

## 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

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

○乙須拓洋<sup>1</sup>, 石井邦彦<sup>1,2</sup>, 小井川浩之<sup>3</sup>, 新井宗仁<sup>4</sup>, 高橋聡<sup>3</sup>, 田原太平<sup>1,2</sup>

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

(<sup>1</sup>Mol. Spectrosc. lab., RIKEN,<sup>2</sup>RIKEN Center for Advanced Photonics,<sup>3</sup>IMRAM, Tohoku Univ.,  
<sup>4</sup>Grad. Sch. Arts. Sci., Univ. Tokyo) ○Takuhiro Otsu<sup>1</sup>, Kunihiro Ishii<sup>1,2</sup>, Hiroyuki Oikawa<sup>3</sup>,  
Munehito Arai<sup>4</sup>, Satoshi Takahashi<sup>3</sup>, and Tahei Tahara<sup>1,2</sup>

【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)<sup>1</sup>を開発し、蛋白質や DNA への応用を進めている<sup>2</sup>。

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

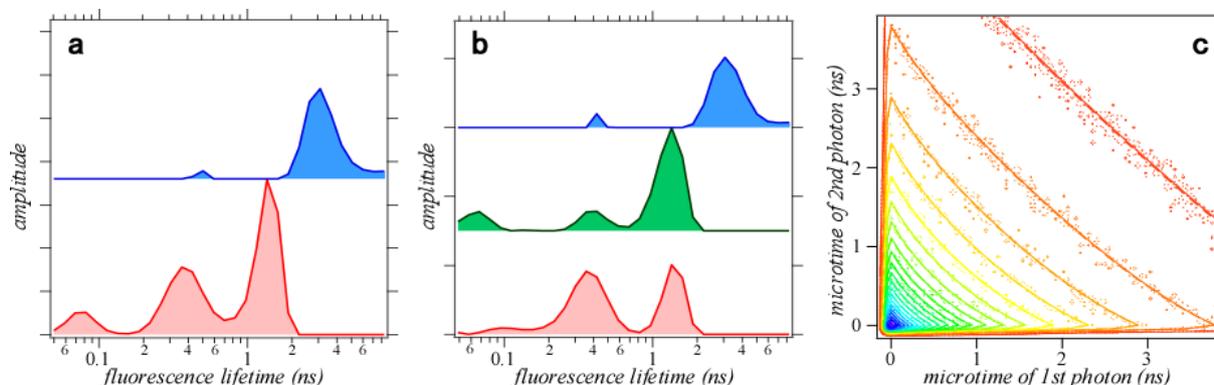


図 1 (a,b) 2D FLCS により得られた独立蛍光寿命成分( $\Delta T=1-100\mu s$ )。二成分解析 (a) と三成分解析 (b) の結果をそれぞれ示している。(c) 実験で得た二次元蛍光相関ヒストグラム(点)とそれぞれ二成分解析 (実線)、三成分解析(破線)で得た相関ヒストグラムの比較。実線と破線はほぼ重なっている。

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<sup>3</sup>。

【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 $\Delta T$ 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  $\mu$ 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。

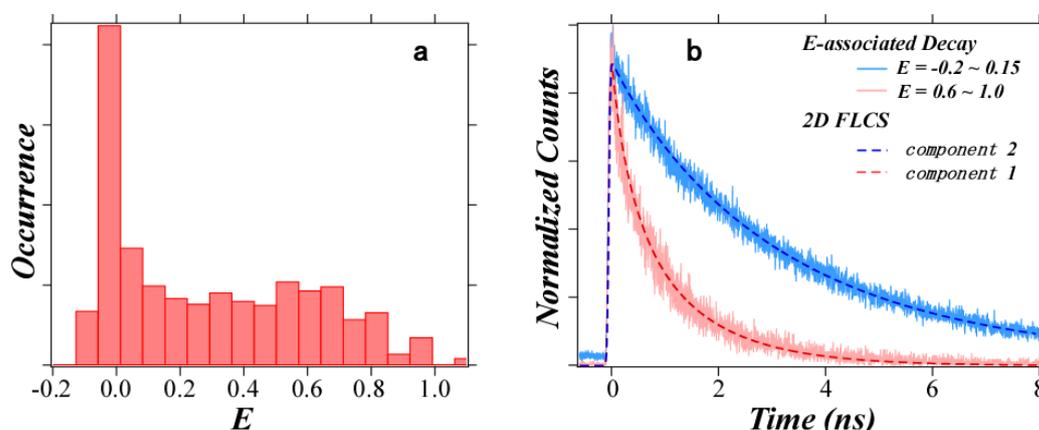


図 2 (a) 一分子 FRET ヒストグラム (b) エネルギー移動効率に依存した蛍光減衰カーブと図 1a データから得た減衰カーブ比較

#### 【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