

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13621

研究課題名(和文) 蛍光タンパク質発色団部位の赤外スペクトル測定への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to measure IR spectrum of fluorescent protein chromophore

研究代表者

酒井 誠 (Sakai, Makoto)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：60298172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らの開発した過渡蛍光検出赤外超解像顕微鏡法の高感度かつ高空間分解能の特性を利用して、蛍光タンパク質の発色団の赤外スペクトルの測定を実現できないかと考えた。その実現には、水溶液中における蛍光生体分子の赤外スペクトル測定が必須であるが、本研究では、タンパク質の発色団であるフラビンを含めた蛍光生体試料の水溶液中における赤外スペクトル測定および振動緩和過程の観測に成功し、多くの基礎データを収集できた。これらの結果は、フラビンタンパク質(発色団：フラビン)やロドプシン(発色団：レチナール)等の蛍光タンパク質における発色団の赤外スペクトル測定に大いに役立つデータと考えている。

研究成果の概要(英文)：IR spectroscopy is one of the powerful tools for investigation of structure of proteins. However, it is difficult to measure IR spectra in aqueous solution because of large IR absorption of water. In this study, we developed a novel transient fluorescence-detected resonance IR spectroscopy, and succeeded the measurement of IR spectrum of flavin mononucleotide, that is one of the fluorescent protein chromophore, in aqueous solution. Measured spectrum was compared with those measured by Raman spectroscopy. These results will be regarded as the data very useful for the measurement of IR spectrum of fluorescence protein chromophore.

研究分野：物理化学

キーワード：赤外分光 タンパク質 発色団 超解像 フラビン

1. 研究開始当初の背景

本研究では、申請者らの開発した過渡蛍光検出赤外超解像顕微鏡法の高感度かつ高空間分解能の特性を利用して、蛍光タンパク質の発色団の赤外スペクトルを測定できないかと考えた。具体的には、顕微鏡条件下において、試料セル表面のごく近傍 (<2 μm) の領域に赤外光を集光し、さらに可視光を入射することで蛍光タンパク質発色団から生じる過渡蛍光を検出する。このとき、1) 過渡蛍光は発色団部位からのみ発生し、タンパク質の他の部位からは発生しない、2) 赤外光を波長掃引する、ことにより赤外吸収スペクトル測定の実現を目指した。

本研究を実現するには2つの breakthrough が必要であった。即ち、1) 水溶液中での赤外スペクトル測定を実現し、2) タンパク質発色団部位の赤外情報のみを抽出する、の実現が必須であった。しかし、周知の通り、水は極めて強い赤外吸収を有するため、水溶液中ではOH伸縮振動領域において赤外光はほとんど透過しない。

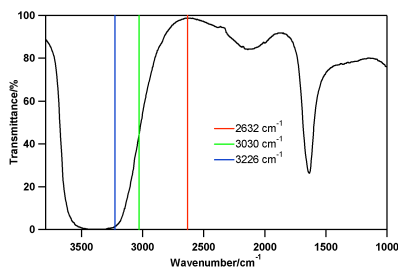


図1：水 (10 μm 厚) の赤外透過スペクトル

例えば、厚さ 10 μm の特殊な溶液セルを使った場合の透過率を図1に示すが、OH伸縮振動バンドから遠く離れた 2632 cm⁻¹ では赤外光はほとんど透過するが、バンドの裾である 3030 cm⁻¹ になると赤外光の透過率は 0.43、3226 cm⁻¹ では 0.013 まで減少し、バンドのピーク付近では赤外光は全く透過しない。このような条件下では通常の赤外分光測定で希薄な水溶液中の溶質分子の赤外吸収を得ることは不可能である。加えて、タンパク質発色団の赤外スペクトル測定を試みる場合、発色団部位の赤外吸収と発色団部位以外の赤外吸収が重なってしまうために発色団部位のみの赤外スペクトルをことは極めて困難であった。

2. 研究の目的

以上の背景の中、「**蛍光タンパク質発色団部位の赤外スペクトル測定への挑戦**」を提案した。具体的には、赤外超解像顕微鏡条件下において、試料セル表面のごく近傍 (<2 μm) の領域に赤外光を集光し、さらに可視光を入

射することで水溶液中における蛍光タンパク質発色団から生じる過渡蛍光を検出する。さらには赤外光を波長掃引することによる赤外吸収スペクトル測定の実現を目指す試みである。試料セル表面のごく近傍領域のみを観察できるため、溶媒である水の強い赤外吸収に妨害される前に信号を抽出できると同時に、過渡蛍光は発色団部位からのみ発生し、タンパク質の他の部位からは発生しないため発色団部位のみの赤外情報の抽出が期待される。

3. 研究の方法

本研究を達成する手順としては、レーザー蛍光顕微鏡の高感度・高 S/N 比化を極限まで高めた、1) 共焦点型赤外超解像顕微鏡の構築、2) 試料セル表面のごく近傍 (<2 μm) の領域に光を集光し、そこからの信号のみを検出、3) 水の赤外吸収条件下における蛍光生体分子の信号抽出/赤外スペクトル測定、4) 蛍光タンパク質発色団への適用、である。これにより蛍光タンパク質発色団部位の赤外吸収スペクトル測定の実現を目指した。具体的な光学系レイアウトを図2に示す。

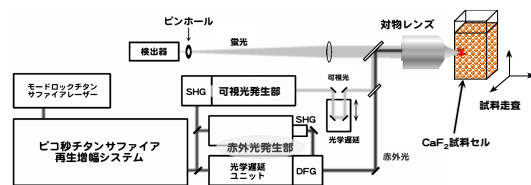


図2：光学系レイアウト

また、本研究手法は、振動準位を經由して蛍光を観測する過渡蛍光検出赤外分光法を利用しているため、赤外光と可視光の遅延時間を調節して行うピコ秒時間分解測定により、**振動緩和過程が必ず同時に観測される**利点を兼ね備えている。よって、振動緩和に伴うエネルギー移動観測も同時に行うことを計画した。

4. 研究成果

平成27年度は、予備実験として以下の4つの項目を達成目標とした。

- (1) 共焦点型赤外超解像顕微鏡の構築
- (2) 過渡蛍光信号の観測
- (3) 溶媒 (水以外) の振動共鳴条件下における溶質分子の過渡蛍光 (赤外情報に相当) の検出
- (4) 水溶液中における溶質分子の赤外吸収情報の抽出

(1)、(2)については、対物レンズに中赤外波長領域の透過率を確保するために反射対物レンズを採用することで、過渡蛍光の信

号観測に十分な光学系構築に成功した。もちろん、過渡蛍光信号の観測にも成功した。この装置の空間分解能は、過渡蛍光の波長と反射対物レンズのNAで一意に決まるが、本研究では、溶質分子にローダミン6Gを使用したので過渡蛍光波長：565 nm、反射対物レンズのNA = 0.4を使用した結果、およそ900 nmの空間分解能を達成した。また、深さ方向の空間分解能（焦点深度）は、およそ2マイクロメートルであった。非常に高い空間分解能を達成できたため、(3)の項目についても検証した。赤外吸収の比較的弱いクロロホルムおよびアセトニトリルといった非水素結合性溶媒を用いてその振動共鳴条件下におけるローダミン6G分子の過渡蛍光信号の検出を試みた。その結果、CH伸縮振動の共鳴条件下でも強い過渡蛍光の検出に成功した。さらに、ローダミン6G水溶液を用いて、(4)の検証を行った。水のOH伸縮振動は極めて強い赤外吸収を示すため、過渡蛍光信号が観測できるのか危惧していたが、信号強度は弱いものの水溶液のOH伸縮振動共鳴条件下においても過渡蛍光の検出に成功した。以上により、平成27年度は当初の研究計画を全ての項目において達成できたと考えている。

平成28年度は、平成27年度に蛍光色素であるローダミン6Gを試料に用いて、水溶液においても過渡蛍光の検出および赤外スペクトルの測定に成功した事を受けて、元来フラビタンパク質（発色団：フラビン）やロドプシン（発色団：レチナール）等の蛍光タンパク質に対して過渡蛍光の検出および赤外スペクトル測定を試み計画であったが、研究代表者（私）が平成28年4月に東京工業大学から岡山理科大学に異動した事に伴い、実験環境が大きく変化したため、研究進捗に遅れが生じた。しかしながら、蛍光タンパク質の発色団の1つであるフラビン分子を対象に過渡蛍光の測定を試みた結果、過渡蛍光の信号検出に成功するとともに、赤外スペクトル測定にも成功した。

平成29年度は、フラビンを含めた蛍光生体試料の水溶液中における赤外スペクトル測定および振動緩和過程の観測に成功し、多くの基礎データを収集できた。これらの結果は、フラビタンパク質（発色団：フラビン）やロドプシン（発色団：レチナール）等の蛍光タンパク質における発色団の赤外スペクトル測定に大いに役立つデータと考えている。

今後、本研究手法による蛍光タンパク質発色団部位の赤外情報抽出が実現すれば、近年次々と新規開発されている蛍光タンパク質の発色団構造解析さらには光変換機構解明に極めて有効であることが期待される。これまでは、蛍光タンパク質の発色団構造解析には紫外共鳴ラマン分光（可視共鳴ラマンでは

発色団からの強い蛍光のため測定が困難であるため）が唯一の方法であったが、紫外共鳴ラマンでは発色団部位の他、タンパク質に含まれる複数のアミノ酸のバンドが同時に観測されてしまう欠点があり、発色団のみのスペクトル測定は困難である。本研究手法は発色団からのみ生じる強い可視蛍光を赤外吸収スペクトル測定に利用するため、発色団以外の部位の赤外情報は全く含まれない。赤外共鳴分光とも言うべき優れた手法であり今後の発展を期待する。

なお、以上の成果の一部は、下記の雑誌論文、学会発表で報告を行った。

5. 主な発表論文等

（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 3 件）

(1) 酒井誠, 藤井正明 (査読無)

赤外超解像顕微鏡法

高分子, **64**, 588-589 (2015)

DOI:なし (URL:なし)

(2) Mitsuhiko Miyazaki, Shunpei Yoshikawa, François Michels, Kentaro Misawa, Shun-ichi Ishiuchi, Makoto Sakai, Otto Dopfer, Klaus Müller-Dethlefs, Masaaki Fujii (査読有)

Mass analyzed threshold ionization detected infrared spectroscopy: Isomerization activity of the phenol-Ar cluster near the ionization threshold,

Phys. Chem. Chem. Phys., **17**, 2494-2503 (2015)

DOI:10.1039/C4CP04584J

(3) 酒井誠 (査読無)

赤外顕微鏡によるがん細胞の生体反応計測技術

光学, **38**, 344-349 (2015)

DOI:なし (URL:なし)

〔学会発表〕（計 15 件）

(1) 酒井誠 (招待講演)

生体・環境分子を観察するための赤外超解像顕微鏡の開発

第54回フローインジェクション分析講演会

（岡山理科大学, 岡山）2017年11月

(2) 岩崎雄一郎, 秦真誉, 藤原光希, 森本遼, 高橋広奈, 酒井誠

Molecular distribution and orientation of keratins in human nails and human hairs observed by VSFG-detected IR super resolution microscopy

第55回日本生物物理学会年会（熊本大学, 熊本）2017年9月

(3) 山本幸汰, 木村裕也, 立壁皓亮, 三宅智也, 高橋広奈, 酒井誠

Orientation-sensitive molecular imaging of feather β -keratins by a VSFG-detected IR super-resolution microscopy

第 55 回日本生物物理学会年会（熊本大学、熊本）2017 年 9 月

(4) 高橋広奈、山本幸汰、木村裕也、渡瀬五常、藤井正明、酒井誠

VSGF 検出赤外超解像顕微鏡法による羽毛β-ケラチンの赤外分光イメージング

-偏光依存性測定による分子配向、キラリティーの観測-

第 11 回分子科学討論会（東北大学、仙台）2017 年 9 月

(5) 岩崎雄一朗、木村裕也、山本幸汰、森本遼、高橋広奈、酒井誠

赤外超解像顕微鏡を用いた生体試料中におけるケラチンタンパク質の分布・配向観察
平成 29 年度日本分光学会年次講演会（早稲田大学、東京）2017 年 5 月

(6) 酒井誠（招待講演）

超解像赤外分光イメージングによる生体試料観察

日本分光学会 中国四国支部 平成 28 年度年次講演会「画像観測による、分子～生体～凝集系研究の新展開」（広島大学、東広島）2017 年 1 月

(7) 酒井誠（招待講演）

赤外超解像顕微鏡の開発とその応用
高分子表面研究会「最先端の顕微鏡／イメージング技術で、表面・界面を見る」（東京理科大学、東京）2016 年 10 月
学、東広島）2017 年 1 月

(8) Yukihisa Watase, Masaaki Fujii, Makoto Sakai

Orientation-sensitive imaging of feather β-keratins by VSFG-detected IR super-resolution microscopy

WRHI International Workshop on Advanced Laser Spectroscopy for Soft Molecular Systems (Tokyo Institute of Technology, Yokohama)

2016 年 9 月

(9) 渡瀬五常、藤井正明、酒井誠

VSGF 検出赤外超解像顕微鏡法による羽毛β-ケラチンの分子配向イメージング

第 10 回分子科学討論会（神戸ファッションマート、神戸）2016 年 9 月

(10) 酒井誠（招待講演）

赤外超解像顕微鏡による生体試料観察
レーザー顕微鏡研究会第 42 回講演会（理化学研究所、和光）2016 年 7 月

(11) Makoto Sakai, Kohei Ushio, Yukihisa Watase, Masaaki Fujii（招待講演）

Vibrational sum-frequency generation detected IR super-resolution micro-spectroscopy of human hair α-keratins

The 3rd Tokyo Tech-Rutgers ICC Workshop in NAIST (奈良先端科学技術大学院大学、生駒) 2016 年 1 月

(12) Makoto Sakai（招待講演）

Observation of molecular orientation of human hair α-keratin fibers by a VSFG detected IR super-resolution microscopy,

2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Society (Pacifichem2015) (Honolulu Hawaii, USA) 2015 年 12 月

(13) 渡瀬五常、牛尾公平、藤井正明、酒井誠
赤外超解像顕微鏡法による羽毛β-ケラチンの分子配向イメージング

第 9 回分子科学討論会（東京工業大学、大岡山）2015 年 9 月

(14) 渡瀬五常、牛尾公平、藤井正明、酒井誠
Orientation-sensitive IR imaging of feather β-keratins by a VSFG-detected IR super-resolution micro-spectroscopy

第 53 回生物物理学会年会（金沢大学、金沢）2015 年 9 月

(15) 渡瀬五常、牛尾公平、藤井正明、酒井誠
VSFG 検出赤外超解像顕微鏡法を用いた羽毛β-ケラチンの赤外分光イメージング～Amide I バンドの偏光依存性測定～

平成 27 年度日本分光学会年次講演会（東京工業大学、大岡山）2015 年 6 月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

[http:// http://www.chem.ous.ac.jp](http://www.chem.ous.ac.jp)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 誠 (SAKAI, Makoto)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：60298172

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し