トピックス
新進気鋭
シリーズ

第51回 日本生物物理学会年会 若手招待講演

二次元蛍光寿命相関分光法によるマイクロ秒
蛋白質ダイナミクス研究

乙須拓洋 理化学研究所田原分子分光研究室

1. はじめに

蛋白質の動的性質の理解は、言うまでもなく生物物理研究における重要命題の1つである。蛋白質のダイナミクスはピコ秒から秒、分にわたる時間階層性があり、真の理解のためにはまず各階層（時間領域）でのダイナミクスを定量的に解析し、そこから階層間のつながりを理解することが必要である。我々の研究室では、特にマイクロ秒領域での生体高分子の構造転移ダイナミクスを定量的に解析するための新たな手法として、二次元蛍光寿命相関分光法（2D FLCS）を最近開発し^{1),2)}、蛋白質ダイナミクス研究への応用を精力的に進めている³⁾。

2. マイクロ秒での蛋白質ダイナミクス研究

マイクロ秒でのダイナミクスは、特に蛋白質折り畳み初期過程の理解において重要である。折り畳み初期過程では、二次構造の形成や疎水性残基間の相互作用による構造収縮がマイクロ秒で起こるとの報告があるが、立体構造形成が実際にどのような順序で効率的に行われているかはいまだ解明されていない。

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研究においては単一分子分光法による解析が最適であるが、単一分子から取得可能な信号強度が十分でないことから、その時間分解能は通常サブミリ秒程度である。一方で蛍光相関分光法はサブマイクロ秒までのダイナミクス研究が可能な手法だが、ダイナミクス由来の相関信号がどのような構造変化に対応しているかについて定量的な議論は困難である⁴⁾。

3. 二次元蛍光寿命相関分光法

この点に関して、我々の研究室では2D FLCSを最近開発した。2D FLCSでは、蛍光寿命の解析をもとに相関信号の帰属を行う。蛍光寿命は周囲環境に敏感であり、特にFRETによってのみ変化する場合、エネルギー移動効率（ E ）とドナー色素の蛍光寿命（ τ ）、そして蛋白質中の色素間距離（ r ）が $E = 1 - \tau/\tau_0 \propto (1/r)^6$

（ τ_0 はアクセプターがないときのドナー蛍光寿命）の関係性を有することから、ドナー蛍光寿命より色素間距離、つまり蛋白質構造を知ることができる。

測定では顕微鏡を用い、焦点領域から検出される蛋白質由来の蛍光光子を検出する。このとき励起光源としてパルス光を用いることで、蛍光寿命の情報を励起パルスと検出される蛍光光子の時間差として取得する（図1a）。解析では、ある時間差 ΔT を有するすべての光子ペアについて各光子の蛍光寿命の情報を抽出し、図1cに示す二次元マップを作製する。図1bのような構造転移が起きている場合、 ΔT が構造転移の持定数より短い場合（ ΔT_1 ）は対角ピークのみが、構造間の転移が ΔT よりも速い場合（ ΔT_2 ）は対角ピークに加えクロスピークが二次元マップ上に現れる（図1c）。クロスピークは1分子由来の光子ペアが異なる蛍光寿命を示す、つまり ΔT の間に構造変化が起きていることを意味することから、二次元マップ上のクロス

図 1

2D FLCS の概要。(a) 顕微鏡の焦点領域から検出される蛍光光子列。(b, c) 溶液中に蛍光寿命（構造）の異なる2成分(b)が存在するときに、得られる二次元蛍光寿命相関マップ(c) ($\Delta T_1 < (k_{AB} + k_{BA})^{-1} < \Delta T_2$) [対角ピークの強度は対応する分子の数、クロスピークの強度は対応する2分子の相乗平均を表す]。

Two-dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy on the Conformational Dynamics of Proteins

Takuhiro OTOSU

Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN

図 2

(a) BdpA の天然状態構造。ドナー (D) およびアクセプター (A) の位置は球で表している。(b) $\Delta T = 1-20 \mu s$ で得られた二次元マップ。BdpA の構造不均一性を反映している部分について点線で強調している。(c) 2つの GdmCl 濃度で得られた BdpA の構造不均一性比較。両条件ともに $\Delta T = 1-20 \mu s$ で解析を行った。ドナー蛍光寿命より算出した色素間 (D-A) 距離もあわせて表示している。

ピークの蛍光寿命と、出現する時定数 (ΔT) をもとに、どのような構造間のダイナミクスがどのような時定数で起こっているかを詳細に議論できる。2D FLCS は蛍光相関分光法の高い時間分解能を保持したまま解析可能な手法であるため、マイクロ秒ダイナミクスの定量的解析において非常に有用な手法である³⁾。

4. BdpA の構造転移ダイナミクス

本研究では 2D FLCS を BdpA の構造転移ダイナミクス研究に適用した。BdpA は古くから折り畳み研究が行われている蛋白質で、変性状態から天然状態への 2 状態遷移による折り畳みが提案されてきた。しかしながら、小井川らが最近行ったマイクロ秒での構造不均一性解析により、BdpA の複雑な折り畳み過程が新たに示唆された⁵⁾。本研究ではこの点を詳細に解析すべく 2D FLCS による解析を行った。

まず、BdpA に 2 つのシステイン残基を導入し、ドナー、およびアクセプターとなる色素を結合させた (図 2a)。実験には変性剤としてグアニジン塩酸 (GdmCl) を用い、BdpA の変性状態から天然状態にいたる構造間ダイナミクスを検出するため、変性中点付近 (2M GdmCl) で測定を行った。解析の結果、BdpA の構造は非常に不均一であり、かつ各構造間の転移速度は 10 マイクロ秒よりも速いということが蛍光寿命分布、ならびにクロスピークの存在より強く示唆された (図 2b)。また、異なる GdmCl 濃度での実験の結果、BdpA の構造分布 (蛍光寿命分布) は溶液条件に依存して大きく変化する一方、分布内での構造転移については変わらず 10 マイクロ秒以下という速い時定数で起こっていることが示唆された (図 2c)。従来の単一分子分光法での蛍光強度解析では、時間分解能より速いダイナミクスは平均化されるため、検出されたシグナルが単一成分由来か平均化した不均一成分由来か区別できない。ゆえに今回の結果は 2D FLCS による

高い時間分解能での蛍光寿命解析によってのみ得られた新たな知見である。今後はより広範囲な変性剤濃度での測定を行うことで、BdpA のマイクロ秒構造転移ダイナミクスの描像について理解を深めていきたい。

5. おわりに

近年 Shaw らにより、ミリ秒での all atom MD simulation が報告され、蛋白質折り畳みの全過程を分子レベルで議論することが可能となりつつある⁶⁾。そのような潮流の中、2D FLCS を用いた蛋白質マイクロ秒ダイナミクスの定量的解析を推し進めていくことで、実験と理論の協働による蛋白質折り畳み機構の包括的理解に貢献できれば、と望んでやまない。

謝 辞

本研究は、田原太平主任研究員、石井邦彦専任研究員 (理研)、高橋聡教授、小井川浩之博士 (東北大学)、新井宗仁准教授 (東京大学) との共同研究である。多大なる御指導、御助力に深謝します。

文 献

- 1) Ishii, K., Tahara, T. (2013) J. Phys. Chem. B **117**, 11414-11422. DOI: 10.1021/jp406861u.
- 2) Ishii, K., Tahara, T. (2013) J. Phys. Chem. B **117**, 11423-11432. DOI: 10.1021/jp406864e.
- 3) Otosu, T. *et al.* 投稿準備中。
- 4) 石井邦彦, 田原太平 (2012) 生物物理 **52**, 295-298. DOI: 10.2142/biophys.52.295.
- 5) Oikawa, H. *et al.* (2013) Sci. Rep. **3**, 2151. DOI: 10.1038/srep02151.
- 6) Shaw, D. E. *et al.* (2010) Science **330**, 341-346. DOI: 10.1126/science.1187409.

乙須拓洋 (おとす たくひろ)

理化学研究所基礎科学特別研究員
2009 年九州大学大学院生物資源環境科学府博士課程修了、現研究室での特別研究員を経て現職。
研究内容: 蛋白質の動的構造機能相関
連絡先: 〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
E-mail: otosu@riken.jp
URL: <http://www.riken.jp/lab-www/spectroscopy/>

乙須拓洋