

3P097

二次元蛍光寿命相関分光法による

ウマシトクロム *c* のフォールディング機構の研究

(理研・田原分子分光<sup>1</sup>、奈良先端大・物質創成<sup>2</sup>、理研・光量子工学領域<sup>3</sup>)

○坂口美幸<sup>1</sup>、山中優<sup>2</sup>、廣田俊<sup>2</sup>、石井邦彦<sup>1,3</sup>、田原太平<sup>1,3</sup>

## Folding study of horse cytochrome *c* by 2D fluorescence lifetime correlation spectroscopy

(Molecular Spectroscopy Lab. RIKEN<sup>1</sup>, Graduate School of Materials Science NAIST<sup>2</sup>, Center for Advanced Photonics RIKEN<sup>3</sup>)

○Miyuki Sakaguchi<sup>1</sup>, Masaru Yamanaka<sup>2</sup>, Shun Hirota<sup>2</sup>,  
Kunihiko Ishii<sup>1,3</sup>, Tahei Tahara<sup>1,3</sup>

【序】タンパク質の機能はその立体構造に依存するが、比較的小さなタンパク質の場合、アミノ酸配列をもとに自発的に正しい立体構造(天然状態)が形成される。この過程(フォールディング)の研究はタンパク質の物性を知るうえで重要である。フォールディング機構を研究するには、その過程にあらわれる中間体の構造を決定する必要があり、一分子蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)技術を中心に研究が行われている。当研究グループでは、最近従来の一分子 FRET 実験では計測が困難であったマイクロ秒の時間領域で起こる、比較的速いタンパク質ダイナミクスを観測が可能な二次元蛍光寿命相関分光法(2D FLCS)を開発した<sup>1,2</sup>。このような FRET に基づく手法でタンパク質全体の構造ダイナミクスを議論する際の問題は、一つの標識サイトより得られる構造情報が限られている点である。そこで本研究では、異なる標識サイトを持つタンパク質を 2D FLCS により研究する事で、タンパク質全体のフォールディングダイナミクスを明らかにする事を目的とした。対象には、フォールディング研究においてモデルタンパク質として知られるウマシトクロム *c* (Cyt*c*)を選んだ。今回の発表ではその一つ目の知見となる、C末端のアミノ酸に蛍光色素を標識した標品についての結果を報告する。

【実験】Cyt*c* のC末端アミノ酸残基であるグルタミン酸 104 をシステイン残基に置換した、E104C 変異体を作製した。そしてそのシステイン残基に蛍光色素、Alexa Fluor 546 (AF546) を標識し試料として用いた。図 1 に Cyt*c* の結晶構造と蛍光標識に用いたアミノ酸残基の位置を示す。測定は酸変性条件 (pH 2.5) で、共

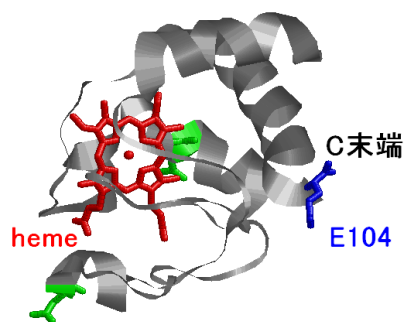


図 1、ウマ Cyt*c* の結晶構造。E104 を青色で、ヘムを赤色で示す。

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自作の測定装置を用いて行った<sup>2</sup>。

【結果と考察】 AF546 はドナー、ヘムはアクセプターとして働く。従って AF546 の蛍光寿命はコンパクトに折りたたまれた天然状態では短くなる。一方、変性に伴いヘム-AF546 間の距離が遠くなるにつれて長くなる。図 2 に 2D FLCS より得られた二次元蛍光寿命マップを示す。これは時間  $\Delta T$  離れた二つの光子について解析したもので、

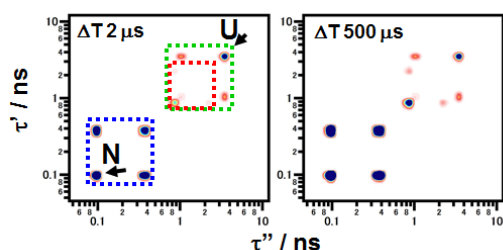


図 2、Cyt c-AF546 の二次元蛍光寿命マップ。

$\Delta T = 2 \mu\text{s}$  を左、 $500 \mu\text{s}$  を右に示す。データは青、赤、緑で示した 3 成分でよく表された。対角線上にあらわれたピークは蛍光寿命で区別されるタンパク質の準安定構造の分布と考える事が出来る。矢印で示した最も短い蛍光寿命を持つピーク

は天然状態 (N)、最も長い蛍光寿命をもつピークは変性状態 (U) と帰属した。また、U と N 以外にいくつかの蛍光寿命分布がみられ、フォールディング過程における中間構造であると推測された。これらの対角線上ピークのクロスピークは、対角線上ピークの相互相関であり、準安定な構造間での交換が平衡化している事を示す。青、赤、緑のいずれも  $\Delta T = 2 \mu\text{s}$  で平衡化した二つの蛍光寿命成分をもつアンサンブルであらわされたが、これらの成分間のクロスピークは  $\Delta T = 500 \mu\text{s}$  でも現れなかった。この事から、N と U は  $2 \mu\text{s}$  より速いタイムスケールで中間状態の一つに構造変化して N アンサンブルと U アンサンブルの状態をとる事、そしてこれらのアンサンブル間の構造変化は  $500 \mu\text{s}$  より遅いタイムスケールで起こる事が示唆された。過去の報告より、U 状態から  $140 \mu\text{s}$  で C 末端ヘリックスを含む、一部ヘリックス構造を有する中間体が形成され、その後  $\sim\text{ms}$  のタイムスケールで N 状態にフォールドする事が提案されている<sup>3</sup>。本研究では C 末端を標識した標品を用いたが、U アンサンブルから N アンサンブルへの構造遷移は C 末端ヘリックスが天然状態へ折りたたむ後者のステップを反映していると考えられる。今後は、図 1 に緑色で示した他の 2 か所の部位を標識した標品に関して解析し、タンパク質フォールディングの全体像を研究したいと考えている。

- 1) K. Ishii and T. Tahara *J. Phys. Chem. B*, **117**, 11414 & 11423 (2013)
- 2) T. Otosu K. Ishii and T. Tahara *Nat. Commun.*, **6**, 7685. (2015)
- 3) H. Fazelinia, M. Xu, H. Cheng and H. Roder *J. Am. Chem. Soc.*, **136**,733 (2014)