

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14146

研究課題名（和文）低濃度、小容量の光受容体膜タンパク試料における動的構造観察手法の開発

研究課題名（英文）Development of dynamic structure analysis method in low concentration, small volume photoreceptor membrane protein

研究代表者

小原 祐樹 (Obara, Yuki)

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10752032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、光受容体タンパク質の動的構造変化を観測するための新規計測システムを開発した。これはフェムト秒パルスレーザーを用いた超高速分光をベースに、シングルパルス分光法を組み合わせたもので、光源の強度ゆらぎによる計測ノイズを低減し、効率の良い信号積算が可能となる。また、遺伝子組換え大腸菌による光受容体タンパク質の発現、精製プロトコルを確立し、分光分析に適した高純度な試料を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光受容体タンパク質を含む膜タンパク質群は多くの疾患に関わっており、その機能を制御する分子標的薬創薬のターゲットとして注目されている。タンパク質の機能は高次構造によって決まっており、生理活性作用時の動態も含めて観測できる検出効率の良い観測方法の開発が必要な状況にある。本研究課題では、新規レーザー分光計測システムの開発と高純度タンパク質試料の生成という2つの異分野の技術開発からアプローチし、独自手法により動態を観察する研究基盤を整えた。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we developed a new measurement system for observing dynamic structural changes of photoreceptor proteins. This is a combination of single-pulse spectroscopy based on ultrafast spectroscopy using a femtosecond pulsed laser, which reduces measurement noise due to intensity fluctuations of the laser source and enables efficient signal integration. In addition, a protocol for expression and purification of photoreceptor protein by transgenic E. coli was established. Highly purified samples suitable for spectroscopic analysis were obtained.

研究分野：超高速光科学

キーワード：超高速光科学 ポンプ・プローブ分光 シングルパルス分光 光受容体タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の物質の輸送やエネルギー合成に関わる膜タンパク質は、がんや生活習慣病などの多くの疾患に関わることから、その機能を制御する薬剤開発のターゲットとして注目されている。その機能は主に高次構造の動きによって決まることから、これを明らかにする実験手法や計算シミュレーションに関する様々な研究が行われている。最も多く用いられてきた観測方法はX線回折であるが、中でもX線自由電子レーザーによる方法はこれまで用いられてきた放射光よりも高強度で短パルスな光源を用いるため、放射線によるタンパク質の損傷を回避でき、さらには反応途中の構造変化を時間分解して観測できる手法として近年最も注目されている。このX線回折による手法の難点としては構造の長距離秩序が必要であるため、結晶化したタンパク質を準備しなければならないという点である。しかし、膜タンパク質は安定性が低く結晶化が非常に難しく、静的な立体構造でさえも未だに全種類のうち1%程度しかまだ解析されていない。

構造情報を得るための他の手法としては、ラマン分光法とインパルス励起過渡吸収分光法は蛋白質の結晶化や染色といった前処理を必要とせず、フェムト秒超短パルスレーザーを用いたポンプ・プローブ法を応用することで、X線自由電子レーザーに匹敵するフェムト秒の超高速時間分解測定が可能な手法である。ただし、X線回折ほど詳細な構造全体の情報は得られないが、特定の官能基に対応した分子振動の情報を元に構造を推定できる。しかし、タンパク質の大量生成、高純度化が困難なため、少量のサンプルで微弱な信号変化を高精度で測定しなければならず、その技術を有する研究機関に限られており、研究報告は少ない。また、実際の測定では大きな信号光を得るために再生増幅器の強いパルス光を当てて測定しているため、タンパク質試料によっては光退色も同時に生じてしまうということがわかっている。より純粋な反応過程の観測には光退色のない線形吸収領域で、高感度に測定する方法を開発する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は光退色を抑えた条件で、低濃度、小容量の光受容タンパク質の反応初期過程の観測を実現すること、その上で効率的な光誘起反応に寄与するタンパク質の立体構造を同定することである。これを実現するために、測定装置系と試料に対して3つの独自の工夫を組み込むことを当初計画した。第一にレーザーパルス繰り返し周波数に同期した高速掃引計測、第二に共振器を用いたラマン増強の実証、広帯域超短パルス光源への適用、第三に遺伝子組換え大腸菌による変異体の発現及びその測定である。このうち、第二の計画については、第一の計画の遅れにより残念ながら実施できなかった。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換え大腸菌による光受容体タンパク質の発現・高純度精製方法の確立

フェムト秒領域の時間分解分光測定でこれまでに報告例のない光受容体タンパク質である、好熱性細菌 *Thermus oshimai* のロドプシンを対象に、遺伝子組み換え大腸菌による発現手順を確立する。また、レーザー分光測定に適した低散乱で高濃度な試料を得るための精製方法を確立する。

(2) ロドプシンの基礎光学特性の計測、および従来手法での高速時間掃引計測

精製したロドプシンを試料として、吸光度や不純物による散乱の計測を実施し、試料の評価を行う。また、従来手法のマルチチャンネルロックインアンプを用いた拘束時間掃引計測を行い、過渡吸収スペクトルの変化量の見積もり、光退色の評価を行う。

(3) レーザーパルス繰り返し周波数に同期した高速時間掃引シングルパルス分光計測

同様の研究で用いられるフェムト秒パルスレーザーとしては、パルス繰り返し周波数が1kHzの再生増幅器が多い。分光測定をこの繰り返し周波数に同期させて、1パルスごとの測定を積算する手法というのは多く用いられる手法であるが、本研究で使用予定のレーザーはそれらよりも速い10kHzの再生増幅器を使用する予定である。近年の光受光素子の性能向上に伴い、多波長を同時観測可能で高速動作が可能なものが入りやすくなってきた。それを用いて他研究よりも1桁高速な分光積算測定を行うことで、微弱な光での測定が可能な感度を実現する。

(4) 近縁種のロドプシンや変異体の発現

変異体を用いた構造の計測は蛋白質の高次構造変化が支配的なミリ秒領域では行われているが、フェムト秒時間分解分光において比較測定が行われた例は知る限り無い。光を吸収する電子構造を持つ発色団周辺の蛋白質の立体構造が知られている試料では、光反応の初期過程である発色団の電子状態変化に寄与する周囲の蛋白質立体構造を特定する上で効果的な手法だと考えている。

4. 研究成果

(1) ロドプシン試料の作製手順の確立

本研究では大腸菌(BL21(DE3))を用い、以下に示す発現手順を確立した。好熱性細菌 *Thermus oshimai* のバクテリオロドプシンの遺伝子を大腸菌のコドンに最適化し、pET21-dをベクターと

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

してプラスミドを作製した。これを大腸菌(BL21(DE3))に導入し、液体培地(2xYT)中で培養し、All-trans レチナールを終濃度 $5 \mu\text{M}$ で添加し、IPTG(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)にてタンパク質の発現を誘導。大腸菌を遠心分離したのちに、バッファーに懸濁、氷冷しながら菌体を超音波破碎し、大腸菌中のロドプシンを取り出した。その後、遠心分離によりロドプシンを含む膜画分を得た。これをバッファー中に再分散させるために、界面活性剤(n-Dodecyl- β -D-maltoside)を加え、膜画分から膜タンパク質を抽出した。遠心式フィルター (Amicon Ultra-10K) にかかけ、膜タンパク質を回収し、少量のバッファーに懸濁することで濃縮し測定試料とした (図1)。この得られた試料をウエスタンブロッティングと吸収スペクトルからロドプシンの発現を確認した。また、低散乱で分光分析に適当な高純度の試料を得た。



図1 精製したロドプシン試料

(2) 高速時間掃引シングルパルス分光計測装置の構築

図2に得られたロドプシン試料を用いてポンプ・プローブ法により測定したフェムト秒領域の過渡吸収スペクトルを示す。検出には従来のマルチチャンネルロックインアンプを用いた。その結果、試料を励起した直後に570nm付近に吸収の減少が見られ、1 ps程度の時定数で緩和していく様子が観測された。また、この吸収変化に重畳した吸光度の細かな振動構造も観測された。これは近縁種のロドプシンでも報告がある、瞬間的な光励起状態形成と中間状態へ分子振動を伴い緩和する様子と同様の変化と考えられる。しかし、本実験の可視光超短パルスレーザーは非線形光学過程による波長変換を多段に用いていることから、上流の強度やスペクトルのゆらぎが下流で大きく増幅され、過渡吸収スペクトルのノイズとして解析を困難にする要因となっていた。

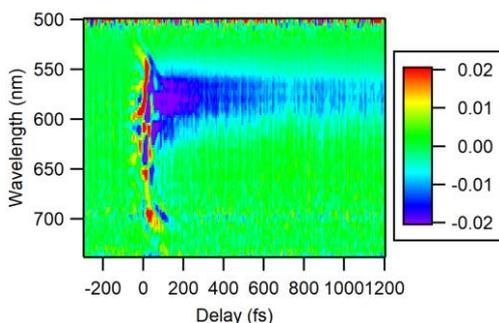


図2 マルチチャンネルロックインアンプ計測システムで測定したロドプシンの過渡吸収スペクトル

この問題を解決するために、新たに開発したシングルパルス分光計測と高速時間掃引ポンプ・プローブ分光法を組み合わせた計測装置を従来の検出器と置き換える形で組み込んだ。光源はチタンサファイアレーザー超短パルスアンプシステム (Solstice Ace, SpectraPhysics) から出射された中心波長800 nmのパルスを用い、光パラメトリック増幅器によりロドプシンの吸収波長付近の中心波長500 nmの可視光パルスに変換した。これをビームスプリッターにて試料励起用のポンプ光と励起直後の吸収スペクトルを検出するプローブ光に分割した。ポンプ光にはプローブ光との時間間隔を高速に掃引可能な移動ステージ (ScanDelay, Angewandte Physik & Elektronik GmbH) を導入した。また、光チョッパーシステム (MC2000B, Thorlabs) により1パルスごとにポンプ光を遮ることで、図4に示すようにポンプ光を入れていない場合の参照スペクトルと交互に測定した。シングルパルス分光装置は光源であるチタンサファイア再生増幅器 (Solstice Ace, Spectra-Physics) の繰り返し周波数である10 kHzに合わせて、高速にスペクトルを取得できる。検出素子は512chのCMOSリニアイメージセンサ (S12198-512Q-01, Hamamatsu) を使い、プリアンプ (DZA-S12198, tec5) を通して信号を読み出した。過渡吸収信号 ΔA は、隣り合うポンプ光あり I_{ex} ・なし I_0 のプローブ光スペクトルのペアから $\Delta A = -\log_{10}(I_{ex}/I_0)$ により得た。シングルパルス分光測定によりレーザーパルスの強度やスペクトルのドリフトが過渡吸収信号に及ぼす影響を低減することができる。

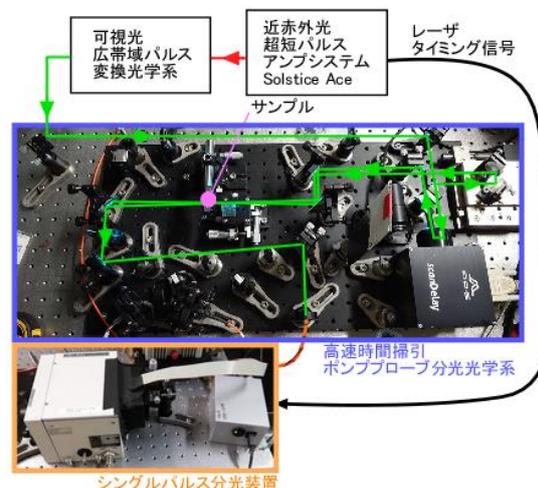


図3 レーザーパルス繰り返し周波数に同期した高速時間掃引計測装置概略図

(3) 近縁種のロドプシンや変異体の発現

本研究で対象とした *Thermus oshimai* の遺伝子情報から、発色団であるレチナール分子の周辺構造に近い近縁種として Xantho rhodopsin、Gloeobacter rhodopsin を選定した。現在、遺伝子組み換え大腸菌による発現を行っている。さらには *Thermus oshimai* の発色団周辺の立体構造を変化させたキメラ種の発現検討を進めた。これらを網羅的に比較測定することで、分光測定で得られる情報以上のタンパク質高次構造の動態を明らかにする。このように、遺伝子工学技術を用いてタンパク質を分子構造から操作するための様々なノウハウを体得することができた。

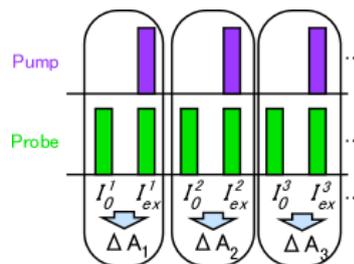


図4 交代励起の概念図

研究期間全体を通し、遺伝子工学分野の技術を新規に自ら習得し、分光分野に特化した試料調整が可能となった。このタンパク質分子の操作技術と新たな時間分解分光手法の開発の両面から独自手法による動的構造解析を行う研究基盤が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ito Terumasa, Obara Yuki, Misawa Kazuhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Invited Article: Spectral focusing with asymmetric pulses for high-contrast pump-probe stimulated Raman scattering microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 APL Photonics	6. 最初と最後の頁 092405 ~ 092405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5030053	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuki Obara, Makina Yabashi, Toshinori Suzuki, and Kazuhiko Misawa
2. 発表標題 Femtosecond time-resolved X-ray absorption spectroscopy using SACLA
3. 学会等名 The 9th Asian Workshop on Generation and Application of Coherent XUV and X-ray Radiation (9th AWCXR) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ito Terumasa, Kawagishi Masahiko, Obara Yuki, Terada Sumio, and Misawa Kazuhiko
2. 発表標題 Pump-probe stimulated Raman scattering microscopy for monitoring the transport of gaseous molecules
3. 学会等名 Label-free Biomedical Imaging and Sensing (LBIS) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terumasa Ito, Masahiko Kawagishi, Yuki Obara, Sumio Terada and Kazuhiko Misawa
2. 発表標題 Pump-Probe Stimulated Raman Scattering Microscopy for Monitoring the Transport of Gaseous Molecules
3. 学会等名 SPIE Photonics West BIOS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	三沢 和彦 (Misawa Kazuhiko)		
研究協力者	藪下 篤史 (Yabushita Atsushi)		
研究協力者	養王田 正文 (Yohda Masafumi)		
研究協力者	福谷 洋介 (Fukutani Yosuke)		