

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650045

研究課題名(和文)ハイブリッド光検出器を使った高速度一分子蛍光観察法の開発

研究課題名(英文)Development of ultrafast detection system for the single molecule fluorescence based on hybrid photo detector

研究代表者

高橋 聡 (Takahashi, Satoshi)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30283641

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)：一分子蛍光分光法は、タンパク質の運動を観察し機能を理解するための強力な手法である。しかし、従来の手法では、ミリ秒よりも短い時間領域で起きる現象の検出は不可能だった。本研究では、我々がこれまでに開発してきたラインフォーカス型共焦点顕微鏡にハイブリッド光検出器を組み合わせることで、一分子が発する蛍光信号を10マイクロ秒の時間分解能で10ミリ秒の長さにとわたって一分子検出することを可能にした。さらに、開発した装置を使ってBdpAと呼ばれるタンパク質についての高速度測定を行い、変性状態のBdpAがさまざまな運動を示していることを明らかにした。開発した手法は、さまざまなタンパク質の研究に応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Single molecule fluorescence spectroscopy (SMFS) is a powerful method for the characterization of protein dynamics; however, the past methods of SMFS has the limit in the time resolution of the fluorescence detection and can not resolve events occurring within 1 ms. In this investigation, we used line confocal microscopy and combined it with the new photodetector, hybrid photodetector (HPD), and enabled to detect fluorescence signals from single molecules at the time resolution of 10 microsecond and for the duration of 10 millisecond. We further characterized the dynamics of a protein, BdpA, and observed that the unfolded BdpA shows various dynamics that should be important for the understanding of protein folding. The developed method can be applied to various proteins and their dynamics at the single molecule level.

研究分野：生物物理

キーワード：一分子蛍光分光法 タンパク質 フォールディング ライン共焦点顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、化学反応の触媒や信号伝達など、多彩な機能を発揮する生体高分子である。タンパク質の機能を理解するために、一分子蛍光観察法が強力な手段として使われる。例えば、全反射蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡などの光学系を使うことで、タンパク質に修飾した色素の蛍光を一分子レベルで観察する実験が可能となり、多くの知見が得られている。

一方で、従来の一分子蛍光観察法には大きな限界があった。すなわち、観測の時間分解能がミリ秒程度に限られ、マイクロ秒の領域で起きる運動を追跡できないという欠点があった。ミリ秒以内の短時間内に起きる過程を、一分子レベルで連続観察する手法の開発が強く求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究は、申請者が見いだした新しい測定原理であるラインフォーカス型共焦点顕微鏡に新しい光検出器であるハイブリッド光検出器 (HPD) を組み合わせることで、一分子蛍光連続観察の時間分解能を 10 マイクロ秒以内に向上させることを目的とした。また、開発した装置を用いることで、分子動力学計算で示される分子の運動を実験的に確認するという研究戦略の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) HPD を応用した光検出系の開発

始めに、HPD を採用することに合わせ、ラインフォーカス型共焦点顕微鏡の蛍光検出の光学系を最適化した。HPD の特徴は、高い時間分解能で時系列データを検出できることである。この特性を引き出すために、高いデータ計数効率を持つカウンターを接続する方法、単一光子相関分光法のために開発されたコリレーターを接続する方法などを検討した。その結果、後者のコリレーターを採用することが望ましいと判断し、コリレーターボードを導入した。二台の HPD からの信号を、同時に一台のコリレーターに入力し、信号を計数する回路を構成した。

#### (2) 背景光の低減を目指したライン型共焦点顕微鏡の光学系構築

本手法では、マイクロ流路を流れる分子を線状に励起し、スリット型の空間フィルターで背景光を低減させる光学系を使用する。従来のポイントフォーカス型の共焦点顕微鏡に比べ、本手法は背景光の影響を受けやすいという弱点を持っている。また、二次元型の光検出器を使うことに比べ、HPD を使用することは、スリットを通過した全ての背景光が HPD により計数されるという弱点を持っている。このように、背景光対策を行うことがこの手法の大きな課題である。

研究の過程で、背景光対策がさらに重要であることが判明した。これは、HPD からの信

号を検出するコリレーターについて、計測する光子数の飽和現象が比較的少ない光子数 (カタログでは十分に対応できるとされる光子数) においても生じたことである。このために、検出する蛍光が強い場合に二つのチャンネルからのデータ検出が正確に行われず、蛍光の強度比が正確に計算できない問題があることが判明した。このとき、信号以上に問題となるのは、高いバックグラウンドの計数効率である。すなわち、バックグラウンドを低減できれば、飽和現象が回避できることがわかった。

以上の状況に対応するため、ラインフォーカス型共焦点顕微鏡において、蛍光バックグラウンドを低減させるための試行錯誤を行った。第一に取り組んだのは、短パルス高繰り返し励起レーザーを導入することで時分割計測を行い、背景光を時間的に低減する方法である。この方法を用いる場合、対象とする試料分子からの蛍光の減衰データも測定が可能になる。しかし、ラインフォーカス型の光学系を用いる場合、購入できるパルスレーザーでは十分な光子密度が得られず、この手法では信号を得ることが不可能だった。このため、パルスレーザー励起を応用することは断念した。

次に試みたのは、背景光の大きな原因となる顕微レンズの持つ自家蛍光の低減である。顕微レンズはそれ自身が比較的強い蛍光を発している。ポイントフォーカス型の光学系の場合、この背景光も効率よく取り除くことが可能である。しかし、ラインフォーカス光学系にすることで、背景光の除去効率が悪くなるため、顕微レンズによる背景光が大きな問題になることが判明した。顕微レンズが持つ自家蛍光の対する対策として、石英素材で構築された対物レンズを購入した。石英は蛍光をほとんど発しないため、このレンズを用いることで背景光を劇的に低減できることを見いだした。

しかし、次の問題として、石英レンズの場合、背景光は少なくなるものの、波長の違いによる色収差が比較的大きく、二色の蛍光の同時計測が難しいことが明らかになった。すなわち、550nm (緑色) 付近の蛍光と 600nm (赤色) 付近の蛍光の焦点位置が異なるため、二色の蛍光の強度比を見積もることが大変難しくなった。このための対策として、二つの波長において別々に集光光学系を構築することを試みたが、光学系のアラインメントが難しくなり過ぎ、実用的な光学系としては使用できないと判断した。

以上の試行錯誤の末、最終的に以下の光学系で一分子蛍光の計測が可能であることを見いだした。顕微レンズとして、やや高め NA 値を持つものを採用し、これにより背景光をできるだけ低く抑えることにした。また、フローセルの流路の深さを 5 マイクロメートル以内に抑えることでも、背景光の低減を図った。さらに、励起レーザーの強度を中程度

に抑えることでも、背景光の低減を狙った。このように、光学系と試料送液系全体のデザインを最適化することで、背景光をできるだけ減らすという手段で、最終的な一分子観察を成功させた。

### (3) ラインフォーカス型一分子計測装置に最適化したフローセルの構築

共焦点光学系を用いた一分子観測を行う場合、フローセルのイメージング可能な領域の外を流れる試料は、しばしば背景光となって測定に悪影響を及ぼす。そのため、サイズの小さな流路を一分子観察に応用することが望ましい。これまでは、流路深さが 10 マイクロメートルのフローセルを使用していたが、本研究では 5 マイクロメートルの深さのフローセルを導入することで、背景光の低減が可能になった。さらに、フローセル内を流れる試料の流速を下げるための工夫を行った。また、フローセル内を親水性ポリマーでコートすることで、試料の吸着を減らしその結果として背景光を低減することにも成功した。

## 4. 研究成果

開発した一分子計測装置を使って、プロテイン A の B ドメイン (BdpA) についての高速度一分子計測を行った。これまで、BdpA の一致分子計測では、100 マイクロ秒の時間分解能で数ミリ秒程度の間しか可能でなかった。しかし、新しく構築した装置を用いることで、10 マイクロ秒の時間分解能で 10 ミリ秒までの長時間について一分子 FRET 計測が可能になった。得られたデータは、BdpA が大変大規模な揺らぎ運動を行うことを示しており、今後、この運動の帰属を行うなど、タンパク質科学として重要な課題が残されていることを明らかにできた。

測定の例を増やすために、色素を二重ラベル化した DNA ヘアピンの計測も行っている。DNA ヘアピンは、大変早い構造変化を示すことが知られている試料である。この試料についても、本装置を使うことで初めて多数の運動をリアルタイムで計測することに成功した。これらの結果をまとめる形で、現在、論文の執筆を進めており、数ヶ月以内に投稿することを目指している。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

Matsui, T., Nambu, S., Goulding, C. W., Takahashi, S., Fujii, H., Ikeda-Saito, M. “Unique coupling of mono- and dioxygenase chemistries in a single active site promotes heme degradation” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, 113 巻, 2016, 3779-3784.

DOI: 10.1073/pnas.1523333113.

Takahashi, S., Kamagata, K., Oikawa, H. “Where the complex things are: single molecule and ensemble spectroscopic investigations of protein folding dynamics”, Curr. Opin. Struct. Biol., 査読有, 2016, 36 巻, 2016, 1-9. DOI: 10.1016/j.sbi.2015.11.006.

Konuma, T., Sakurai, K., Yagi, M., Goto, Y., Fujisawa, T., Takahashi, S. “Highly Collapsed Conformation of the Initial Folding Intermediates of  $\beta$ -Lactoglobulin with Non-Native  $\alpha$ -Helix” J. Mol. Biol., 査読有, 427 巻, 2015, 3158-3165. DOI: doi: 10.1016/j.jmb.2015.07.018.

Murata, A., Ito, Y., Kashima, R., Kanbayashi, S., Nanatani, K., Igarashi, C., Okumura, M., Inaba, K., Tokino, T., Takahashi, S., Kamagata, K. “One-dimensional sliding of p53 along DNA is accelerated in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  at millimolar concentrations”, J. Mol. Biol., 査読有 427 巻, 2015, 2663-2678. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.06.016.

Oikawa, H., Kamagata, K., Arai, M., Takahashi, S. “Complexity of the Folding Transition of the B domain of Protein A Revealed by the High-Speed Tracking of Single-Molecule Fluorescence Time Series” J. Phys. Chem. B, 査読有, 119 巻, 2015, 6081-6091. DOI: 10.1021/acs.jpccb.5b00414.

小井川浩之、齊藤雅嵩、高橋聡、マイクロ秒分解一分子蛍光測定で観るタンパク質の構造変化、生物物理、査読有、54 巻, 2014, 276-279. DOI: 10.2142/biophys.54.276.

### 〔学会発表〕(計 19 件)

Takahashi, S., Oikawa, H. “Rapid sample flow strategy for the ultrafast tracking of single molecule fluorescence time series” Dec. 15-20, 2015, PACIFICHEM, Honolulu (USA).

Takahashi, S., Oikawa, H. “Complex folding transition of the B domain of protein A investigated by the high-speed measurement of single-molecule FRET time series” Dec. 15-20, 2015, PACIFICHEM, Honolulu (USA).

Takahashi, S., Saito, M., Kamagata, K.,

Oikawa, H. “Dynamics of protein folding studied by single molecule fluorescence time series measurements at microsecond resolution” Nov. 22-25, 2015, 39th Annual ASB Conference, Armidale (Australia).

小井川浩之、新井宗仁、深澤宏仁、横田浩章、井出徹、高橋聡、「マイクロ秒分解一分子 FRET 測定によるタンパク質折り畳みダイナミクスの追跡」2015 年 9 月 16 日-19 日、第 9 回分子科学討論会、東京工業大学 (東京都)

Oikawa, H., Arai, M., Fukasawa, A., Yokota, H., Ide T., Takahashi, S. “Tracking microsecond single-molecule FRET dynamics on the fast protein folding by the line-confocal microscopy” 2015 年 9 月 13 日-15 日、第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学 (金沢市)

高橋聡、「一分子蛍光分光法によるタンパク質のフォールディング研究」2015 年 4 月 2 日-3 日、機能物性融合科学研究会、東京大学 (柏市)

高橋聡、「マイクロ秒分解一分子蛍光観察によるタンパク質のフォールディング過程」2015 年 3 月 26 日-29 日、日本化学会第 95 春季年会、日本大学 (船橋市)

Oikawa, H., Kamagata, K., Arai, M., Fukasawa, A., Yokota, H., Ide, T., Takahashi, S. “Development of The Line Confocal System for The Single Molecule Tracking of Fast Folding Dynamics of Proteins” Feb. 7-11, 2015, Biophysical Society Annual Meeting, Baltimore (USA).

Takahashi, S. “Dynamics of Protein Folding Studied by Single Molecule Fluorescence Time Series Measurements at Microsecond Resolution” Nov. 25-28, 2014, Indo-Japan Joint Workshop on “Frontiers in Molecular Spectroscopy: Fundamentals and Applications to Material and Biology” 東大寺総合文化センター (奈良市)。

Oikawa, H., Kamagata, K., Arai, M., Fukasawa, A., Yokota, H., Ide, T., Takahashi, S. “Development of the line confocal system for the single molecule tracking of fast folding dynamics of proteins”, 2014 年 9 月 25 日-27 日、第 52 回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター (札幌市)

ンションセンター (札幌市)

Saito, M., Chen, E., Chen, P.-T., Chen, R. P.-Y., Kamagata, K., Oikawa, H., Takahashi, S. “Folding dynamics of ubiquitin after rapid mixing detected by single molecule fluorescence spectroscopy”, 2014 年 9 月 25 日-27 日、第 52 回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター (札幌市)

Yoshida, A., Motojima, F., Oikawa, H., Kamagata, K., Yoshida, M., Takahashi, S. “Conformation of the denatured BFP bound to GroEL by single molecule FRET measurements”, 2014 年 9 月 25 日-27 日、第 52 回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター (札幌市)

高橋聡、「タンパク質フォールディングの分子科学」2014 年 8 月 29 日、第 1 回森野ディスカッション、東京大学 (東京都)

Takahashi, S. “Continuous tracking of protein folding at microsecond resolution by a line confocal detection of single molecule fluorescence”, July, 27-30, 2014, The 28th Annual Symposium of The Protein Society, San Diego (USA).

吉田文、元島史尋、田口英樹、小井川浩之、鎌形清人、吉田賢右、高橋聡、「GroEL に結合した基質 BFP の一分子 FRET 計測による構造解析」2014 年 6 月 25 日-27 日、日本蛋白質科学会年会、ワークピア横浜 (横浜市)

齊藤雅嵩、Chen Hsin-Liang、Chen Po-Ting、Chen Rita P.-Y.、鎌形清人、小井川浩之、高橋聡、「一分子蛍光分光法によるユビキチンの折り畳みダイナミクス」2014 年 6 月 25 日-27 日、日本蛋白質科学会年会、ワークピア横浜 (横浜市)

小井川浩之、鎌形清人、新井宗仁、深澤宏仁、横田浩章、井出徹、高橋聡、「改良したマイクロ秒分解一分子蛍光測定法による蛋白質の高速折り畳みダイナミクスの追跡」2014 年 6 月 25 日-27 日、日本蛋白質科学会年会、ワークピア横浜 (横浜市)

Oikawa, H., Saito, M., Chen, P.-T., Chen, H.-L., Chen, R. P.-Y., Arai, M., Kamagata, K., Takahashi, S. “Microsecond-dynamics of the unfolded BdpA and ubiquitin by a line confocal detection of single molecule

fluorescence”, May, 17-20, 2014, The  
4th Asia Pacific Protein Association  
Conference, Jeju (Korea).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/takahashi-s/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 聡 (TAKAHASHI SATOSHI)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30283641

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

鎌形 清人 (KAMAGATA KIYOTO)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：90432492