

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02678

研究課題名(和文) 単一微小液滴が引き起こす光の量子効果を用いたタンパク質構造ゆらぎの一分子測定

研究課題名(英文) Single molecule measurement of protein conformational fluctuations using quantum effects of light induced by a single microdroplet

研究代表者

迫田 憲治 (Sakota, Kenji)

大阪公立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80346767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：空間捕捉された単一微小液滴が微小な光共振器として振る舞うことに注目し、液滴で生じる特徴的な現象であるwhispering gallery mode共鳴や励起光共鳴を利用することによって、液滴に溶存した分子から放出される蛍光を高感度に検出することを目指した。液滴に溶存した分子の振る舞いを観測するには長時間にわたって安定に液滴を空間捕捉する必要がある。これを実現するために、液滴捕捉のためのイオントラップとそれを設置する冷却断熱チャンバーを独自に開発した。また、この装置を用いて捕捉した液滴からの蛍光を観測したところ、既報の装置と比べて蛍光検出感度が約2桁向上していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光分光は様々な分光法のなかでも最も検出感度の高い分光法の一つであり、かつ測定対象を非破壊的に観測できる手法でもある。本研究では、空間捕捉された単一微小液滴が示す特徴的な現象である励起光共鳴を利用することによって蛍光検出感度の向上を達成した。また最近、微小液滴内の化学反応がバルク溶液中の化学反応とはかなり異なることが分かってきており、高感度「その場観測」分光の発展による微小環境の詳細分析が強く望まれている。本研究で開発した手法を化学反応の追跡に利用できれば、微小環境における化学反応の特異性が何に起因しているかを明らかにするための有用なツールになり得る。

研究成果の概要(英文)：We have focused on the fact that a levitated single microdroplet behaves as a tiny optical resonator, and have tried to detect fluorescence emitted from molecules dissolved in the droplet with high sensitivity by utilizing the characteristic phenomena of whispering gallery mode resonance and excitation light resonance that occur in droplets. In order to observe the behavior of molecules dissolved in a droplet, the droplet must be stably trapped for a long period of time. To achieve this, we newly developed an ion trap and a cooled adiabatic chamber in which the trap is installed. The fluorescence from the droplet was observed using this system, and it was found that the sensitivity of fluorescence detection was improved by about two orders of magnitude compared to the previously reported system.

研究分野：光物理化学

キーワード：微小液滴 イオントラップ 蛍光検出

1. 研究開始当初の背景

生体分子の構造ゆらぎと機能には密接な関係があることが分かりつつある。生体分子の構造ゆらぎを十分な時空間分解能で観測することは、「生体分子の柔らかさと機能」の関係を理解するための第一歩になるはずである。蛍光測定は、生体分子の構造変化を実時間で追跡できる強力な手法であり、これまでもタンパク質の構造変化(折り畳み)が蛍光励起エネルギー移動(FRET)を利用して調べられてきた。FRETは、ドナー分子とアクセプター分子の間で生じる励起エネルギー移動の効率が両者の距離に依存することを利用した「分子スケールの定規」としてよく用いられてきた実験手法であり、生体分子の構造変化をナノスケールの高い空間分解能で知ることができる。一方、FRETで実際に計測するのは蛍光であることから、蛍光をいかに高感度に検出するかが計測の成否を握っている。とくに、測定サンプルの濃度を極限まで下げた蛍光一分子測定では、一分子が単位時間に繰り返す吸収・発光サイクルの回数で検出フォトン数が決まるので、蛍光検出感度は分子の遷移モーメントの大きさに決まる限界が存在する。よって、十分な数のフォトンを検出するためには、少なくともマイクロ秒以上の積算時間が必要になり、これが測定の時間分解能を決めている。低濃度サンプルに対するFRET測定を短い時間で実現するには、何らかの方法で蛍光検出感度を向上させる必要がある。

2. 研究の目的

我々は、質量分析に用いられる三次元イオントラップ技術を応用し、独自の電極構造をもったイオントラップ(エンドキャップトラップ)を開発することによって、直径が数~数十 μm の単一微小液滴を大気中で安定に空間捕捉することに成功している。また、捕捉した液滴にレーザー顕微分光を適用することによって、液滴に溶存した分子の振る舞いを詳しく調べることが可能である。空間捕捉された単一微小液滴は微小な光共振器と見なすことができる。例えば、マイクロな微小液滴内で蛍光が生じると液滴界面で全反射が生じる結果、液滴内部にwhispering gallery mode(WGM)と呼ばれる光の定在波が形成される。微小液滴の蛍光スペクトルにはWGMに起因したシャープな発光線が強く観測される。また、外部から液滴に照射される励起光が液滴内部に閉じ込められることによって、液滴内部に励起光由来の定在波が形成されることがある(励起光共鳴と我々は呼んでいる)。この定在波が形成されることによって、液滴内部の実効的な励起光強度が大きくなる。

本研究では、イオントラップを用いて安定に空間捕捉した単一微小液滴が、微小な光共振器としてふるまうことに注目した。液滴で生じる特徴的な現象であるWGMや励起光共鳴を利用することによって、液滴に溶存した分子から放出される蛍光を高感度に検出することを目指した。

3. 研究の方法

図1に今回開発・改良した単一微小液滴捕捉・レーザー顕微分光装置の概略図を示す。エレクトロスプレーイオン化法を用いて生成した帯電微小液滴は、図中央付近にある2対のエンドキャップトラップ、もしくは平行平板型イオントラップ(4.研究成果の欄で詳述する)を用いて捕捉される。このイオントラップは、今回の研究で新たに開発した冷却断熱チャンバー(図中央付近の黄色の四角)内に設置している。帯電微小液滴を捕捉するため、イオントラップ電極には正弦波電圧が印加されている(印加周波数2000~3500 Hz, 印加電圧1000~1500 V)。液滴に照射する励起光源にはピコ秒パルスレーザー(波長532 nm)を用いている。励起光は、シングルモードファイバー、NDフィルター、偏光板を通過したのち、アクロマティックレンズを用いて液滴に集光した。対物レンズ(CFI TU Plan EPI ELWD 100X, Nikon, NA 0.8, WD 4.5 mm)を用いて液滴からの蛍光を捕集した後、無偏光ビームスプリッターで光路を2分割した。一方の光路を通った蛍光を冷却 CCD 検出器付分光器(iHR550+Symphony)に導入することで蛍光スペクトルを測定した。もう一方の光路を通った蛍光は、イメージング測定用冷却 CCD カメラ(ビットラン, BU-61M)に導入することで液滴の蛍

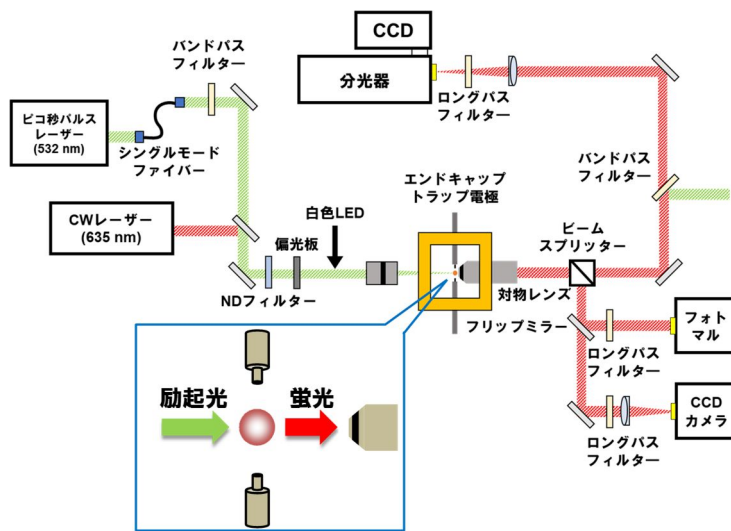


図 1. 本研究で新たに開発・改良した単一微小液滴捕捉・レーザー顕微分光装置の概略図

光は、イメージング測定用冷却 CCD カメラ(ビットラン, BU-61M)に導入することで液滴の蛍

光顕微画像を取得した。また、フリップミラーを用いて蛍光を光電子増倍管に導入し、時間相関単一光子計数法を用いることで蛍光寿命測定を行った。

4. 研究成果

(1) 微小液滴から放出される蛍光の長時間連続観測を目指した冷却断熱チャンバーの開発

エンドキャップトラップは従来使用されていた四重極イオントラップなどに比べシンプルな構造をしており、トラップの周りに遮蔽物が存在しないため、作動距離の短い高い開口数の対物レンズを液滴に近づけて高感度に蛍光測定を行うことができる。しかしながらエンドキャップトラップを用いて実験を行うと、液滴からの溶媒の蒸発が速くなる現象が観測されている。液滴からの溶媒の蒸発速度が速いと長時間にわたり安定に液滴を捕捉することができないため、液滴内部の分子の挙動を長時間にわたり観察することができない。エンドキャップトラップで液滴からの溶媒の蒸発が速くなる原因としては、電極の構造上電極と液滴の距離が近いこと、液滴が電極から何かしらの影響を受けているのではないかと考えた。よって本研究では、既報の平行平板型イオントラップをもとに電極構造を工夫し、独自の平行平板型イオントラップを新たに作製した。

図2に新たに作製した平行平板型イオントラップの写真を示す。トラップは三個の特徴的な電極からなり、両端が Endcap 電極、中央の箱型の電極が Ring 電極である。Ring 電極に数百 Hz の変調電圧を印加することで捕捉電場を形成する。捕捉した液滴に Ring 電極に空けた穴から励起光を当て、励起光と直交方向に設置した対物レンズを用いて液滴からの蛍光を捕集する。我々が以前使用していた平行平板型イオントラップは Endcap 電極に空けた穴の大きさが 2 mm と小さく、光の検出効率が低かった。そこで新たに作製したトラップでは穴の大きさを 8 mm にすることで光捕集の立体角を大きくし、光の検出効率を 38 倍に高めた。また電極の厚みを 2 mm から 1 mm にすることで、より対物レンズを液滴に近づけて蛍光測定を行えるようにした。しかし、今回設計した電極を用いて液滴が安定に捕捉できるかは自明ではない。そこで電場解析を行うことで液滴が安定に捕捉されるか調査した。Ring 電極にあける穴の大きさに対して捕捉力をプロットすると穴の大きさが 7 mm のときに捕捉力が最大になった。一方、Endcap 電極に空いた穴の大きさと電場の漏れ出しが大きくなり、対物レンズを近づけたときに中心の電場が乱されて液滴を安定に捕捉することができない。これらの条件を考慮して電極構造を決定した。

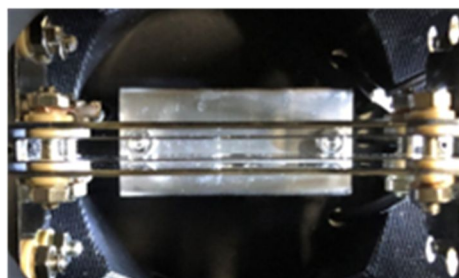


図 2. 今回開発した平行平板型イオントラップの写真

また、液滴からの溶媒の蒸発を抑えるには、周囲の温度を低く保つことが有効であると考え、平行平板型イオントラップを設置するための冷却断熱チャンバーを製作した(図3)。このチャンバーは壁が二重構造になっており、壁の間に断熱材を充填することで断熱性を高めている。また、チャンバー底部に冷却液が循環するようになっており、これによってチャンバー内部を冷却できる。

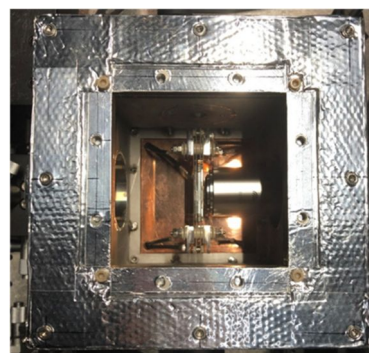


図 3. 今回開発した冷却断熱チャンバーの写真

断熱チャンバーの温度を下げたときに液滴からの溶媒の蒸発がどの程度抑えられるかを調べたところ、チャンバー内が室温のとき、液滴の体積は 10 分間で約 70% 減少したが、チャンバーを冷却することによって、体積減少率が 4% 程度まで縮小した。つまり、これまでの装置と比べ、18 倍程度の長時間にわたって液滴を安定に捕捉することに成功した。

(2) 微小液滴に溶存した色素分子から放出される蛍光の高感度計測

空間捕捉した単一微小液滴に溶存した Kiton Red (KR) の蛍光スペクトルを図 4a および b に示す。この液滴は上述した平行平板型イオントラップおよび冷却断熱チャンバーを用いて捕捉した。図 4a および b の蛍光スペクトルは同じ液滴を用いて測定しているが、両者は測定時間が異なっており、図 4a は液滴捕捉直後に測定したもので、図 4b は液滴捕捉から約 800 秒後のものである。図 4a と図 4b の蛍光強度を比較すると明らかに図 4b の方が大きくなっている。今回の研究では冷却断熱チャンバーを用いているため、液滴からの溶媒の蒸発は遅くなっている。しかしながら、完全に溶媒の蒸発を抑制できていたわけではなく、時間経過に伴って徐々に溶媒が蒸発することによって、液滴の大きさが小さくなっている。液滴捕捉直後から 1 秒毎に蛍光スペクトルを連続測定し、蛍光スペクトルの積分強度を時間に対してプロットした(図 4c)。蛍光強度はある特定の時間で明らかに増大している(図 4c では 200 秒と 800 秒付近)。これは、液滴から溶媒が蒸発し、液滴径が徐々に減少していった結果、ある特定の直径になったところで外部からの励起光が液滴内部に閉じ込められ、液滴内部の実効的な励起光強度が増大したことを意味してい

ることがわかった。我々が今回製作した装置は、過去に報告されている類似の装置と比べて、蛍光捕集効率が約 38 倍向上している。それに加えて、図 4 に例示しているような励起光共鳴に起因する蛍光増強効果を積極的に利用することで、蛍光検出効率は過去の報告と比べて約 2 桁向上している（図 3b の場合は約 190 倍）。

単一微小液滴を長時間にわたり安定に空間捕捉するための装置を独自に開発し、それを用いて色素分子からの蛍光を測定することで、微小液滴が

光共振器として振る舞う際の特徴的な現象である励起光共鳴を明確に観測することに成功した。また、励起光共鳴を用いることで蛍光検出効率が既報の装置に比べて約 2 桁向上することを明らかにした。本報告書には KR の例のみを報告したが、ローダミン B (RhB) や RhB を含む両親媒性分子、ナイルレッド、量子ドットなどでも励起光共鳴を利用した蛍光の高感度観測に成功している。一方、現状では液滴内に溶存した色素分子を少なくとも数百個程度励起しなければ液滴からの蛍光を観測することが難しく、液滴に溶存した単一分子の検出には至っていない。単一分子の検出を達成するには更なる感度向上が必要であり、液滴が示す励起光共鳴に加えて、WGM 共鳴も同時に利用することによって感度向上を図る必要があると考えている。

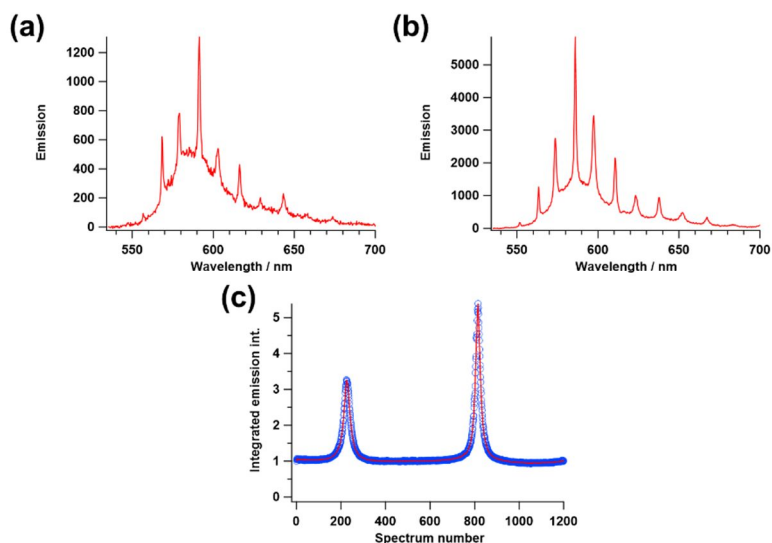


図 3. (a) 液滴捕捉直後の KR からの蛍光スペクトル (b) 液滴捕捉から約 800 秒後の蛍光スペクトル (c) 蛍光スペクトルを連続測定した際の蛍光強度の時間変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Mio Harada, Shunsuke Yamamoto, Tomoyuki Yatsuhashi, Kenji Sakota	4. 巻 536
2. 論文標題 Cooperative dissociation of J-aggregates into monomers in the 2isobutoxyethanol/water binary solvent with the lower critical solution temperature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 110817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemphys.2020.110817	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 迫田憲治	4. 巻 70
2. 論文標題 エンドキャプトラップを用いた単一微小液滴顕微分光装置の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 分光研究	6. 最初と最後の頁 19-22
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 亀井航汰, 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 単一微小液滴で生じる分子配向に起因する蛍光増強の観測
3. 学会等名 分子科学会オンライン討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白山拓実, 原田美緒, 三宅宏典, 中島洋, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 リボソームに内包されたタンパク質の構造安定性および空間分布に関する蛍光イメージング評価
3. 学会等名 分子科学会オンライン討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀井航汰, 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 光閉じ込め効果を用いた単一微小液滴における分子配向効果の観測
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口昌起, 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 平行平板型イオントラップとエンドキャップトラップの性能比較
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Noguchi, Motoya Sano, Tomoyuki Yatsuhashi, Kenji Sakota
2. 発表標題 Performance comparison with a parallel plate iontrap and an endcap iontrap
3. 学会等名 International Workshop on Quantum Sensing & Biophotonics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口昌起, 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 改良型平行平板型イオントラップの作製及び性能評価
3. 学会等名 OCU先端光化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 Fluorescence enhancement caused by the excitation light confinement in a single microdroplet
3. 学会等名 Manchester International Symposium: Highly-excited States and Non-covalent Interactions (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 The cavity mode dependent confinement of excitation light in a single levitated microdroplet
3. 学会等名 The 23th East Asian Workshop on Chemical Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 Microscopy of a single levitated microdroplet for biomolecular applications
3. 学会等名 13th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (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

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