

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14592

研究課題名（和文）水溶液中における蛍光タンパク質発色団部位の選択的赤外分光計測

研究課題名（英文）Selective IR measurement of chromophore of fluorescent proteins in aqueous solution

研究代表者

高橋 広奈（Takahashi, Hirona）

岡山理科大学・理学部・講師

研究者番号：00803529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で、水溶液中における蛍光タンパク質発色団部位の選択的赤外分光計測を行い、発色団部位の局所的な構造解析に取り組んだ。具体的には、類似の発色団を持ちながら蛍光・発光特性の異なる蛍光タンパク質をターゲットに、申請者らの開発した、過渡蛍光検出赤外（TFD-IR）分光法と顕微鏡技術を組み合わせた共鳴IR法により、蛍光タンパク質発色団のみの赤外スペクトル測定を行い、振動数から発色団部位の分子構造を同定した。さらに、バンドごとの振動緩和速度を計測し、周囲のタンパク質との相互作用について議論を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではTFD-IR分光法と顕微鏡技術を利用した共鳴IR法により、蛍光タンパク質発色団部位の選択的な赤外分光計測法を確立し、発色団の分子構造、電子状態および周囲との相互作用が吸収・発光特性にどのように影響するのか議論を行った。希薄な水溶液中においても高いS/N比で蛍光タンパク質発色団部位の赤外分光計測に成功しているが、これは共鳴IR法でのみ実現できる新規かつ唯一のものであり、従来の振動分光法では達成しえなかった成果である。

研究成果の概要（英文）：Recently, we have developed the resonance IR spectroscopy for fluorescent molecules in water by combining IR super-resolution technique and transient fluorescence detection IR (TFD-IR) method. In this study, we applied this method to fluorescent protein and succeeded in the selective IR measurement of chromophores. The S/N ratio of IR spectra was quite high although the concentration of fluorescent proteins was small. Because no peak appeared in the amide I region, it is concluded that the selective IR measurement of fluorescent protein chromophore was succeeded in. It was also found the different spectral features of fluorescent proteins, which had similar chromophore. This might come from the difference of the molecular structure of chromophores. In addition, we measured the time profile of the intensity of resonance IR signals and observe the vibrational relaxation process.

研究分野：物理化学

キーワード：共鳴IR法 蛍光タンパク質 発色団 赤外分光計測 振動緩和過程

1. 研究開始当初の背景

蛍光タンパク質に任意の吸収・発光特性を付与するテクノロジーは、これらを利用した計測を行う上で不可欠である。発色団や周囲のタンパク質の構造が、その吸収・発光特性に与える影響に関する知見をもとにした新規蛍光タンパク質の設計・開発も近年、行われてきている【S. Zhong et al., J. Neurosci. Methods, 313 (2019) 68】。しかし、「発色団の分子構造、電子状態および周囲のタンパク質との相互作用が吸収・発光特性にどのように影響を与えるか？」の命題を分光学的に明らかにした研究は数が限られていた。これは、分子構造に敏感な赤外分光法に2つの困難があったためである。1つ目は、蛍光タンパク質においては、周囲の大部分を占めるタンパク質部分の赤外吸収に妨害されて発色団の選択的な計測が難しいこと、2つ目は、水の強い赤外吸収に阻害されて、水溶液中における希薄な溶質分子の赤外スペクトル測定は不可能であることである。

そこで申請者は TFD-IR 分光法を顕微鏡技術と組み合わせた『共鳴 IR 法』により、水溶液中における蛍光タンパク質発色団部位の選択的な赤外分光計測が可能と着想した。その鍵となる TFD-IR 分光法は、振動励起準位を経由する多光子過程を利用して赤外情報を蛍光に変換する手法であり、蛍光分子に対して赤外光を照射して特定の振動に励起し、振動励起した分子を可視光で選択的に電子励起することで S_1 状態から発生する過渡蛍光を検出する。これを蛍光タンパク質に適用した場合、タンパク質部位は可視光ではエネルギー的に S_1 状態に励起できないため蛍光が発生しないが、発色団部位からは過渡蛍光が発生するため、発色団部位のみの信号抽出が可能と考えた(図1)。この分光法では、赤外光の波長が分子振動と一致しない場合には蛍光が発生しないため、蛍光強度をモニターしながら赤外波長掃引することで、発色団部位のみの選択的な赤外スペクトル測定を実現できる。加えて、TFD-IR 分光法では可視光と赤外光の重なり部分からのみ信号が発生するため、水による赤外吸収の影響を除去できる。

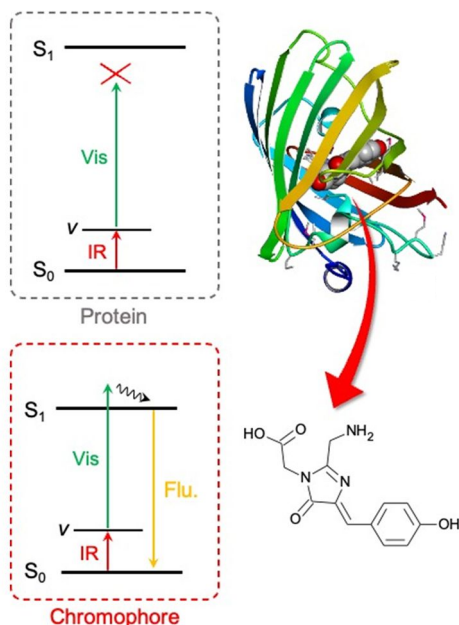


図1. 共鳴 IR 法による蛍光タンパク質発色団部位の選択的な赤外分光計測。

2. 研究の目的

本研究では TFD-IR 分光法と顕微鏡技術を利用した共鳴 IR 法により、蛍光タンパク質発色団部位の選択的な赤外分光計測法を確立し、発色団の分子構造、電子状態および周囲との相互作用が吸収・発光特性にどのように影響するのかを明らかにすることを目的とした。

蛍光タンパク質 turboGFP およびそれと同一の発色団を持ちながら吸収・発光特性の異なる4つの蛍光タンパク質をターゲットとした。これらの蛍光タンパク質の発色団は、3つのアミノ酸より構成されており、周囲の環境によって、発色団の酸塩基状態や周囲との相互作用に違いがあるといわれているが、吸収・発光特性との直接的な対応関係は得られていない。本研究では、共鳴 IR 法により、(1) 振動数から発色団部位の分子構造を同定する、(2) 信号増強されるバンドから電子励起状態における構造変化を明らかにする、(3) バンドごとの振動緩和速度から周囲のタンパク質との相互作用を解明する、を遂行した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3つの手順で蛍光タンパク質発色団の選択的な赤外分光計測に取り組む。

(1) 振動数から発色団部位の分子構造を同定する

TFD-IR 法を利用する本手法を蛍光タンパク質に適用すると、タンパク質部位はエネルギー的に S_1 状態に励起できないため蛍光が発生しないが、発色団部位からは過渡蛍光が発生する。過渡蛍光強度をモニターしながら赤外光を波長掃引することで、発色団部位のみの赤外スペクトルが得られる。この手法では非常に高い S/N 比で発色団のみの赤外スペクトルを選択的に得られるため、ピーク振動数をもとに化学結合レベルでの分子構造解析を行う。

(2) 信号増強されるバンドから電子励起状態における構造変化を明らかにする

蛍光タンパク質発色団部位の共鳴 IR スペクトルでは、いくつかのバンドがラマンスペクトルに比べて増強されている。蛍光性生体分子であるフラビンモノヌクレオチド(FMN)について共鳴 IR スペクトルを測定したところ、その強度パターンは共鳴ラマンスペクトルにのみ類似して

いた【H. Takahashi et al. Chem. Phys. Lett., 758 (2020) 137942】。この強度パターンには Franck-Condon 因子が寄与しており、励起状態における構造変化の有無が関係する。これを利用すれば、蛍光タンパク質においても共鳴 IR スペクトルの信号強度より発色団の電子励起状態における構造変化を明らかにできる。

(3) バンドごとの振動緩和速度から周囲のタンパク質との相互作用を解明する

本手法で利用する TFD-IR 分光法は従来、振動緩和現象の観測に利用されてきた。振動緩和速度は、振動エネルギーの散逸の速さを示しており、周囲との相互作用が強い場合は速く、弱い場合は遅いことから、これを観測することで、周囲との相互作用の大きさを明らかにできる。蛍光タンパク質においてバンドごとに振動緩和現象を観測することで、発色団の各部位におけるタンパク質との相互作用を解明する。

申請者らの開発した共鳴 IR 法は非常に高い S/N 比で発色団部位のみの赤外分光計測が可能であるため、上記が達成できる。これにより発色団の分子構造、電子状態および周囲との相互作用を解明し、吸収・発光特性との相関を明らかにする。

4. 研究成果

測定には波長可変ピコ秒レーザーシステム(パルス幅: 2 ps)により得られた赤外光(5500 ~ 9000 nm)および可視光を用いた。可視光波長は試料の蛍光に合わせて 450 ~ 650 nm から選択した。赤外光と可視光を同軸・同方向から入射し、反射対物レンズで CaF₂ セルの表面に集光させた。発生した過渡蛍光は入射に用いたのと同じ反射対物レンズで集光し、CCD カメラで過渡蛍光を画像として検出した。赤外スペクトルは検出した蛍光強度を赤外波長に対してプロットすることで構築した。試料には 5 種の蛍光タンパク質を用いた。本測定では、赤外超解像技術を利用し、セル表面近傍の信号のみを検出しているため、セルの光路長は考慮する必要がない。そこでスライドガラスに CaF₂ 板をアラルダイトで隙間を空けて張り付けたセルを自作した。このセルの容積は数十マイクロリットルであり、蛍光タンパク質のような高価かつ希少なサンプルでの測定に適している。

図 2 に 5 種類の蛍光タンパク質の共鳴 IR スペクトルを示す。測定は、 10^{-5} mol dm⁻³ の希薄な溶液で、サンプル量は 50 μ L 程度と微量な条件で行ったが、極めて S/N 比の良いスペクトルが得られた。このような希薄かつ微量な試料でも測定できるのは、TFD-IR 法が赤外吸収のない場合は信号が観察されない、バックグラウンドフリーな測定法であり、高感度なためである。全ての共鳴 IR スペクトルにおいて、タンパク質のアミド I 領域にあたる 1650 cm⁻¹ 付近でピークが観察されていない。このことから、発色団のみが選択的に観測されていることが分かる。スペクトルを比較すると、1300 ~ 1400 cm⁻¹ に観察される強度の大きなバンドのシフトや 1600 cm⁻¹ 付近のバンドから、大まかに 3 つのパターンに分類される。これは、発色団の構造を反映していると考えられる。

また、各スペクトルのピークに対して、振動緩和測定を行ったところ、著しい振動モード依存性が観測されたので、これらをもとに発色団と周囲のタンパク質との相互作用について議論した。

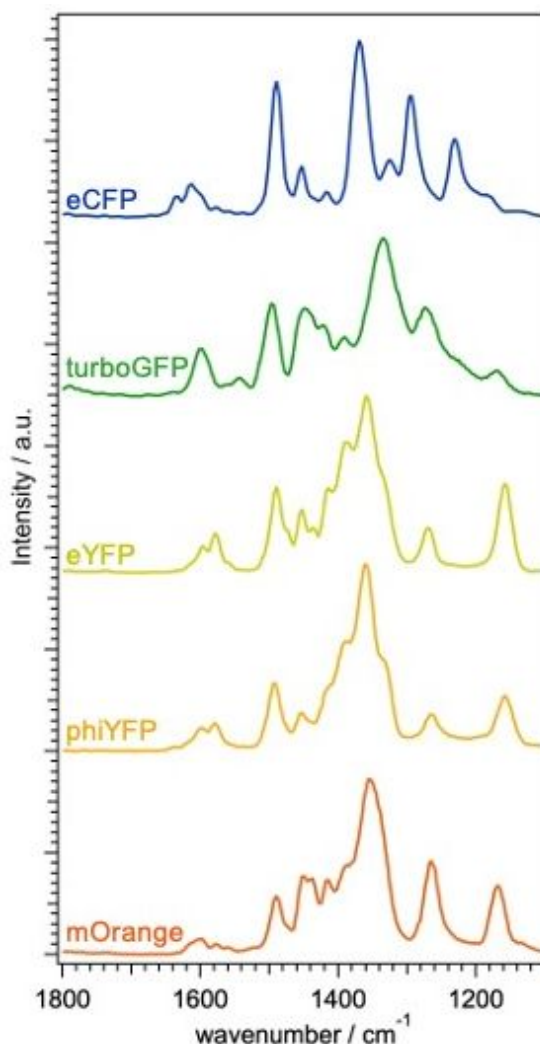


図 2. 蛍光タンパク質の共鳴 IR スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Hirona, Katayama Kohei, Sakai Makoto	4. 巻 292
2. 論文標題 Selective IR super-resolution imaging of α -keratins at the bulk or interface in feather detected by using a nonlinear optical process	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysical Chemistry	6. 最初と最後の頁 106935 ~ 106935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpc.2022.106935	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirano Hiroki, Takahashi Hirona, Kawai Akio	4. 巻 126
2. 論文標題 Pulsed EPR Study of the Initial Steps of Radical-Scavenging Reactions of C_{70} with Diphenylphosphine Oxide, Hydroxycyclohexyl, and 2-Hydroxypropyl Radicals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6074 ~ 6082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.2c03398	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurihara Marie, Thiel Vera, Takahashi Hirona, Kojima Keiichi, Ward David M., Bryant Donald A., Sakai Makoto, Yoshizawa Susumu, Sudo Yuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Identification of a Functionally Efficient and Thermally Stable Outward Sodium-Pumping Rhodopsin ($BeNaR$) from a Thermophilic Bacterium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 154 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00774	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋広奈、片山康平、伊田哲也、酒井誠
2. 発表標題 赤外超解像顕微鏡による爪ケラチンタンパク質の分布・配向観察
3. 学会等名 第16回分子科学討論会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋広奈、酒井誠
2. 発表標題 非線形光学過程を利用した2種類の赤外超解像顕微鏡による生体試料の観察
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋広奈、伊田哲也、片山康平、酒井誠
2. 発表標題 赤外超解像顕微鏡による爪ケラチンタンパク質の分布・配向観察
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋広奈
2. 発表標題 赤外光を含む二波長レーザー分光法を使った超解像技術とその応用
3. 学会等名 神戸大セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋広奈
2. 発表標題 動的スピン分極を利用した光物理や光化学過程の解明
3. 学会等名 第61回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2022) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古和田丈人, 野津山駿, 高橋広奈, 酒井誠
2. 発表標題 2種類の赤外超解像顕微鏡を用いた動物毛の内部構造観察
3. 学会等名 2022年度分光学会生細胞分光部会研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡野夏暉, 石川大翔, 高橋広奈, 酒井誠
2. 発表標題 赤外超解像顕微鏡による毛髪の内構造観察 熱処理・化学処理の影響について
3. 学会等名 2022年度分光学会生細胞分光部会研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirona Takahashi, Makoto Sakai
2. 発表標題 IR measurement of fluorescent biological molecules in aqueous solution by resonance IR spectroscopy
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------