

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2019～2022
課題番号：19H02672
研究課題名(和文) タンパク質の機能発現における水素結合の役割に関するクライオ1分子観察による研究

研究課題名(英文) Cryogenic single-molecule detection of hydrogen bond network in protein

研究代表者
松下 道雄 (Matsushita, Michio)

東京工業大学・理学院・准教授

研究者番号：80260032
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、タンパク質の機能発現における水素結合の役割に関するクライオ1分子観察による研究である。その成果として、クライオ1分子分光を行うと、光合成アンテナタンパク質複合体にあるクロロフィルの特定の水素結合を観察できることを実験的に実証した。このタンパク質複合体には、数千個のCO結合があるにも関わらず、色素結合サイトの少数のCO結合が独占的に観察されることをしめした。これは、世界初の発見であり、学術的にも大きな進歩である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた実験法は、1個のタンパク質中の活性な場所である色素結合サイトの水素結合状態を見ることができ、物理学、物理化学的に大きな意義のある方法である。これを、生体検査などにも応用すれば、社会的に重要な手法になると考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present project is "Research of hydrogen bond network in protein with cryogenic single-molecule fluorescence spectroscopy". As the achievement of our project, we experimentally obtained the hydrogen bond network nearby the pigment in protein-pigment complex with the cryogenic single-molecule fluorescence spectroscopy. Despite the fact that this protein complex has thousands of CO bonds, the CO bond at hydrogen bond of the pigment binding site were highlighted.

研究分野：物理化学

キーワード：1分子分光 タンパク質 水素結合

1. 研究開始当初の背景

生化学反応は複数の生体分子がつくる柔らかく複雑な系である。それに関わらず、高い選択性で効率よく進む。このような反応には水素結合が関わっており、水素結合がつくるネットワークが、このような特異性を産み出していると考えられる。しかし、その実体はよく分かっていない。研究を困難にしている主な原因は、(1) 反応に関わる水素結合以外にも無数の水素結合があるため、重要な働きをする水素結合を特定できず、(2) 様々な準安定状態の平均が観測されるため、活性に重要な変化が埋もれてしまうからである。

2. 研究の目的

応募課題の目的は、タンパク質の活性化における水素結合の役割を研究することにある。研究の対象としたのは、光合成タンパク質色素複合体である。この分子複合体に結合した内在性の色素であるクロロフィルの中赤外吸収の1分子観察に成功した。得られたスペクトルを見ると、分子複合体には数千のCO結合が存在するにも関わらず、クロロフィルに水素結合した少数のCO結合が強調されて観察されることが分かった。これは、タンパク質の活性化における水素結合の役割を研究するための大きな一歩となったと考えている。

3. 研究の方法

中赤外吸収の1分子観察は直接的に実行することは感度の問題で不可能である。そこで、本研究では、入射した中赤外光の影響を、クロロフィルの近赤外吸収スペクトルの変化として1分子観察を行った。

この実験で重要なのが、近赤外光と中赤外光を同一の位置かつ回折限界に絞り込むことである。これを実現するために、我々は図1aに示す顕微分光装置を開発した。この顕微分光装置の照射系は反射光学系で構成させることで色収差が全くない設計にしている。試料とクライオ対物鏡は超流動ヘリウム中(温度1.5 K)に配置し、機械的なドリフトが最小になるようにしている。クライオ対物鏡は反射光学系で構成される対物レンズで、極低温でも動作する設計になっている。特に、本研究ではクライオ対物鏡の材質をフッ化カルシウムにすることで、紫外から中赤外(130から8000 nm)まで使用可能にしている。顕微鏡内部は乾燥空気を循環させることで空気中の水による中赤外吸収を最小にする設計になっている。

近赤外光と中赤外光を同一の位置かつ回折限界に絞り込む工夫について述べる。前述のように、我々の顕微分光装置は反射光学系で構成されるため、色収差がない。そこで、図1a中央のPlane Aにおいて中赤外光と近赤外光の点像分布関数を観察し、その位置とサイズを調べれば、試料面における光スポットの関係性を評価できる。図1bはその結果である。図から、中赤外光と近赤外光とは同一の位置に集光されており、そのサイズはほぼ回折限界であった。

実際の実験では、近赤外光の波長を掃引し、クロロフィルの蛍光を観察することで、個々のクロロフィルの励起スペクトルとして1分子観察し、中赤外光のありなしにおけるスペクトルの時間変化を測定した。

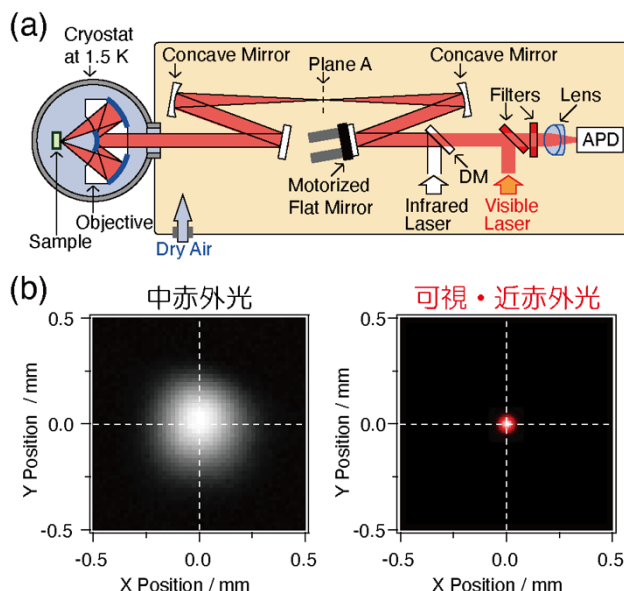


図 1. (a) 分子複合体の中赤外吸収の1分子観察のための顕微分光装置. (b) 第一結像面 (Plane A)における励起光の点像分布関数. 顕微分光装置が反射光学系で構成され、その光学系には十分な波面精度があるものを用いているため、これらの点像分布関数が試料位置での2色の光の点像分布関数に比例していると考えて良い。

4. 研究成果

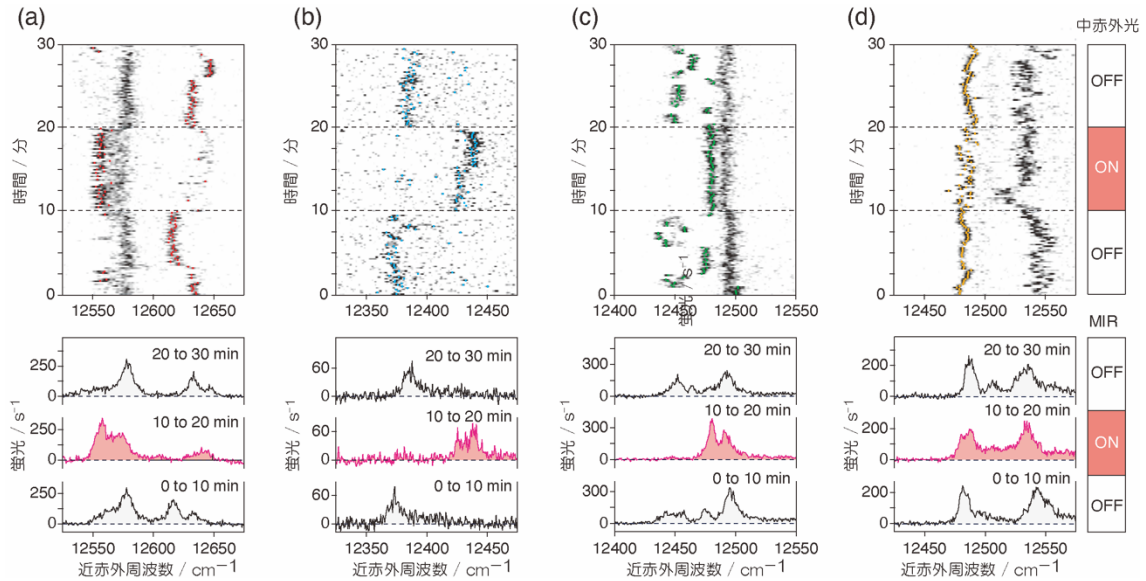


図2. 温度 1.8 K における光合成タンパク質色素複合体の中赤外吸収の1分子観察の実験結果. (a)から(d)は、それぞれ異なる複合体である. それぞれの図の上段はスペクトルの時間変化をグレースケールの二次元プロットしたものであり、下段は (中赤外 OFF) 0～10分、(中赤外 ON) 10～20分、(中赤外 OFF) 20～30分のスペクトルの平均.

図2に、温度 1.8 K における光合成タンパク質色素複合体の中赤外吸収の1分子観察の実験結果である[1]。複合体には、紅色細菌 *Rhodospirillum rubrum* (Rb.) *sphaeroides* 2.4.1 から抽出した Light Harvesting 2 (LH2) 複合体を用いた。実験では4つの複合体に対して観察を行った。その結果を(a)から(d)にそれぞれ示す。観察された信号は LH2 複合体に結合したバクテリアクロロフィル a (BChl a) の電子状態に対応する。それぞれの図の上段はスペクトルの時間変化をグレースケールで二次元プロットしたものであり、下段は (中赤外 OFF) 0～10分、(中赤外 ON) 10～20分、(中赤外 OFF) 20～30分のスペクトルを平均したものである。図2aの LH2 複合体を見ると、12555 cm^{-1} 付近と 12630 cm^{-1} 付近に二つのピークが存在する。これは、個々の BChl a 分子の電子吸収に由来するものである。赤でハイライトした BChl a 分子の中心周波数は、大きく分けて2つの状態間を行き来しており、主に高エネルギー側に局在する。この LH2 複合体に対して、中赤外光を照射すると、赤でハイライトした BChl a 分子の中心周波数が低エネルギー側に多く局在するようになる。ここで、中赤外光照射を止めると、0～10分と同様に、主に、高エネルギー側に局在するようになる。このように、図2aで示した LH2 複合体では、中赤外光照射によって BChl a 分子の中心周波数が低エネルギー側にシフトしたが、図2bで示した LH2 複合体では真逆であった。さらに、図2cのように、中赤外光照射すると、スペクトルジャンプが収まるものと、図2dのようにその逆の複合体が存在した。これは、古くから言われていたことであるが、色素分子のエネルギーランドスケープは複雑であり、同種の分子でもその状態に応じて、多彩な特徴をしめすと考えられる。

図2で観察された BChl a 分子のエネルギーランドスケープがなにに支配されているかを研究するために、図2aの BChl a 分子に対して、中赤外光の波長を掃引しながらスペクトルシフトの頻度をプロットした。得られた中赤外応答を白丸で表す (信号の標準偏差

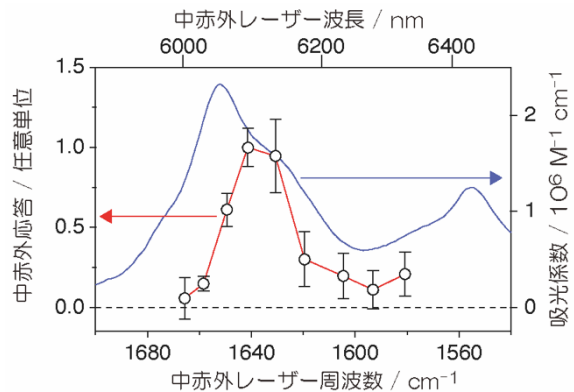


図3. 図2aに示した LH2 複合体の中赤外応答スペクトル(白丸).同じスペクトルに LH2 複体の吸収スペクトル(青曲線)をしめす.

をバーで表す)。また、参考としてLH2複合体の吸収スペクトルをしめす。それぞれのスペクトルを見ると明らかに異なっていることがわかる。中赤外応答の中心周波数は、水素結合したBChl a分子のC3アセチル基の周波数と一致した。このC3アセチル基は、LH2の β -Arg30と水素結合していることが知られている。この β -Arg30を非水素結合性のアミノ酸残基に組み替えると、クロロフィルの電子状態が低エネルギー側に 160 cm^{-1} シフトすることが知られている。ここから、我々はLH2複合体の1分子分光で観察されるスペクトルジャンプがBChl a分子のC3アセチル基と β -Arg30の水素結合状態を強く反映していると判断した。

まとめると、本研究により、タンパク質内にある色素結合サイトの水素結合状態の観察につながるような中赤外光応答を観察することに成功した。酵素の中にはフラビンタンパク質のように、蛍光性の保因子を天然状態で結合しているものも多く、この方法を応用することで、本研究の目的である「タンパク質の活性化における水素結合の役割の研究」が実行できると考えており、継続して本研究を続けていきたいと考えている。また、近年の分子生物学的な技術革新により、アミノ酸の組み換えや蛍光プローブの導入が定量的に進むようになってきている。すでに、これらの技術を持つ研究者と密な共同研究を進めており、この研究が発端となって「水素結合の1分子科学」を創造することができるかもしれない。さらに、本課題に関連する研究として多くの投稿論文を受理され、とても素晴らしい技術を世界に発信することができた[2-7]。

[1] 大友康平、出羽毅久、松下道雄、藤芳 暁、「Cryogenic Single-Molecule Fluorescence Detection of the Mid-Infrared Response of an Intrinsic Pigment in a Light-Harvesting Complex」

J. Phys. Chem. B • **127**号 • P.4959 • 2023年

[2] 神谷直輝・藏本和輝・滝島研人・湯本達也・小田春佳・志見剛・木村宏・松下道雄・藤芳 暁「Superfluid helium nanoscope insert with millimeter working range」

Rev. Sci. Instrum. • **93**号 • P. 103703 (6 page) • 2023年

[3] 近藤 徹・武藤梨沙・田邊大明・栗栖源嗣・大岡宏造・藤芳 暁・松下道雄「Energy transfer fluctuation observed by single-molecule spectroscopy of red-shifted bacteriochlorophyll in the homodimeric photosynthetic reaction center」

The Journal of Chemical Physics • **156**号 • P. 1051102 • 2022年.

[4] 石田啓太・成瀬寛太・溝内雄太・小川佳宏・松下道雄・志見 剛・木村 宏・藤芳 暁「Variable immersion microscopy with a high numerical aperture」

Optics Letters • **46**号 • P. 856-859 • 2021年

[5] 古林 琢・石田啓太・中田栄司・森井 孝・成瀬寛太・松下道雄・藤芳 暁「Cryogenic Far-Field Fluorescence Nanoscopy: Evaluation with DNA Origami」

The Journal of Physical Chemistry B • **124**号 • P. 7525-7536 • 2020年.

[6] 近藤 徹・武藤梨沙・田邊大明・栗栖源嗣・大岡宏造・藤芳 暁・松下道雄「Cryogenic Single-Molecule Spectroscopy of the Primary Electron Acceptor in the Photosynthetic Reaction Center」

The Journal of Physical Chemistry Letters • **11**号 • P. 3980-3986 • 2020年.

[7] 古林 琢・石田啓太・櫻田 啓・中田栄司・森井 孝・松下道雄・藤芳 暁「Nanometer Accuracy in Cryogenic Far-Field Localization Microscopy of Individual Molecules」

The Journal of Physical Chemistry Letters • **10** • P. 5841-5846 • 2019年.

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toru Kondo, Risa Mutoh, Shun Arai, Genji Kurisu, Hirozo Oh-oka, Satoru Fujiyoshi, and Michio Matsushita	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 J. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 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 Ishida Keita, Naruse Kanta, Mizouchi Yuta, Ogawa Yoshihiro, Matsushita Michio, Shimi Takeshi, Kimura Hiroshi, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 46
2. 論文標題 Variable immersion microscopy with a high numerical aperture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 856 ~ 856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/ol.416006	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, 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 Furubayashi Taku, Ishida Keita, Nakata Eiji, Morii Takashi, Naruse Kanta, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 124
2. 論文標題 Cryogenic Far-Field Fluorescence Nanoscopy: Evaluation with DNA Origami	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7525 ~ 7536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpccb.0c04721	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 Fujiwara Masanori, Ishii Takaki, Ishida Keita, Toratani Yasuharu, Furubayashi Taku, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 115
2. 論文標題 Aberration-corrected cryogenic objective mirror with a 0.93 numerical aperture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 033701 ~ 033701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5110546	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 Furubayashi Taku, Ishida Keita, Kashida Hiromu, Nakata Eiji, Morii Takashi, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 10
2. 論文標題 Nanometer Accuracy in Cryogenic Far-Field Localization Microscopy of Individual Molecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 5841 ~ 5846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.9b02184	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 成瀬寛太, 武藤慶, 宮崎龍也, 山口潤一郎, 松田剛, 溝内雄太, 志見剛, 木村宏, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 近赤外蛍光プローブを利用した三次元ナノスコーピー
3. 学会等名 日本物理学会2021年秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯本達也, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 波動光学による光シート顕微鏡の照射系に関する研究
3. 学会等名 日本物理学会2021年秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷直輝, 滝島研人, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 温度4 Kにおける光干渉計による試料ステージの安定化についての研究
3. 学会等名 日本物理学会2021年秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成瀬寛太、石田啓太、溝内雄太、松下道雄、志見剛、木村宏、藤芳暁
2. 発表標題 可変浸レンズ：実験とシミュレーション
3. 学会等名 分子科学会 オンライン討論
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝内雄太、成瀬寛太、松下道雄、工藤史貴、佐藤優子、木村宏、藤芳暁
2. 発表標題 反応性FRETペアによる細胞内標識
3. 学会等名 分子科学会 オンライン討論
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成瀬寛太、石田啓太、溝内雄太、松下道雄、志見剛、木村宏、藤芳暁
2. 発表標題 液中の深いところの顕微観察を可能にする可変浸レンズ
3. 学会等名 日本物理学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井啓暉, 虎谷泰靖, 藤原正規, 石田啓太, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 開口数0.93の収差補正クライオ対物鏡の開発
3. 学会等名 日本物理学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田啓太, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 高開口数蛍光顕微鏡の界面屈折に由来する収差の研究：メニスカスレンズによる収差補正
3. 学会等名 日本物理学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝島研人, 古林琢, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 温度安定化循環水によるクライオ蛍光顕微鏡のナノレベル安定化
3. 学会等名 日本物理学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古林 琢, 中田栄司, 森井孝, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 クライオ蛍光顕微鏡による分子確度イメージングの実現
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田剛、古林 琢、松下道雄、藤芳暁
2. 発表標題 三次元カメラ共焦点顕微鏡によるクライオ1分子イメージング
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝内雄太、石井啓暉、中田栄司、森井孝、藤芳暁、松下道雄
2. 発表標題 DNAオリガミを用いたクライオ超解像蛍光イメージング用色素の探索
3. 学会等名 分子科学討論会
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 分担者	伊関 峰生 (Iseki Mineo) (60414009)	東邦大学・薬学部・教授 (32661)	タンパク質の調整

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
---------	---------