

プロジェクト名(タイトル):

## ALEX 計測による1分子 FRET データの最大エントロピー・クラスタリング解析

利用者氏名:

○岡本 憲二、佐甲 靖志

理研における所属研究室名:

開拓研究本部 佐甲細胞情報研究室

## 1. 本プロジェクトの研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

蛋白質分子の構造は機能と深く関わっており、さまざまな手法で調べられている。しかし、構造可変な蛋白質の、実際の生きた細胞中での構造は明らかになっていない場合が多い。われわれは ALEX (Alternating Laser EXcitation) 法を応用し、細胞質中を自由拡散する分子から蛍光バースト信号を検出することに成功した。バーストからは1分子毎の FRET (Förster resonance energy transfer) 効率  $E_{app}$  (色素間距離に対応するため分子構造の手がかりが分かる)、ストイキオメトリ  $S_{app}$  (2色の蛍光ラベルのラベル比)、蛍光バースト強度  $I_{app}$  等の情報が得られる。生細胞中の CRAF 蛋白質を計測したバーストの  $S_{app}$  vs  $E_{app}$  2次元分布の例を図に示す。

バースト分布には、さまざまな状態の分子が含まれていると考えられるが、われわれは特に細胞中でのダイマー形成に注目しており、蛍光バースト強度からモノマーとダイマーの混在状況を判別するデータ解析法を開発した。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

計算方法は基本的に、昨年度までの報告書に記載したものと同一である。以下で簡単に説明する。

ALEX 計測では、各バーストは  $E_{app}$ ,  $S_{app}$ ,  $I_{app}$  の値を持つ。モノマー/ダイマー状態は異なる  $I_{app}$  分布を持つため、図のような  $E_{app}$ - $S_{app}$  の2次元分布を考えた時、最大エントロピー法で最適化するクラスタリング解析法を用いることで、それぞれの状態の分布が推定できる。

今年度は、モノマー/ダイマー以外のマイナー成分(2色の蛍光ラベルのうち一方が失活している分子)を1成分から2成分に増やし、精度の向上を試みた。

本課題では、C++言語を用いたプログラムを自作し、OpenMPを用いた並列化で高速化を図り、特殊関数と逆行列計算に Intel<sup>®</sup> Math Kernel Library を利用した。

## 3. 結果

実験データに適用した例を、モノマー/ダイマー状態の違いを色分けして図で表した。モノマー(青)およびダイマー(赤)成分と、上下に分かれた2つのマイナー成分(どちらも緑)が混在した分布が得られた。

## 4. まとめ

解析の成分数を増やしたことにより、従来法では検出できていなかったマイナー成分を分離することができており、解析精度が向上したことが確認できた。

## 5. 今後の計画・展望

今年度は、装置と試料の都合により、多様なサンプルの計測実験がおこなうことができず、解析法の動作の検証にとどまった。今後は多様な実験条件(蛋白質の変異体、異なる蛋白質分子や細胞種、細胞刺激条件、など)での計測をおこない、解析結果を比較することで、生物学的に意義のある知見を得る段階に進みたい。

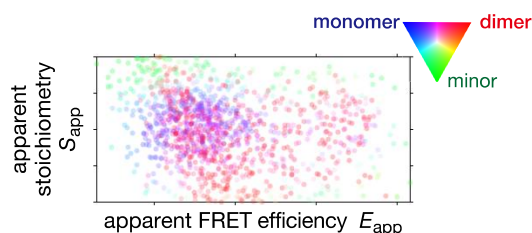


図: ALEX 計測データの解析結果の例。(a)装置改造前。(b)装置改造後。バースト分布が解析結果にもとづいて色付けしてある。

2022年度 利用研究成果リスト

**【ポスター発表】**

岡本 憲二、佐甲 靖志:「生細胞中の細胞質タンパク質 CRAF の二量体化状態および構造状態遷移に関する詳細解析」日本生物物理学会第60回年会、1Pos086、2022年9月28-30日(函館)。