

生体分子の 1 分子 FRET 計測：分子構造の分布とダイナミクス

(理研¹, 理研・生命システム研究センター²) ○岡本 憲二¹, 日比野 佳代², 佐甲 靖志¹

Single-molecule FRET measurement for biomolecules: distribution and dynamics of the molecular structure

(RIKEN¹, RIKEN QBiC²) ○Kenji Okamoto¹, Kayo Hibino², Yasushi Sako¹

1 分子 FRET (smFRET) 計測は、生体分子の構造に関する情報を得るために有効な手法の 1 つである。特に、非同期的に進行するダイナミクスを個別分子で観察でき、実時間のダイナミクスを計測でき、生細胞中の分子も計測が可能、等の点において優位性がある。その反面、信号の弱さに起因して S/N 比が低く時系列データの解釈が困難であったり、生細胞中での観察においては計測対象が表面 (細胞膜) 上の分子に限られる等、特有の制限もある。そこで、これらの制限を超えるためにわれわれが取り組んできた試みについて紹介する。

時系列データからの状態遷移ダイナミクス解析

smFRET 計測では、信号が微弱なため S/N 比が低く揺らぎが大きい (図 1 (a) 赤線) が、1 分子信号の特徴として、ステップ的な変化を示す場合が多い。これは通常、有限個の状態の間を遷移するダイナミクス (図 1 (a) 青線) であると解釈される。そこで、隠れマルコフモデル (hidden Markov model: HMM) を用いた解析をおこなう。HMM では、時系列データの各点 (x_n) がいずれかの分子状態に対応 (z_n が状態を表す) すると仮定 (図 1 (b)) する。状態遷移については、直前のデータ点の状態 (z_{n-1}) のみによって決まり、一定確率 (状態遷移確率行列 A で与えられる) で遷移が起きる単純マルコフ過程を仮定する。 z_n と x_n とはパラメータ (各状態の蛍光強度や FRET 効率; まとめて ϕ で表す) を使った確率関数で関連付けられる。このモデルについて変分ベイズ (variational

Bayes: VB) 法により状態分布とパラメータの最適解を得る。われわれは、フォトン 1 個 1 個の検出時刻をすべて記録するタイムスタンプ smFRET データに対して、実験データのみから最尤な状態数と状態遷移軌跡を推定する VB-HMM 解析法を開発した[1]。

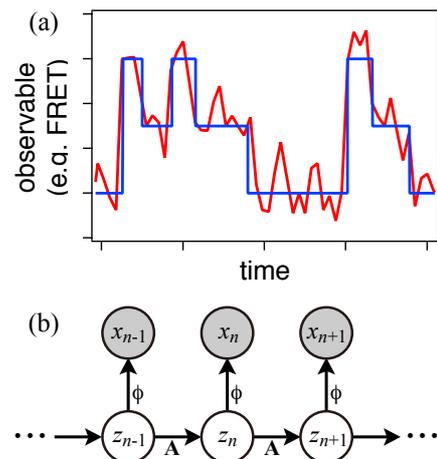


図 1: (a) 1 分子実験データと解析の模式図。(b) HMM のグラフィカル・モデル。

DNA は 2 重らせんの直鎖構造をとるのが一般的だが、4 本の DNA が十字構造を形成する場合があります、ホリデージャンクション (Holliday junction: HJ) と呼ばれる (図 2 (a))。HJ は減数分裂における相同組み替え過程などに関与する。十字の 4 本の腕はそれぞれ 2 重らせんで構成され、交差点近傍での塩基の組み替えによって交差点移動 (branch migration: BM)

現象が起きるが、これは腕の伸縮運動と考えることもできる。そこで、HJ の相対する腕に FRET ラベルを施し、溶液中の自発的な BM ダイナミクスについてタイムスタンプ smFRET 計測をおこなった。

実験データの例を図 2 (b) に示す。蛍光信号 (赤・緑) から総蛍光強度 (黄) と FRET (水色) を計算により求めた。VB-HMM 解析によって時系列データから状態数を推定し、この場合 3 状態の間の状態遷移軌跡を復元することに成功した (青)。

生細胞内部分子の smFRET 計測

smFRET 計測は生細胞での計測にも応用されているが、細胞膜上の分子が観察対象とされる場合が多い。その主な理由としては、細胞では分子を固定できないため主にカメラを用いたイメージング計測がおこなわれるが、その場合、1) 全反射照明系を用いるためガラス基板近傍の分子しか検出できない、2) 細胞質中の分子は拡散係数が大きくカメラの時間分解能では捉えられない、といった点がある。しかし、細胞深部にも興味深い分子や現象はあり、smFRET 計測を実現することで新たな知見が得られる期待も大きい。

そこで、溶液系の実験でおこなわれることの多い、バースト smFRET 計測を生細胞に応用することを考えた。溶液中を自由拡散する分子は、顕微鏡焦点を 1-2 ミリ秒程度で通り過ぎ、その間だけ蛍光を発する (図 3 (a))。そのため時系列ではスパイク状のバースト蛍光信号が得られる。各バーストは 1 分子に対応するので、バースト毎に蛍光強度比を求めて FRET 分布を得ることで、溶液中での分子構造分布に関する情報を得ることができる。

HeLa 細胞中の Raf 分子を対象としてバースト smFRET 計測した実験データの例を図 3 (b) に示す。細胞中のためバックグラウンドノイズの影響が大きいですが、バースト信号が断続的に検出されている様子が見て取れる。FRET 分布を再構成した例を図 3 (c) に示す。時系列データの S/N 比が低いこともありピークが広がっているが、少なくとも 2 つの構造が存在すると考えられる。Raf には開構造と閉構造の少なくとも 2 つの構造状態があると考えられており [2]、それらに対応した分布が検出できていると考えられる。

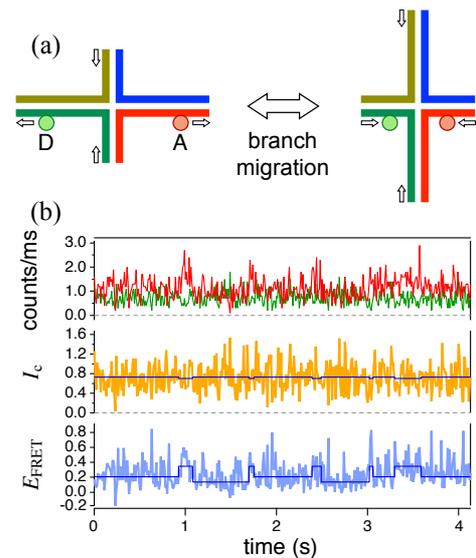


図 2: (a)HJ の BM の模式図。D/A はドナー/アクセプタ。 (b)HJ-BM の smFRET 実験結果の例。中・下段の青実線は VB-HMM 解析結果。

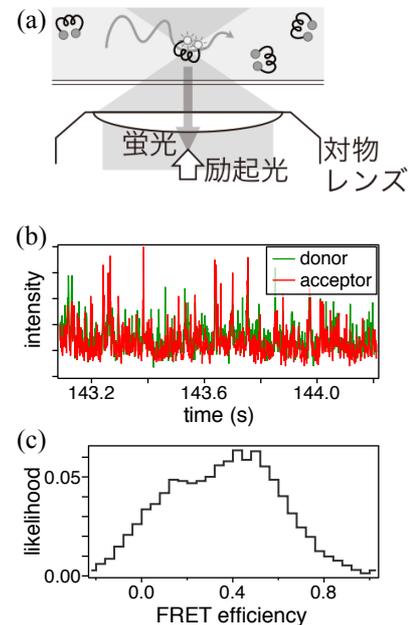


図 3: (a)バースト smFRET 計測の模式図。(b)Raf 分子の細胞内バースト smFRET 実験データの例と(c)得られた FRET 分布。

[1] K. Okamoto and Y. Sako: *Biophys. J.* **103**, 1315–1324 (2012).

[2] K. Hibino, T. Shibata, T. Yanagida, and Y. Sako: *Biophys. J.* **97**, 1277–1287 (2009).