

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

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

研究成果の概要（和文）：物質としての酵素タンパク質の研究は、単離精製された均質な試験管の溶液で行われる。しかし細胞内の酵素タンパク質は一分子ごとに異なった場所・環境下においてそれぞれの分子が異なった状態にある。このため、酵素機能をタンパク質の分子論に基づいて理解するためにはタンパク質一分子の観測が不可欠である。今回我々は、可視蛍光性タンパク質一分子の分光測定を実現した。

研究成果の概要（英文）：Physical and chemical properties of enzyme can be studied using a homogeneous solution of a purified sample of enzyme. However, in living cells, individual protein molecules of enzyme are in different locations to experience different environments, so that they function differently. For understanding enzymatic reactions on the basis of molecular science, observation of individual molecules is essential. In this study we realized spectroscopy of visible-fluorescent single protein molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	8,400,000	0	8,400,000
平成20年度	7,700,000	0	7,700,000
平成21年度	7,000,000	0	7,000,000
平成22年度	6,300,000	0	6,300,000
平成23年度	5,600,000	0	5,600,000
総計	35,000,000	0	35,000,000

研究分野：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：単一分子分光、タンパク質、分光、低温、構造機能相関

1. 研究開始当初の背景

一般にタンパク質は多数の準安定構造を取ることができ、室温では絶えず構造を変えながらその機能を発揮している。通常のアンサンブルの分光測定では準安定構造に対応する成分の数が多すぎて、個々の構造や変化の実態を明かすことは難しい。これを克服する方法が、低温で一つの準安定構造に事実上固定された単一タンパク質を分光することである。単一タンパク質分光は、当時光合成

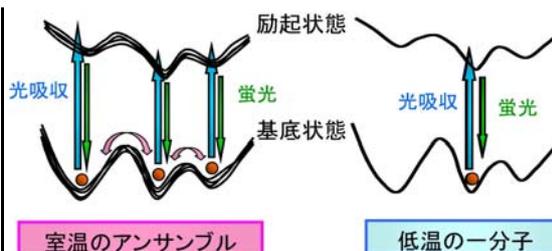


図 1. タンパク質の分光測定

細菌の光捕集機能を担う色素・タンパク複合体に対して行われており、大きな成果を挙げているのでこれに着目した。

2. 研究の目的

近赤外領域でのみ可能であった単一タンパク質分光を可視光領域でも可能にする技術開発を行い、生体内の化学反応を制御するタンパク質である酵素についての分子論的理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

分子としてのタンパク質は、室温ではその構造を変化させるのに十分な熱エネルギーを持つため、絶えず多くの準安定構造の間を往き来しているため、せつかく一分子のスペクトル測定を行っても、得られた結果は測定の間タンパク質が経験した多数の構造の重ね合せとなってしまう。このため、一分子のスペクトル測定は液体ヘリウムを用いて温度数 K で行うのが一般的である。したがってタンパク質一分子からの微弱な蛍光をできるだけ逃さず捉えるためには、液体ヘリウム中の試料の直近に対物レンズを置かなければならない。ところが、液体ヘリウムの低温に耐える満足な性能の対物レンズは存在しない。そこでまず対物レンズを設計・開発することから研究を開始した。

単一タンパク質の分光測定に十分な光学的性能を持つ対物レンズとして、2枚の球面鏡で構成される Schwarzschild 型の配置を採用した。反射光学系を用いることで色収差は原理的になくなり、可視領域でも使うことができるようになる。また、二枚の球面鏡の巧妙な幾何配置により、球面収差も最低次が打ち消しあうように設計されている。二枚の鏡の相対配置が、室温と低温の温度サイクルに耐えるようにするため、一個の石英に両方の鏡面を作り込み、一体成形のレンズとした。

4. 研究成果

(1) 低温用一体成形反射対物レンズの開発：上記の方針に基き設計したレンズの製作は技術的に困難なものだったが、日本のレンズ技術の高さにより何とか実現できた。最初のレンズは焦点距離 4 mm 、開口数 0.6 であり、波長がおよそ 400 nm より長波長側で回折限界の結像能を発揮した(論文リスト(9))。

しかし、 400 nm より短波長では球面収差が無視できず、これを解決するために新たに焦点距離 2 mm 、開口数 0.6 のレンズを作った(論文リスト(6))。図 2 に、新しい対物レンズを用い、波長 $360\sim 980\text{ nm}$ の光を当てて撮ったポリスチレンビーズの散乱像を示す。

波長 360 nm でも像の劣化は認められず、波長に比例して回折限界像の大きさが小さくなっているだけであることが分かる。こうして最終的には短波長側が 360 nm の紫外域まで球面収差がなく、液体ヘリウム中で使用可能な色収差のない対物レンズを作ることができた。

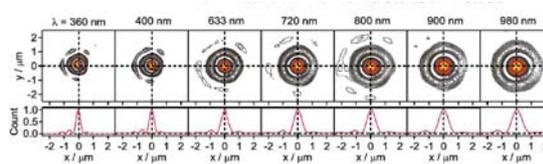


図 2. 低温用対物レンズによるビーズの散乱像

(2) 単一タンパク質のスペクトル変化の温度依存性の測定によるプロトンのトンネル過程の発見：温度数 K においてもタンパク質の構造は完全に固定されているわけではない。単一タンパク質のスペクトルは、スペクトルジャンプやスペクトル拡散と呼ばれる時間変化を示す。タンパク質中の補因子色素一個の吸収波長が変化する頻度の温度依存性を調べたところ、頻度が温度に依存せず一定であるような、量子力学的なトンネル過程が見つかった(論文リスト(8))。

温度数 K の有機固体でのトンネル過程として知られているものは、プロトンが関与するものばかりであり、タンパク質中で今回見つかったトンネル過程は水素結合のプロトンの動きであると考えられる。

(3) ミドリムシの青色センサー酵素 PAC の単一分子分光：可視蛍光性の酵素として、ミドリムシが青色光を避ける際の青色光センサーと信号物質産生反応の酵素として働いている、photo-activated adenylyl cyclase (PAC) について単一分子分光を行った(論文リスト(4))。

PAC は青色光のセンサータンパク質であるが、センサー機能は青色光を吸収する補因子である FAD が担っている。この FAD の光吸収が引き金となって PAC のもう一つの機能、すなわち細胞内信号伝達物質である cAMP を産生する酵素としての機能が活性化される。

視覚において光受容体として働いているタンパク質はロドプシンであり、実際に光を吸収しているのは補因子レチナールである。レチナールは光吸収によってシス・トランス異性化を起こし、分子構造が大きく変化する。この大きな構造変化が光を感知した信号としてロドプシンの状態を変化させるのだが、

PACの補因子FADは光を吸収してもレチナールのような大きな構造変化を起こさない。新しいタイプの光受容体であるFADは、光を感知した信号として、果たして何を使っているのか？PACに関しては大量発現系が見つかっていないので天然のものをミドドリンシから抽出精製するしかなく、本格的な分光研究は手付かずであった。今回、PACの一部を再構成したモデルタンパク質ではなく、PAC全体の単一分子分光に成功し、50 nmもの大きな蛍光スペクトルのジャンプが観測された。これだけの大きさのスペクトル変化は水素結合のプロトンの動きだけでは説明がつかず、電子状態の変化を示唆している。

(4) 単一タンパク質に対する可視光と赤外光の同時照射：一体成形反射対物レンズは、原理上すべての波長域で色収差を生じない。光がレンズを透過する限り、どんな波長の光も同一分子に集光できる。色素一分子の蛍光からその周囲の局所的な構造変化が分かるので、色素をラベルしたタンパク質に可視光と赤外光を同時照射すれば、タンパク質一分子の赤外振動吸収による構造変化を色素の可視蛍光を通して検出できるだろう。我々は、ウシの血清アルブミンに色素 Alexa Fluor 660 をラベルし、振動数 1500 cm^{-1} 付近のアミド I 領域の中赤外光を照射した。同時に可視光を当てて色素からの蛍光を観測したところ、蛍光強度は中赤外光の強度と波長に対して相関があり、主鎖の全ての C=O 伸縮振動の赤外吸収を表していることが分かった(論文リスト(5))。

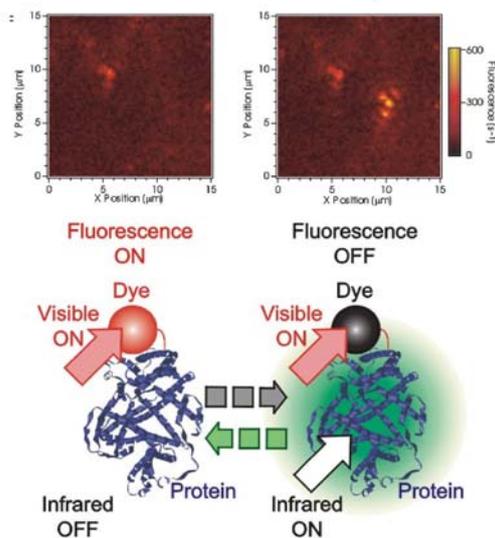


図 3. 単一タンパク質への赤外光照射によるラベル色素の蛍光の回復

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 11 件)

○査読付英文国際論文誌 (9 報)

- (1) M. Fujiwara, S. Fujiyoshi, M. Matsushita, “Single-component reflecting objective for low-temperature imaging and spectroscopy of single nano objects”, *Physics Procedia* **13** (2011) 38.
- (2) D. Uchiyama, H. Hoshino, K. Otomo, T. Kato, K. Onda, A. Watanabe, H. Oikawa, S. Fujiyoshi, M. Matsushita, M. Nango, N. Watanabe, A. Sumino, T. Dewa, “Single-protein study of photoresistance of pigment-protein complex in lipid bilayer”, *Chem. Phys. Lett.* **511** (2011) 135.
- (3) D. Uchiyama, H. Oikawa, K. Otomo, M. Nango, T. Dewa, S. Fujiyoshi, M. Matsushita, “Reconstitution of bacterial photosynthetic unit in a lipid bilayer studied by single-molecule spectroscopy at 5 K”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13** (2011) 11615.
- (4) S. Fujiyoshi, M. Hirano, M. Matsushita, M. Iseki, M. Watanabe, “Structural Change of a Cofactor Binding Site of Flavoprotein Detected by Single-Protein Fluorescence Spectroscopy at 1.5 K”, *Phys. Rev. Lett.* **106** (2011) 078101.
- (5) S. Fujiyoshi, Y. Furuya, M. Iseki, M. Watanabe, M. Matsushita, “Vibrational Microspectroscopy of Single Proteins”, *J. Phys. Chem. Lett.* **1** (2010) 2541 – 45.
- (6) M. Fujiwara, S. Fujiyoshi, and M. Matsushita, “Single-component reflecting objective for ultraviolet imaging and spectroscopy at cryogenic temperature”, *J. Opt. Soc. Am. B* **26** (2009) 1395 – 99.
- (7) S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, and M. Matsushita, “Visible fluorescence spectroscopy of single proteins at liquid-helium temperature”, *Phys. Rev. Lett.* **100** (2008) 168101.
- (8) H. Oikawa, S. Fujiyoshi, T. Dewa, M. Nango, and M. 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.* **130** (2008) 4580 – 81.
- (9) S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, C. Kim, M. Matsushita, A. M. van Oijen, and J. Schmidt, “Single-component reflecting objective for low-temperature spectroscopy in the entire visible region”, *App. Phys. Lett.* **91** (2007) 051125.

○国内学会誌（査読なし2報）

- (10) 小井川浩之、藤芳暁、出羽毅久、南後守、松下道雄、「タンパク質の構造変化と単一分子分光」、高分子 **60** (2) (2011) 80 - 81.
(11) 松下道雄、「光合成アンテナ複合体の単一分子分光」、生物物理 **48** (1) (2008) 35 - 40.

〔学会発表〕（計 21 件）

- (1) 藤原正規、平野充遥、渡辺正勝、伊関峰生、藤芳暁、松下道雄、「温度 1.5 K の単一分子分光による可視蛍光タンパク質内のプロトン移動を伴った構造変化の観測」、日本化学会第 92 春季年会（日吉、2012 年 3 月 25 - 28 日）.
(2) 大友康平、出羽毅久、松下道雄、藤芳暁、「中赤外光が誘起するタンパク質一分子の色素結合部位の構造変化」日本化学会第 92 春季年会（日吉、2012 年 3 月 25 - 28 日）.
(3) 日野原拓也、濱田裕紀、松下道雄、藤芳暁、「温度数ケルビンのタンパク質 1 分子分光装置の機械的安定性の評価」、第 5 回分子科学討論会（札幌、2011 年 9 月 20 - 23 日）.
(4) 藤原正規、平野充遥、渡辺正勝、伊関峰生、藤芳暁、松下道雄、「数 K における単一タンパク質分光を用いた可視蛍光タンパク質内のプロトン移動を伴った構造変化の観測」、第 5 回分子科学討論会（札幌、2011 年 9 月 20 - 23 日）.
(5) M. Matsushita, “Single-molecule spectroscopy of bacterial photosynthetic antenna complexes at liquid-helium temperature”, *The 70th Okazaki International Conference on “Molecular mechanism of photosynthetic energy conversion: the present research and future prospects”* (Okazaki, Japan, December 4 - 6, 2010).
(6) 大友康平、出羽毅久、南後守、渡辺正勝、松下道雄、藤芳暁、「光合成アンテナ複合体の中赤外吸収スペクトルの一分子観測」、第 4 回分子科学討論会（大阪、2010 年 9 月 14 - 17 日）.
(7) 島内明理、櫻井敦教、平野充遥、藤芳暁、松下道雄、「1.5K における単一色素分子の蛍光スペクトルの時間変化の起源探究」、日本物理学会第 65 回年次大会（岡山、2010 年 3 月 20 - 23 日）.
(8) M. Matsushita, “Spectroscopy of single proteins at liquid-helium temperature”, *Symposium on “Physics and Chemistry of Coherently Controlled Quantum Systems”* (Inuyama, Japan, March 18 - 20, 2010).
(9) 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（名古屋、2009 年 9 月 21 - 24 日）.
(10) 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（名古屋、2009 年 9 月 21 - 24 日）.

- (11) 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（福岡、2008 年 9 月 24 - 27 日）.
(12) 古屋陽、内山大輔、藤芳暁、松下道雄、末守良春、出羽毅久、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（東大阪、2008 年 3 月 22 - 26 日）.
(13) 藤原正規、藤芳暁、松下道雄、「1.5K 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（東大阪、2008 年 3 月 22 - 26 日）.
(14) 藤芳暁、松下道雄、「二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（東大阪、2008 年 3 月 22 - 26 日）.
(15) H. Oikawa, S. Fujiyoshi, T. Dewa, M. Nango, and M. Matsushita, “Single-molecule spectroscopy of light-harvesting 2 complex at liquid-helium temperature”, *The 2nd international workshop on “Photosynthetic Antennae and Coherent Phenomena”* (Osaka, Japan, December 14 - 16, 2007).
(16) D. Uchiyama, H. Oikawa, S. Fujiyoshi, T. Dewa, M. Nango, and M. Matsushita, “Structure of light-harvesting 2 complex from *Rps. acidophila* in lipid bilayer of DMPC: A single-molecule study at 5 K”, *The 2nd international workshop on “Photosynthetic Antennae and Coherent Phenomena”* (Osaka, Japan, December 14 - 16, 2007).
(17) M. Matsushita and S. Fujiyoshi, “Spectroscopy of Single Proteins at Liquid Helium Temperature”, *The 2nd International Workshop on “Materials Science and Nano-Engineering”* (Awaji Island, Japan, December 1 - 5, 2007).
(18) M. Matsushita, “Spectroscopy of Single Proteins at Liquid Helium Temperature”, *The 67th Okazaki International Conference on “Molecular science and chemical biology of biomolecular function”* (Okazaki, Japan, November 10 - 12, 2007).
(19) 内山大輔、古屋陽、藤芳暁、松下道雄、出羽毅久、南後守、「人工脂質膜中における光合成アンテナ複合体の会合体の分光」、日本物理学会第 62 回年次大会（札幌、2007 年 9 月 21 - 24 日）.
(20) 藤芳暁、藤原正規、松下道雄、「可視蛍光をプローブとした低温の単一タンパク質分光」、第 1 回分子科学討論会（仙台、2007 年 9 月 17 - 20 日）.
(21) 平野充遥、藤原正規、藤芳暁、松下道雄、

伊関峰生、渡辺正勝、「二波長の励起光を同時に利用できる低温の単一タンパク質分光装置の開発」、第1回分子科学討論会(仙台、2007年9月17 - 20日).

[その他]

ホームページ

<http://www.molphys.phys.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 道雄 (MATSUSHITA Michio)
東京工業大学・理工学研究科・准教授
研究者番号：80260032

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤芳 暁 (FUJIYOSHI Satoru)
東京工業大学・理工学研究科・助教
研究者番号：70371705