

平成22年 4月15日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19056011

研究課題名（和文） 液体ヘリウム温度での単一分子分光による酵素の構造・機能相関の研究

研究課題名（英文） Structure and function relationship of enzymes studied by single-molecule spectroscopy at liquid-helium temperature

研究代表者

松下 道雄 (MATSUSHITA MICHIO)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：80260032

研究代表者の専門分野：レーザー分光、化学物理

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：一分子、タンパク質、低温、分光、構造機能相関

1. 研究計画の概要

酵素は生理条件下で絶えずその三次元構造を変えながら機能している。液体ヘリウム温度における単一タンパク質分光は、酵素が生理条件下で取る様々な構造を一個一個つぶさに観察できる、という点で他の手法では全く不可能な情報が得られる。しかし、これまでこの手法は技術的に近赤外領域に限られており、ごく僅かのタンパク質しか研究できなかった。

我々は可視域の実験を可能にしてこの手法を一般化するとともに、青色光によって自らの酵素機能を制御する青色受容体酵素の分子内機能制御機構を解明することを目的としている。これを実現するために必要な課題は以下の通りである。

- (1)液体ヘリウム中で使える可視光用対物レンズの開発。
- (2)単一タンパク質観察中の試料の温度変化の実現。

2. 研究の進捗状況

(1)低温可視域用対物レンズの開発。冷却可能で色収差のない対物レンズとして、一体成形反射対物レンズを開発した(文献4)。これを用いて緑色蛍光タンパク質一個の二光子蛍光スペクトルの測定に世界で初めて成功した(文献2)。波長域を更に短波長へ拡張するため、焦点距離を半分にした対物レンズを開発し、回折限界の結像能を360 nmまで実現した(文献1)。

(2)単一タンパク質の温度変化の測定の実現。光合成細菌の光捕集色素・タンパク複合体について5 - 18 Kまでの温度変化の測定を行い、タンパク質内部の熱活性化型の構造変化

に加えて、温度に依存しない、プロトンのトンネリングによる構造変化を捉えることができた(文献3)。

(3)光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC)の単一タンパク質分光。PACはミドリムシの青色光回避をつかさどる光受容体として発見された。補因子として含んでいるFADの青色光吸収が光受容信号の引き金になっているが、FADは視覚におけるレチナールとは異なり、シグナリングに使えるような分子内自由度を持たないので、信号伝達機構に関心が集まっている。また、PACは青色光受容によって自らの酵素機能を活性化して細胞内信号伝達物質であるcAMPを産生するため、生体内の化学反応の光による空間コントロールという観点からも注目を浴びている。われわれは、PAC一分子の低温における蛍光スペクトルの測定に世界で初めて成功し、光信号の初期過程と考えられる可逆的な蛍光スペクトルシフトを捉えた。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。
(理由)対物レンズの開発が予想以上に順調に進み、温度変化の実現も、低温装置の最小限の改造で実現できたため。

4. 今後の研究の推進方策

PACの光受容による構造変化について、より直接的な情報を単一タンパク質分光によって得るために、PAC I分子当り8個あるFAD結合部位のうちの一つだけを再構成して蛍光分光を行なう。平行してPACのアミノ酸置換や溶媒の重水置換による重水素効果、などを測定する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Masanori Fujiwara, Satoru Fujiyoshi, and Michio Matsushita, “Single-component reflecting objective for ultraviolet imaging and spectroscopy at cryogenic temperature”, *J. Opt. Soc. Am. B* **26**(7) 1395 – 99 (2009). 査読有
2. Satoru Fujiyoshi, Masanori Fujiwara, and Michio Matsushita, “Visible Fluorescence Spectroscopy of Single Proteins at Liquid-Helium Temperature”, *Phys. Rev. Lett.* **100**(16) 168101-1 - 4 (2008). 査読有
3. Hiroyuki Oikawa, Satoru Fujiyoshi, Takehisa Dewa, Mamoru Nango, and Michio Matsushita, “How Deep Is the Potential Well Confining a Protein in a Specific Conformation? A Single-Molecule Study on Temperature Dependence of Conformational Change between 5 and 18 K”, *J. Am. Chem. Soc. (Communication)* **130**(14) 4580 - 4581 (2008). 査読有
4. Satoru Fujiyoshi, Masanori Fujiwara, Changman Kim, Michio Matsushita, Antoine M. van Oijen, and Jan Schmidt, “Single-component reflecting objective for low-temperature spectroscopy in the entire visible region”, *App. Phys. Lett.* **91**(5) 051125-1 - 4 (2007). 査読有

[学会発表] (計10件)

- ①藤原正規、藤芳暁、松下道雄、「低温下における単一タンパク質分光のための反射対物レンズの開発」第3回分子科学討論会、2009年9月24日、名古屋
- ②藤芳暁、平野充遥、松下道雄、伊関峰夫、渡辺正勝、「光活性化アデニル酸シクラーゼの単一タンパク質分光」第3回分子科学討論会、2009年9月24日、名古屋
- ③藤芳暁、平野充遥、古屋陽、藤原正規、松下道雄、伊関峰夫、渡辺正勝、「低温の単一タンパク質分光の励起過程の検討」第2回分

- 子科学討論会、2008年9月26日、福岡
- ④古屋陽、内山大輔、藤芳暁、松下道雄、末守良春、出羽毅、南後守、「顕微分光による光合成アンテナ複合体間のエネルギー移動の研究」日本物理学会第63回年次大会、2008年3月23日、東大阪
 - ⑤藤原正規、藤芳暁、松下道雄、「1.5 Kで使える反射対物レンズの球面収差及び色収差の改善」日本物理学会第63回年次大会、2008年3月23日、東大阪
 - ⑥藤芳暁、松下道雄、「ニ光子蛍光による低温の単一タンパク質分光」日本物理学会第63回年次大会、2008年3月23日、東大阪

[その他] なし