

## 単一タンパク質蛍光寿命相関が示す 光合成エネルギー輸送を制御する複数の局所的構造ダイナミクス

<sup>1</sup>マサチューセッツ工科大学, <sup>2</sup>MIT-Harvardエキシトン工学センター, <sup>3</sup>ヴェローナ大学  
○近藤徹<sup>1,2</sup>, Gordon Jesse<sup>1,2</sup>, Pinnola Alberta<sup>3</sup>, Dall'Osto Luca<sup>3</sup>, Bassi Roberto<sup>3</sup>,  
Schlau-Cohen Gabriela<sup>1,2</sup>

### Single-molecule fluorescence lifetime correlation revealed multiple protein dynamics regulating photosynthetic energy transport

○Toru Kondo<sup>1,2</sup>, Jesse Gordon<sup>1,2</sup>, Alberta Pinnola<sup>3</sup>, Luca Dall'Osto<sup>3</sup>, Roberto Bassi<sup>3</sup>,  
Gabriela Schlau-Cohen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, USA

<sup>2</sup> MIT-Harvard Center for Excitonics, USA

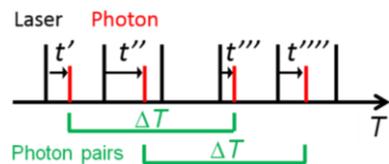
<sup>3</sup> Department of Biotechnology, University of Verona, Italy

**【Abstract】** Fluorescence intensity correlation analysis of single molecules is used to estimate protein conformational dynamics, but the time resolution is restricted due to the binning of photon data. Recently, in order to overcome this limitation, two-dimensional fluorescence lifetime correlation (2D-FLC) analysis was developed [1, 2]. The lifetime-based approach without binning identifies fast dynamics even on the microsecond time scale [3]. However, if the system contains a number of fluorescence emitters, each of which is associated with discrete dynamics, the analysis could obscure the dynamics. Here, we developed a correlation analysis for multiple independent dynamics in single chromoproteins. The new approach allowed the identification of multiple dynamics in photosynthetic light-harvesting complexes (LHCs) from the fluorescence intensity and lifetime as well as the time scale of dynamics. The LHCs, absorbing and transporting light energy, contain chlorophyll (Chl) and xanthophyll carotenoid (Xan). The Xan serves as a quencher of excess light energy on Chls. Therefore, the dynamics around Chl and Xan can regulate the light harvesting. We revealed that multiple dynamic components individually contribute to the energy transport function of LHCs, leading to photosynthetic photoprotection.

**【序】** 近年、タンパク質構造ダイナミクスの生体機能への寄与が明らかになってきた。タンパク質の動的物性解析には、単一タンパク質蛍光分光が広く用いられている。単一タンパク質の蛍光時間変化を測定すると、タンパク質構造ダイナミクスを反映した蛍光揺らぎを観測できる。タンパク質の準安定構造ごとに蛍光強度が異なるので、強度変化を調べれば構造状態の分布が調べられる。強度状態ごとに寿命を見積もれば、強度・寿命の2D分布も得られ、それを基に状態間のダイナミクス速度が評価できる [4]。しかし、蛍光強度を見積もる際にはある程度の積算時間が必要なため、時間分解能が制限されてしまう。従って、速いダイナミクスは解析できない。

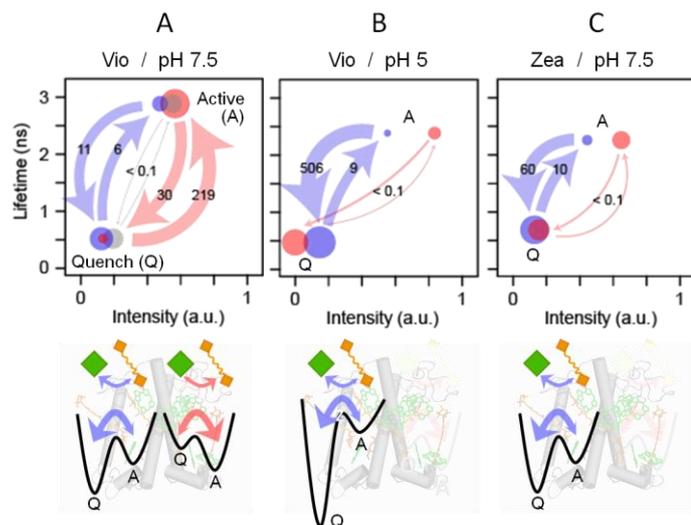
そこで最近、時間相関単一光子計数法 (TCSPC) で得た蛍光光子データを、蛍光寿命を基に解析する2次元蛍光寿命相関法 (2D-FLC) が開発された [1, 2]。時間積算することなく、光子そのものの寿命相関を解析するため、 $\mu$ 秒スケールで生じる速いダイナミクスが解析可能である [3]。一方で、これまでの解析では、多数の蛍光体が関与する複数のダイナミクスを同定するのは難しかった。そこで我々は、解析手法を改良し、複数の蛍光体を含む光合成アンテナタンパク質 LHCSR1 の解析を行った [5]。

**【実験】** Ni-NTA でコートしたカバーガラスに、His-tag 修飾した LHCSR1 を固定した。単一タンパク質を 640 nm のレーザーパルスで励起し、TCSPC で蛍光光子データを測定した。各光子ごとに、観測時間  $T$  と蛍光寿命時間  $t$  (パルス励起から蛍光光子検出までの時間) が得られる (図 1)。 $\Delta T$  だけ時間間隔をおいて検出される 2 つの光子から、1 組の寿命時間セット ( $t_1, t_2$ ) が得られるので、 $t_1$ - $t_2$  の 2 次元プロットができる。全光子ペアについてプロットし、2 次元蛍光減衰 (2D-FD) を得る。それを Fitting 解析し、2 次元寿命相関 (2D-FLC) を見積もった。様々な  $\Delta T$  で同様に解析し、 $\Delta T$  に関する相関関数を得た。それを Fitting 解析し、ダイナミクス成分の数 (蛍光体の数)、蛍光寿命状態および各々の蛍光強度、状態間の遷移速度、を求めた。結果はダイアグラムとしてまとめた (図 2)。解析プログラムは全て MatLab で作成した。



**Figure 1.** Fluorescence photon data measured by TCSPC

**【結果】** 単一 LHCSR1 の蛍光光子データを解析した。長寿命 (Active) と短寿命 (Quench) の 2 つの蛍光寿命状態が観測され、2 状態間の遷移として 3 つの成分が同定された (図 2A 上)。Active 側に偏った成分 (赤)、Quench 側に偏った成分 (青)、遷移速度が遅くほぼ止まっている成分 (灰色)、に分類できる。LHCSR1 には 8 個のクロロフィル  $a$  分子 (Chl) と 4 個のカロテノイド分子 (Car) が結合しており、Chl が蛍光体、Car がエネルギー消光体として機能する。従って、Active $\leftrightarrow$ Quench 状態間での遷移は、Chl-Car 近傍の構造ダイナミクス (分子の相対配置の変動) による蛍光強度と寿命の増減を反映している (図 2A 下)。観測された 3 つの成分は、異なる



**Figure 2.** Diagrams of multiple dynamic components in single LHCSR1s with Vio at pH 7.5 (A) and 5 (B) and with Zea at pH 7.5 (C). Circle size and arrow thickness exhibit a relative population and transition rate between active and quenched states, respectively. Numbers on the arrow indicate a transition rate in 1/s. Bottom panels show schematics of protein conformational dynamics associated with Chl-Car pairs as well as potential energy landscapes.

Chl-Car 対の近傍で生じる構造ダイナミクスに対応する。特に、Active 側と Quench 側に偏った成分に対応する 2 つの Chl-Car 対が、光エネルギーの輸送量を制御している。

実際の生体系では、太陽光の強度が高くなると光合成光反応の頻度が上がり、結果として生体膜内の pH が低下する。pH 低下は①タンパク質の構造変化と②Car 分子の分子組成変化 (Vio $\rightarrow$ Zea) を誘起する。そこで、低 pH 条件及び Zea 結合条件で LHCSR1 を解析した。低 pH では Active 成分の動きが止まり、Quench 成分はより Quench 側に偏った (図 2B)。また、Zea 結合により Active 成分が止まった (図 2C)。つまり、LHCSR1 は光環境変化に応答して、異なる Chl-Car 対のダイナミクス特性を各々別々に調整している。このように、新たな解析法を用いることで、光合成エネルギー輸送を制御する複数の局所的構造ダイナミクスの同定が可能となった。

**【参考文献】** [1] Ishii, K. and Tahara, T., *J. Phys. Chem. B* 117, 11414 (2013); [2] Ishii, K. and Tahara, T., *J. Phys. Chem. B* 117, 11423 (2013); [3] Otsu, T., et al., *Nat. Comm.* 6, 7685 (2015); [4] Kondo, T., et al., *Nat. Chem.* 9, 772 (2017); [5] Kondo, T., et al., *to be submitted*.