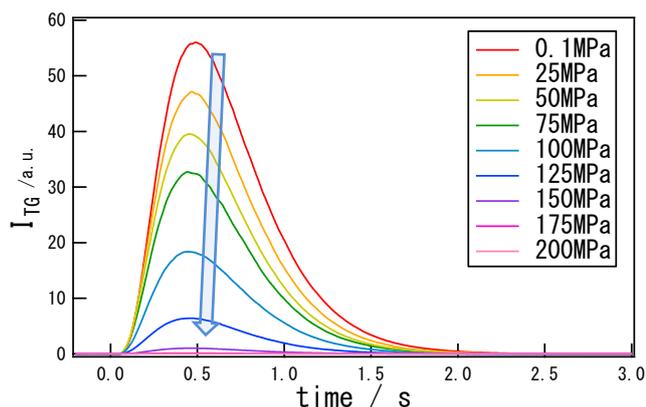


図2. 分子拡散信号の圧力依存性

また、各圧力の信号を解析することにより解離反応の速度定数が圧力によって増加していることが求められ、圧力によって解離反応が促進されていると分かった。このことはこの解離反応の活性化体積が負であることを示しており、具体的に -44 mL/mol であると算出できた。

図3に早い時間領域のTG信号の圧力依存性を示す。この時間領域は図2で示したのものよりも早いスケールであり、反応物が励起されて吸収変化を示す中間体が生じてから体積変化を起し始めるまでの信号を表している。ここでTG信号のベースからの浮きの部分は反応物と中間体の屈折率変化の差を表しており、図よりこの大きさが圧力により増加していることが分かる。

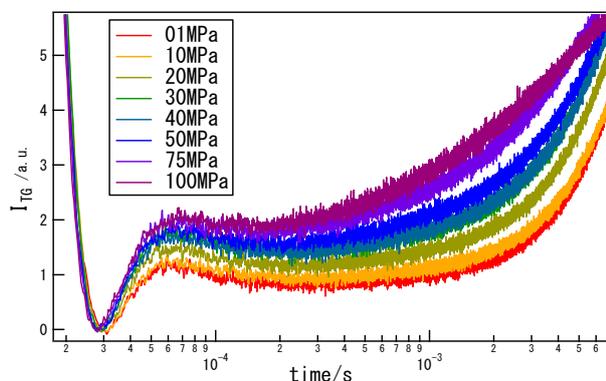


図3. 早い時間領域のTG信号圧力依存性

ここでサンプルと濃度を合わせた熱参照試料の測定を並行して行い、各圧力での体積差を算出した。この計算においては圧力による反応効率変化も考慮に入れた。

この圧力依存性から反応物と中間体の間の揺らぎの差を求めると、 $+113 \text{ (mL/mol)}^2$ であると算出できた。光励起によるこの揺らぎの増大がそのあとに続く反応にとって重要な役割を果たしていると考えられる。本講演ではタンパク質反応への圧力効果から話を始め、反応と構造揺らぎ、活性化体積の関係性についての議論へと進めていく予定である。

【参考文献】

[1]Tanaka et al. *J.Mol.Biol.*(2011) 409,773-785

二次元蛍光寿命相関分光法と一分子 FRET 測定による BdpA の構造ダイナミクス解析

(¹理研・田原分子分光,²理研・光量子工学領域³東北大・多元研,⁴東大・総合文化)

○乙須拓洋¹, 石井邦彦^{1,2}, 小井川浩之³, 新井宗仁⁴, 高橋聡³, 田原太平^{1,2}

2D FLCS and single-molecule FRET measurement reveal the conformational dynamics of BdpA

(¹Mol. Spectrosc. lab., RIKEN,²RIKEN Center for Advanced Photonics,³IMRAM, Tohoku Univ.,
⁴Grad. Sch. Arts. Sci., Univ. Tokyo) ○Takuhiro Otsu¹, Kunihiro Ishii^{1,2}, Hiroyuki Oikawa³,
Munehito Arai⁴, Satoshi Takahashi³, and Tahei Tahara^{1,2}

【序】溶液中での蛋白質の構造不均一性ならびにダイナミクスの定量的解析は、高次構造形成過程や機能発現機構を理解するうえで非常に重要である。この点に関して、我々は高い時間分解能で定量的解析が可能な単分子からの蛍光データを取得できる二次元蛍光寿命相関分光法(2D FLCS)¹を開発し、蛋白質や DNA への応用を進めている²。

2D FLCS は相関する独立蛍光寿命成分を光子データから抽出、解析する手法であるが、検出された独立成分数とデータのノイズレベルとの関係はいまだ自明ではなく、既存の手法による結果との直接比較による検証が必要とされる。そこで本研究では 2D FLCS と一分子蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)測定を B domain of protein A (BdpA)の折りたたみ研究に適用し、両手法により得られた結果を直接比較することによる包括的な解析を行った。

【実験】試料となる BdpA には FRET ドナーおよびアクセプターとなる色素を付与し、変性剤であるグアニジン塩酸塩(GdmCl)存在下で測定を行った。測定には共焦点顕微鏡と時間相関単一光子計数装置を組み合わせた独自の測定装置を用い、ドナーの吸収波長に対応する励起パルスを対物レンズに入射、焦点領域から得られる全蛍光をダイクロイックミラーでドナー蛍光、アクセプター蛍光に分けた。2D FLCS ではドナー蛍光のみ、一分子 FRET 測定では両蛍光シグナルをそれぞれアバランシェフォトダイオードで検出し解析に使用した。一分子 FRET 測定では試料濃度を十分に下げた条件で測定を行い、その後、光子データを 1 ms ごとにビンニングし、一分子由来の光子バーストを検出、それぞれのバーストについてドナーアクセプター蛍光強度比を計算するこ

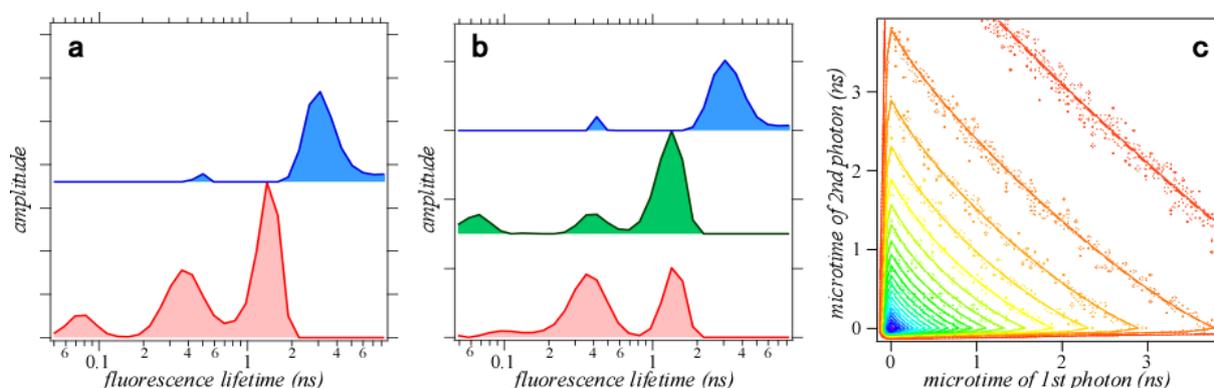


図 1 (a,b) 2D FLCS により得られた独立蛍光寿命成分($\Delta T=1-100\mu s$)。二成分解析 (a) と三成分解析 (b) の結果をそれぞれ示している。(c) 実験で得た二次元蛍光相関ヒストグラム(点)とそれぞれ二成分解析 (実線)、三成分解析(破線)で得た相関ヒストグラムの比較。実線と破線はほぼ重なっている。

とで一分子ごとの FRET 効率(E)を評価し、ヒストグラムを作成した³。

【結果と考察】図 1 には、2M GdmCl 存在下におけるドナー蛍光の 2D FLCS の結果を示している。解析は 2 つ、および 3 つの独立蛍光寿命成分を仮定して行った。2 成分解析では、複数の蛍光寿命成分が ΔT 内に平衡化していることを示す成分(図 1a 赤、以下成分 1)と、単一長寿命ピークからなる成分(図 1a 青、以下成分 2) が検出された。一方で 3 成分解析においては成分 1 が異なる 2 つの成分として検出された。この点について、それぞれの結果と生データを比較したところ、どちらも良好に生データを再現していたことから、独立蛍光寿命成分は 2 成分であり、3 成分解析の結果はオーバーフィットによるものであると結論付けた。また、それぞれの蛍光寿命から、成分 1 は BdpA の複数の準安定状態が 50 マイクロ秒以下の時定数で平衡化していることを示す成分、成分 2 はアクセプターが欠落、もしくは不活性化した成分由来であると帰属した。

しかしながら、蛋白質のように複雑で、かつダイナミクスに時間階層性のある分子では、マイクロ秒で平衡化している不均一な成分が数多く存在する可能性も否定できない。そこで、この結果についてより詳細に検討すべく、同溶液条件で一分子 FRET 測定を行った。得られた FRET ヒストグラムからは $E \sim 0$ に極大を持つ鋭いピークと $E \sim 0.6$ に極大を持つブロードなピークの 2 成分が検出された(図 2a)。そこで、これら 2 つの成分それぞれについて、関与するドナー信号を抽出し、蛍光減衰曲線を作成した(図 2b)。検出されたピークのうち、 $E \sim 0$ を示すピークから抽出したドナー蛍光減衰曲線は成分 2 から得た蛍光減衰曲線と一致した。このことは、先ほどの解析同様成分 2 が FRET を起こさない成分由来であることを示す結果となった。次にブロードなピークについて同様の解析を行った。ここでは、ピーク内不均一性を議論するためにピークの高 FRET 側($E = 0.6 \sim 1.0$)からデータを抽出した。得られたドナー蛍光減衰曲線はピークの片側から取得したにもかかわらず成分 1 に完全に一致した。このことは、2M GdmCl 条件下での BdpA の構造は 50 μ s 以下で平衡化する不均一な成分 1 つであるとする 2D FLCS の解釈を支持する結果となった。

以上、2D FLCS と一分子 FRET 計測の直接比較により、独立成分数の決定と各成分の正確な帰属が可能となった。発表では、これらの結果に加えアクセプター蛍光を含めた新たな 2D FLCS 解析の可能性についても議論したい。

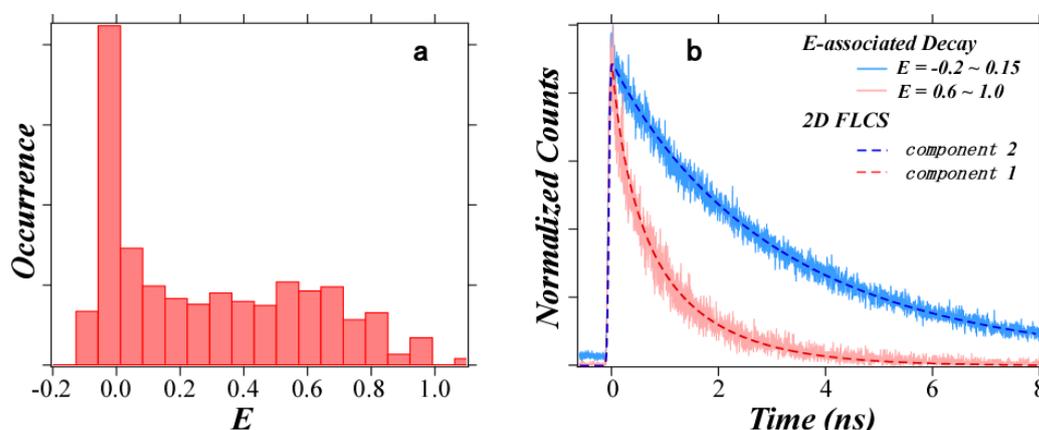


図 2 (a) 一分子 FRET ヒストグラム (b) エネルギー移動効率に依存した蛍光減衰カーブと図 1a データから得た減衰カーブ比較

【参考文献】

1. K. Ishii, and T. Tahara (2013) *J. Phys. Chem. B*, **117**, 11414-11422 & 11423-11432
2. T. Otosu, K. Ishii, and T. Tahara (2014) *submitted*.
3. A. Hoffmann et al. (2011) *PCCP*, **13**, 1857-1871

Probing the Structural Distribution and Opening-Closing Rate of Hairpin RNA by 2D Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy

○ Chao-Han Cheng,¹ Kunihiko Ishii,^{1,2} and Tahei Tahara^{1,2}

¹Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN

²Ultrafast Spectroscopy Research Team, RIKEN Center for Advanced Photonics

Introduction

The structural dynamics of RNA contains the information about fundamental biological processes that regulate unique biological functions. Characterization of the nature and time scale of these processes facilitates our understanding of the role of RNA in biological systems. However, the elucidation of complicated structural dynamics of RNA is still difficult. In this work, we used a novel 2D fluorescence lifetime correlation spectroscopy (2D FLCS)¹ to investigate a FRET dye-labeled hairpin RNA. By comparing with a DNA analogue, we realized the origins of opening-closing transition of RNA accurately.

Experiment

In this experiment, we measured the hairpin RNA (UUUAACC(U)₁₈GGUU) labeled with a FRET dye-pair 6-FAM and TAMRA as the donor and acceptor, respectively. The DNA analogue was designed with the same sequence to RNA (U was replaced by T in the DNA sample). They were prepared in a buffer solution (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, BSA 0.01 %, pH 8.0) with 0.4 M NaCl. Two-color 2D FLCS was performed by a home-built system.^{1,2} Each collected photon contains two temporal information: the absolute arrival time determined from the start of experiment (T) and the relative arrival time determined from the excitation laser pulse (t). The 2D emission-delay correlation map $M(\Delta T; t', t'')$ was created at a characteristic time interval (ΔT) between two photons emitted at t' and t'' from the excitation. The maximum entropy method (MEM) was utilized to convert 2D emission-delay correlation maps to 2D fluorescence lifetime correlation maps so as to obtain the lifetime distribution and the correlation of independent species. The lifetime distribution, which corresponds to the structural distribution, was utilized to develop the filter functions³ to obtain the species-specific correlation. The obtained species-

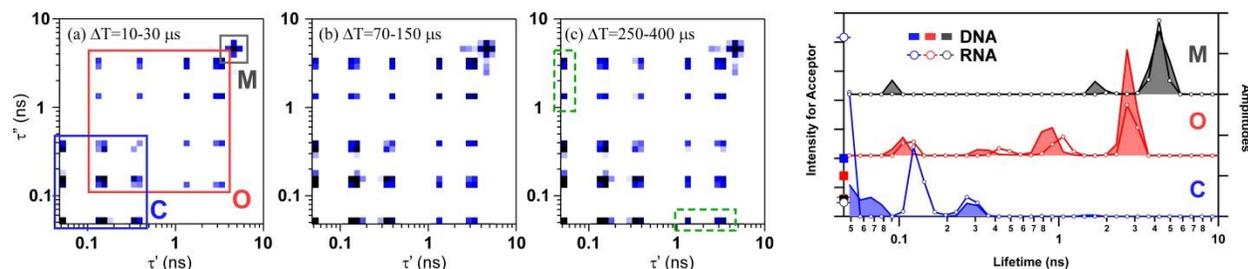


Fig. 1. The 2D fluorescence lifetime correlation maps of RNA at (a) $\Delta T = 10\text{-}30 \mu\text{s}$, (b) $\Delta T = 70\text{-}150 \mu\text{s}$, and (c) $\Delta T = 250\text{-}400 \mu\text{s}$. The solid line squares denote the independent components and dash lines mark the cross peaks. (d) Fluorescence lifetime distributions of RNA and DNA (open symbol: RNA; filled symbol: DNA). The left symbols mean the emission intensity from acceptor dye, which corresponds to the concentration and FRET efficiency of the independent species.

specific correlation is fitted by two-state model to directly extract the equilibrium constant and opening/closing rate constants from FCS photon data.

Results and Discussion

Fig. 1(a)-(c) shows the 2D maps of RNA at $\Delta T = 10$ -30, 70-150, and 250-400 μs , respectively. The diagonal peaks representing the independent components are assigned as open (O), closed (C), and acceptor-missing forms (M).^{1c} Both open and closed forms are composed of several lifetime components, indicative of the structural inhomogeneity. The cross peaks reflect the correlation between open and closed forms, which emerge at $\Delta T = 70$ -150 μs and grow to the maximum intensity at $\Delta T > 250$ μs . By contrast, the appearance time and growing time of cross peaks for DNA are $\Delta T = 30$ -60 μs and >100 μs , respectively

(not shown). It means that the opening-closing transition for RNA is slower than DNA. Fig. 1(d) shows the difference in lifetime distributions between RNA and DNA. The results illustrate the different structural dynamics between RNA and DNA even that they have similar structural distributions.

Fig. 2 shows the species-specific auto- and cross-correlation of the open and closed forms of the RNA and DNA samples. The results show that the opening rate constant of RNA is approximately 10 times slower than DNA ($k_{\text{open}} \approx 530 \text{ s}^{-1}$ and 6050 s^{-1} for RNA and DNA, respectively); in contrast, the difference in closing rate constant is relatively small (that of RNA is roughly twice faster than DNA). The dramatic difference in the opening process is associated to the dissociation of different duplex structures in the stem region, which is A-form for RNA and B-form for DNA.⁴ The A-RNA is more tightly wound than B-DNA, causing very slow opening process.

In conclusion, the structural dynamics of hairpin RNA was successfully compared with the DNA analogue using 2D FLCS combined with the filter functions. The opening and closing mechanisms were analyzed in detail, showing that the difference in the opening-closing transition between RNA and DNA is controlled by the opening process rather than the closing process. This study provides new insight into the fundamental biological processes of RNA and DNA.

Reference

1. (a) K. Ishii and T. Tahara *Chem. Phys. Lett* **2012**, 519-20, 130; (b) K. Ishii and T. Tahara *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 11414; (c) K. Ishii and T. Tahara *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 11423.
2. K. Ishii, C. H. Cheng, and T. Tahara *The 7th annual Meeting of Japan Society for Molecular Science*, 2D20 **2013**.
3. S. Felekyan et al. *ChemPhysChem* **2012**, 13, 1036.
4. H. R. Horton et al. *Principles of biochemistry*, 3rd ed., Prentice Hall, Inc.: Upper Saddle River, NJ, USA **2002**.

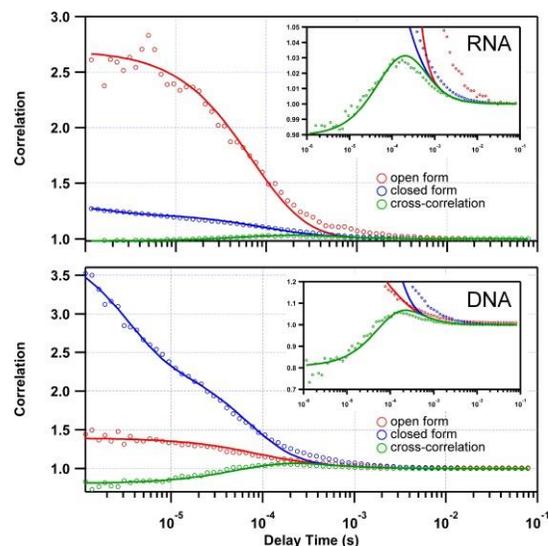


Fig. 2. Species-specific auto- and cross-correlation for open and closed forms of the RNA and DNA samples. The solid lines are the simulation results based on species-specific two-state model. The inset is the zoom-in for the cross correlation curve.