

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2007～2011

課題番号：19685001

研究課題名(和文) 単一タンパク質の振動分光

研究課題名(英文) Vibrational spectroscopy of single proteins

研究代表者 藤芳 暁(SATORU FUJIYOSHI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：70371705

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで誰も成功していなかったタンパク質の中赤外吸収スペクトルの1分子観測に成功した。これまで、中赤外吸収を測定するには、感度が良いとされる顕微赤外分光装置でも、100万個のタンパク質が必要であり、1分子の観測例は無かった。そこで、我々は従来法を改良するのではなく、以下に示す全く新しい光学課程を用いて、これを1分子観測を実現した。数ケルビンでも、タンパク質を結合させた色素の蛍光測定し続けていると、無蛍光状態になる。この時、タンパク質に共鳴する赤外光を入射すると、色素の状態が無蛍光状態から蛍光状態に変化することを発見した。我々はこの光学現象を用いて、タンパク質の赤外吸収スペクトルの1分子観測に成功した。

研究成果の概要(英文)：Vibrational infrared absorption of a single protein molecule was detected at a few kelvins as infrared-induced recovery of visible fluorescence of a dye with which the protein was labeled. This sensitive method of detecting infrared absorption was demonstrated for a single bovine serum albumin (BSA) molecule labeled with Alexa Fluor 660 by determining the vibrational infrared absorption spectrum of the backbone vibrations of the R-helical structure in the wavelength region around 6 μ m (1650 cm^{-1}). In addition to measuring the vibrational infrared absorption spectrum, the visible fluorescence can be simultaneously used for imaging of the same dye-labeled single protein molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
総計	19,100,000	5,730,000	24,830,000

研究分野：物理化学

科研費の分科・細目：分子分光

キーワード：分光・低温・タンパク質・単一分子分光・赤外・中赤外・アミドI

1. 研究開始当初の背景

生命現象の理解を深める上で、その機能を司るタンパク質を研究することは非常に重要であることは論を待たない。単一分子分光では、一つのタンパク質のみを観測することによって、上記のような構造の多様性による実験の難しさを除去できるため、国内外で広く試みられている。特に、低温下では熱による構造変化を抑えることができるため、均一幅が支配する非常にシャープな自家蛍光の電子スペクトルが得られている。しかし、得られる電子スペクトルは構造や機能を間接的に反映するものの、直接的な情報を与えない。このため、分光学的な議論をするためには統計量の結果が必要であるため、従来法では平均構造を議論するにとどまっていた。

2. 研究の目的

本課題の目的はタンパク質の構造と機能を明らかにするために、単一のタンパク質の振動分光法を世界にさきがけて成功させることにある。

3. 研究の方法

この実験を実現するためには、既存の装置では不可能であった。このため、対物レンズから自作した新たな顕微システムを構築した。具体的なポイントは、温度数ケルビン下にあるタンパク質1分子に、回折限界に絞った可視光(633 nm)と中赤外光(6000 nm)を照射するところである。これは、世界で初めての試みであり、実際にこの研究費により作成に成功した。

4. 研究成果

4年間に渡る研究の結果、ユニークな赤外誘起の光学現象を発見した。この現象を用いて、世界で初めて、単一タンパク質(牛血清アルブミン)の α ヘリックス構造を取っているペプチド主鎖のCO伸縮振動の赤外吸収スペクトルの取得に成功した。

これらの研究成果は次節にあるように、査読付きの雑誌に6本の論文として掲載された。しかも、これらの論文のために、6個の装置を新規に開発しており、単に論文数だけでなく、学術的な6つの進歩があったと考えている。

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6件)

[1] 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」

Physical Review Letters • 106号 • P.078101 (4 pages)

[2] S. Fujiyoshi, Y. Furuya, M. Iseki, M. Watanabe, M. Matsushita

「Vibrational Microspectroscopy of Single Proteins」

J. Phys. Chem. Lett • 1号 • P. 2541 - 2545 • 2010年

[3] 「Single-Component reflecting objective for ultraviolet imaging and spectroscopy at cryogenic temperature」

M. Fujiwara, S. Fujiyoshi, M. Matsushita;

Journal of Optical Society of the America B, 26 (2009) 1395.

[4] 「Visible Fluorescence Spectroscopy of Single Proteins at Helium-Liquid Temperatures」

S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, M. Matsushita;

Physical Review Letters, 100 (2008), 051125 (3 pages).

[5] 「How deep is the potential well confining protein to a specific conformation? A single-molecule spectroscopy on temperature dependence of conformational change at 5 - 30 K」

H. Oikawa, S. Fujiyoshi, T. Dewa, M. Nango, M. Matsushita;

Journal of the American Chemical Society (Communication), 130 (2008) 4580-4581.

[6] 「Single-Component Reflecting Objective for Low-Temperature Spectroscopy in the Entire Visible Region」

S. Fujiyoshi, T. Fujiwara, C. Kim, M. Matsushita, A. M. van Oijen, J. Schmidt;

Applied Physics Letters, 91 (2007) 051125 (3 pages).

〔学会発表〕 (計 18 件)

1. 「光合成アンテナ複合体の中赤外スペクトルの一分子観測」
大友康平・出羽毅久・南保 守・渡辺正勝・松下道雄・藤芳 暁
日本化学会 2011・4B4-11・発表日：2011 年 3 月 29 日・神奈川
(講演ハイライトに選出)

2. 「タンパク質の赤外吸収の単一分子観測：色素の光熱サイクルに対する考察」
藤芳 暁・古屋 陽・伊関峰生・渡辺正勝・松下道雄
分子科学会 2010・1B20・発表日：2010 年 9 月 14 日・大阪

3. 「Single-component reflecting objective for single-protein spectroscopy at a few kelvins」
Satoru Fujiyoshi
GSC セミナー・発表日 2010 年 7 月 15 日・横浜

4. 「単一タンパク質の振動分光法の開発」
藤芳 暁・古屋 陽・伊関峰生・渡辺正勝・松下道雄 (東工大物理・総研大)
日本化学会 2010・2E1-39・発表日：2010 年 3 月 27 日・大阪

5. 「低温固体中の単一 Pr³⁺核スピン量子状態分光の試み」
中村一平・吉弘達矢・藤芳 暁・松下道雄 (東工大物理)
物理学会 2010 年春季大会・21pTD-5・発表日：2010 年 3 月 21 日・岡山

6. 「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」
島内明理・櫻井敦教・平野充遙・藤芳 暁・松下道雄 (東工大物理)
日本物理学会 2010 年春季大会・23aHL-3・発表日：2010 年 3 月 23 日・岡山

7. 「光活性化アデニル酸シクラーゼの単一タンパク質分光」
藤芳 暁・平野充遙・松下道雄・伊関峰生・渡辺正勝 (東工大物理・総研大)
分子科学討論会 2009・4B07・発表日：2009 年 9 月 24 日・名古屋

8. 「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」
藤原正規・藤芳 暁・松下道雄 (東工大物理)
分子科学討論会 2009・4B06・発表日：2009 年 9 月 24 日・名古屋

9. 「液体ヘリウム温度における単一タンパク質の可視蛍光分光」
藤芳 暁 (東工大物理)
日本物理学会 2009 年春季大会
(若手奨励賞受賞講演)
28pVB-2・発表日：2009 年 3 月 28 日・東京

10. 「低温固体中の単一 Pr³⁺の発光検出の試み」
吉弘達矢・中村一平・藤芳 暁・松下道雄 (東工大物理・さきがけ)
日本物理学会 2009 年春季大会・27pSK-9・発表日：2009 年 3 月 27 日・東京

11. 「タンパク質の生体機能の単一分子観測に向けて」
藤芳 暁 (東工大物理)
日本物理学会 2008 年秋季大会 (シンポジウム講演)・22pWB-8・発表日：2008 年 9 月 22 日・岩手

12. 「低温の単一タンパク質分光の励起過程の検討」
藤芳 暁・平野充遙・古屋 陽・藤原正規・松下道雄・伊関峰生・渡辺正勝 (東工大物理・総研大)
第 2 回分子科学討論会・3C18・発表日：2008 年 9 月 26 日・福岡

13. 「低温固体中の単一イオンの発光検出に向けた可視顕微分光システムの開発」
吉弘達矢・平野充遙・藤芳 暁・松下道雄
日本物理学会 2008 年秋季大会・20pZA-5・発表日：2008 年 9 月 20 日・岩手

14. 「二光子蛍光による低温の単一タンパク質分光」
藤芳 暁・松下道雄
日本物理学会 2008 年春季大会・23pYD-6・発表日：2008 年 3 月 23 日・大阪

15. 「1.5 K で使える反射対物レンズの球面収差及び色収差の改善」
藤原正規・藤芳 暁・松下道雄
日本物理学会 2008 年春季大会・23pYD-5・発表日：2008 年 3 月 23 日・大阪

16. 「顕微分光による光合成アンテナ複合体のエネルギー移動の研究」
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
日本物理学会 2008 年春季大会・23pYD-4・発表日：2008 年 3 月 23 日・大阪

17. 「可視蛍光をプローブとした低温の単一タンパク質分光」
藤芳 暁・藤原正規・松下道雄
第 1 回分子科学討論会・2C11・発表日：2007 年 9 月 21 日・宮城

18. 「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」
内山大輔・古屋 陽・藤芳 暁・松下道雄・出羽毅久・南後 守
日本物理学会 2007 年秋季大会・21aRK-3・発表日：2007 年 9 月 21 日・北海道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤芳 暁 (SATORU FUJITOSHI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・助

教

研究者番号：70371705