

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02665

研究課題名(和文) 1分子吸収分光法の確立

研究課題名(英文) Single-molecule absorption spectroscopy

研究代表者

近藤 徹 (Kondo, Toru)

東京工業大学・生命理工学院・講師

研究者番号：30452204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、1分子レベルでの吸収分光解析を達成するために高感度吸収顕微鏡の開発に取り組んだ。通常1分子分光に利用される蛍光検出に比べて吸収検出は難易度が高く、当初はノイズの大きさに悩まれたが、レーザー光源の強度や偏光特性の安定化、光学系の光散乱の軽減化、光学素子の最適化、高感度光検出器の導入、光学系の温度安定化、安定除振台の導入、などの様々な工夫を施した結果、回折限界空間分解能(半波長程度)で $OD = \sim 10^3$ の微小吸収信号を検出できるようになった。光合成タンパク質である光化学系I(PS I)三量体の1粒子吸収イメージングにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、タンパク質構造が原子分解能で明らかにされ、構造を基にした機能解析が可能になってきた。一方で、生体内の生理環境は刻一刻と変化しており、構造は常に変動している。このようなタンパク質構造ダイナミクスを解析するため、1分子蛍光分光法が発展した。しかし、蛍光検出では非蛍光性の分子・状態・反応中間体は解析できない。そこで、吸収検出をベースにした1分子分光法の開拓が不可欠となる。本研究で開発した高感度吸収顕微鏡技術を発展させることで、従来の蛍光顕微では見えなかった生体光反応の1分子観測が可能となり、生体系の動的挙動の意義の解明に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Highly-sensitive absorption microscope was developed for the single-molecule absorption spectroscopy. To detect a feeble absorption signal, we reduced noises caused by a laser source, light scattering, inappropriate optics, and instability of an optical system. Additionally, a sensitive photodetector was utilized. Consequently, we achieved the absorption imaging of single photosystem I (PS I) particles with diffraction-limited spatial resolution.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子分光 顕微分光 生体系の動的挙動と機能の相関 光合成 タンパク質ダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

光は生命活動の根底を支えている。光合成の光反応系、視物質ロドプシン、DNA 光回復酵素や青色光センサーなどのフラビン関連タンパク質、LPOR などの光誘起型色素合成酵素など、数多くの生体系が光で制御される。光子吸収がトリガーとなり、超高速励起エネルギー移動、電荷分離反応、分子構造変換などが誘起されて様々な生体応答を発現する。どの反応系もタンパク質骨格に光受容分子が埋め込まれている点で共通する。これら機能分子の物性や配置を各種分光法で解析し、光反応機構が長年研究されてきた。近年では、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡などを用い、Å スケールの原子分解能で分子間距離や相対配向を同定できるまでになった。構造データを基にした理論計算との比較が可能となり、生体系の構造と機能の相関が明らかになりつつある。

一方、分子動力学 (MD) 計算などから、土台となるタンパク質骨格の熱的な構造揺らぎや、乱雑な環境変動に付随する局所的な構造変化など、タンパク質構造ダイナミクス的重要性が指摘されている。機能分子の物性は、周辺アミノ酸残基の僅かな動きに対しても敏感であり、局所的で微小な構造ダイナミクスでも反応経路や速度に大きく影響し得る。それにも関わらず、生体系は極めて安定に機能しており、不思議という他ない。構造自由度の高い生体タンパク質のような巨大高分子で、どのように反応経路・速度が安定化されているのかという問いは、生体機能のロバスト性の本質に迫るだけでなく、新規機能性物質の設計指針としても意義深い。しかし、その重要性に反して構造ダイナミクスと機能の相関解析は未だ手付かずのままである。特に、実験的なアプローチはほとんどない。

問題は、微小な構造変化や不均一性、それに伴う反応経路・速度のバラつき、の解析が難しい点にある。通常、局所構造の差異は各分子の光学特性の違いとして検出できる。レーザー励起と同期させれば、過渡的な反応過程も解析可能である。しかし、光照射領域には無数の標的粒子が存在するため、各々の微小な違いはアンサンブルとして平均化されて評価できない。ましてや、僅かな構造変化と反応経路・速度を 1 対 1 で対応させるのは不可能に近い。

このようなアンサンブル限界を超えるため、1 分子のみの分光解析法が模索された。1990 年に 1 分子の蛍光検出に成功し、それ以降は、蛍光をベースとした 1 分子分光やイメージングが主流となった。現在では、蛍光の強度・寿命・偏光方向の揺らぎ、蛍光スペクトルの時系列変化など、様々な蛍光特性が 1 分子レベルで解析され、タンパク質構造ダイナミクスの議論も活発になっている。一方で、これらの蛍光分光法では非蛍光性の分子・状態は観測できない。さらに、蛍光寿命は通常 ns 程度であり、それより短時間 (fs ~ ps) で生じる超高速現象や反応中間体は追跡が難しい。そのため 1 分子の分光解析はよく光る一部の分子や長寿命状態のみに限られてきた。しかし、光反応機構を理解するには、むしろ蛍光を発しない過渡的な中間状態の解析が重要となる。例えば、励起エネルギー移動系の場合、蛍光を発するのは主に移動先の分子であり、媒介する分子の逐次的なスペクトル時間変化など、直接的な情報を得るのは難しい。また、電子移動や酸化還元過程で生じるカチオンやアニオンは非蛍光性で短寿命のものが多く、蛍光検出では観測が難しい。これらの問題は全て、吸収測定をベースとした 1 分子分光法で解決できる。1 分子レベルで過渡吸収測定ができれば局所的なタンパク質ダイナミクスが生体光反応の経路や速度にどう影響するかを分光的に解明できる。

2. 研究の目的

生体系・生体物質の最大の特徴は、熱的な構造揺らぎや環境変動に応答する構造変化が絶えず生じている点である。そのため、分子間距離や相対配向、電子エネルギー準位、分子間相互作用、などの物理因子は刻一刻と変化し、それに応じて反応経路や速度も変動する。しかし、どの程度の寄与があるか、という定量的議論は皆無に等しい。そこで本研究では、新規の 1 分子吸収分光法を確立し、微小な構造変化と反応経路・速度の変化を 1 対 1 で対応させて解析する。生体機能の安定化に重要なのは、揺らぎ難さ (rigidity) なのか、それとも柔軟性 (flexibility) なのか、を調べることで『構造自由度の高い生体タンパク質のような巨大高分子で、どのように反応経路・速度が安定化されているのか?』という問いの答えを探る。

3. 研究の方法

1 分子吸収分光の実現に向けて吸収顕微鏡の開発を進めた。まずは種々のレンズやミラーなどを組み合わせる一般的な共焦点蛍光顕微鏡を作製した。光源に 671 nm と 532 nm の CW レーザーを用い、電気光学変調器 (EOM) を利用した光強度安定化ユニットを導入することで光強度の揺らぎを抑制した。装置に組み込む光学素子を選定し、ノイズを減少させた。さらに、倒立型の顕微鏡筐体を自作して測定系を安定化した。そこにピエゾステージを設置し、試料位置の 3 次元スキャンを行った。ビームスプリッターを挿入してレーザー光を 2 つに分け、一方を参照光とし、もう一方を対物レンズに入射して試料に集光した。サンプル基板の上にミラーを設置して試

料透過光を同軸で反射し、バランス光検出器で光強度を測定した。バランス光検出器には2つの検出チャンネルがあり、試料透過光と参照光を同時に測定して光強度の差分検出を行えば、試料の光吸収に伴う透過光強度の減少を高感度に検出できる。得られた差分信号はDAQデバイスを介してPCに取り込み、吸収信号として測定した。同時に、試料から生じた蛍光信号もアバランシェフォトダイオードで検出し、蛍光信号として測定した。ピエゾステージによる試料走査や信号計測などはLabViewプログラムで制御し、蛍光と吸収の同時イメージングを実現した。プリアンプや光学チョッパーを導入して信号に変調を加え、ロックイン検出を可能にした。さらに、フェムト秒レーザーパルス为非線形光学結晶ファイバ(PCF)に集光することで発生するスーパーコンティニューム光をプリズムで分光し、単色光(スペクトル幅1.5 nm程度)として出力できるようにした。500~800 nm程度の波長領域で単色のパルス光を出力することが可能となった。S/Nの更なる向上のために干渉光学系の開発も進めた。空間光位相変調器(SLM)を導入し、レーザー光の位相制御を行った。CMOSカメラも導入し、位相制御の最適化に向けた準備を整えた。

4. 研究成果

一般的な1分子分光は蛍光検出で行われる。蛍光検出に比べて吸収検出は難易度が高く、当初はノイズの大きさに悩まされた。そこで、レーザー光源の強度や偏光特性の安定化、光学系の光散乱の軽減化、光学素子の最適化、高感度光検出器の導入、光学系の温度安定化、安定除振台の導入、などの様々な工夫を施した。結果、ノイズを大幅に除去することができ、回折限界空間分解能(半波長程度)で $OD \sim 10^{-5}$ 程度の微小吸収信号を検出できるようになった。光合成反応中心タンパク質である光化学系I(PS I)の三量体(約300個のクロロフィル分子が結合)の1粒子を測定し、蛍光画像と吸収画像の同時取得に成功した。PS Iの吸収波長帯である671 nmで吸収スポットが観測された一方で、吸収を持たない532 nmでは何も観測されなかった。このように、光合成タンパク質1粒子レベルの吸収観測に成功した。さらに、緑色硫黄細菌が持つ巨大アンテナ分子であるクロロソームの1粒子吸収観測にも成功した。

今後、光源をCWレーザーからフェムト秒パルスレーザーに代えて過渡吸収顕微へと発展させていく。光学チョッパーを利用したロックイン検出を導入すれば、過渡吸収信号のS/Nを向上させられる。さらに、干渉検出系と組み合わせることでより高感度の吸収観測が可能となると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kondo Toru, Mutoh Risa, Arai Shun, Kurisu Genji, Oh-oka Hirozo, Fujiyoshi Satoru, Matsushita Michio	4. 巻 156
2. 論文標題 Energy transfer fluctuation observed by single-molecule spectroscopy of red-shifted bacteriochlorophyll in the homodimeric photosynthetic reaction center	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 105102 ~ 105102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0077290	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 -
1. 著者名 Moya Raymundo, Norris Audrey C., Kondo Toru, Schlau-Cohen Gabriela S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Observation of robust energy transfer in the photosynthetic protein allophycocyanin using single-molecule pump-probe spectroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Chemistry	6. 最初と最後の頁 153 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41557-021-00841-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Moya Raymundo, Kondo Toru, Norris Audrey C., Schlau-Cohen Gabriela S.	4. 巻 29
2. 論文標題 Spectrally-tunable femtosecond single-molecule pump-probe spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optics Express	6. 最初と最後の頁 28246 ~ 28246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/oe.432995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kondo Toru, Mutoh Risa, Tabe Hiroaki, Kurisu Genji, Oh-Oka Hirozo, Fujiyoshi Satoru, Matsushita Michio	4. 巻 11
2. 論文標題 Cryogenic Single-Molecule Spectroscopy of the Primary Electron Acceptor in the Photosynthetic Reaction Center	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 3980 ~ 3986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c00891	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 -

1. 著者名 近藤 徹	4. 巻 76
2. 論文標題 単一タンパク質分光でみえる光合成の光反応制御に関わる複数のタンパク質構造揺らぎ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本物理学会誌	6. 最初と最後の頁 17~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Kondo Toru, Gordon Jesse B., Pinnola Alberta, Dall 'Osto Luca, Bassi Roberto, Schlau-Cohen Gabriela S.	4. 巻 116
2. 論文標題 Microsecond and millisecond dynamics in the photosynthetic protein LHCSR1 observed by single-molecule correlation spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11247~11252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1821207116	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 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 新井峻, 近藤徹
2. 発表標題 一分子吸収分光に向けた高感度吸収顕微鏡の開発
3. 学会等名 第77回日本物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤徹
2. 発表標題 複数の分子が織りなす安定・高効率な生体光反応
3. 学会等名 第102回日本化学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤徹
2. 発表標題 光合成光反応制御システムの機能的ロバスト性
3. 学会等名 人工光合成研究センター 第1回若手研究者研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤徹
2. 発表標題 光合成光捕集制御に関わるタンパク質構造揺らぎの単一タンパク質分光解析
3. 学会等名 第76回日本物理学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤徹
2. 発表標題 光合成生物の日焼け防止策 ～ 1粒のタンパク質を光学顕微鏡で眺めてみた～
3. 学会等名 光科学技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤徹
2. 発表標題 レーザー同期できないタンパク質揺らぎの解析：生体系のロバスト性の理解に向けて
3. 学会等名 第22回光科学若手研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤徹
2. 発表標題 単一タンパク質分光で観る光合成光反応の動的制御機構
3. 学会等名 第27回光合成セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤徹
2. 発表標題 タンパク質の動的性質を利用したロバストな生体光反応
3. 学会等名 第3回定量生命科学研究所シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Kondo
2. 発表標題 Next challenge in biological photophysics: From static/isolated protein to dynamic/assembled protein network
3. 学会等名 第57回生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Kondo
2. 発表標題 Regulation mechanism of photochemical reaction through protein dynamics in biological photosynthetic system
3. 学会等名 第4回 FRIS Retreat（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤徹
2. 発表標題 単一タンパク質分光で解き明かす生体系の動的挙動と機能の相関
3. 学会等名 第75回日本物理学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤徹
2. 発表標題 生物から学ぶ新規機能性物質の設計指針：不均一媒質が生み出す多機能性の理解に向けて
3. 学会等名 第100回日本化学会（招待講演）
4. 発表年 2020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