

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(a)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、 E_{app} - S_{app} の2次元分布を最適化する最大エントロピー (Maximum Entropy: ME) 法をクラスタリング解析法と組み合わせることで、それぞれの状態について E_{app} - S_{app} 分布が推定できる。

今年度は、 I_{app} 方向に有限個の状態を仮定せず、ノンパラメトリックな I_{app} 分布を仮定することで、3次元 ME 法による状態分布解析をおこなった。

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[®] Math Kernel Library を利用した。

3. 結果

実験データに3次元 ME 法解析を適用した例を図(b)に示す。 E_{app} - S_{app} - I_{app} 3次元空間中の状態分布から、各 E_{app} - S_{app} 位置での平均 I_{app} 値を求め、カラー表示した。実験データを再現でき、強度分布からダイマー形成を推定できることを確認した。ただし、実験データやシミュレーション生成したデータなどへの解析結果を従来法と比較したところ、従来法の方がよい結果が得られる場合が多いことが分かった。

4. まとめ

新しい解析法を開発し、実験データに適用できることを確認した。今後は、基本的には従来法を用いながら、有効な条件では新解析法を用いる方針で運用する。

5. 今後の計画・展望

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。

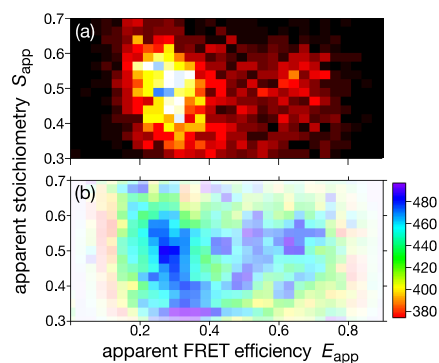


図: (a) ALEX 計測データの例。(b) 3次元 ME 解析結果の例。各 E_{app} - S_{app} 座標での平均 I_{app} をカラー表示してある。