

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301
研究種目：挑戦的研究(萌芽)
研究期間：2020～2021
課題番号：20K21166
研究課題名(和文)一分子蛍光による生体分子のダイナミクス解明に資する全光子タイムタグ計測法の確立

研究課題名(英文)Development of all photon time-tag detection method for the fluorescence investigations of single molecules

研究代表者
高橋 聡 (Takahashi, Satoshi)
東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30283641
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光の強度ゆらぎを観測する蛍光相関分光法は、タンパク質の高速ダイナミクスを解明する有用な手法である。本研究では、ハイブリッド光検出器(HPD)とデジタル型計数ボードを組み合わせた全光子time-tag測定法を開発し、蛍光相関を高精度で検出することを目的とした。装置開発の結果得られた相関データには多数のスパイク状のノイズが見られた。このノイズは、HPDが示すアフターパルスに由来することを突き止め、相関データからノイズをキャンセルすることに成功した。以上の努力により、従来法では一晩以上の必要だったデータの積算時間が短縮され、一時間程度の測定で10ナノ秒以降の蛍光相関の測定が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
タンパク質の高速のダイナミクスを調べることで、タンパク質の運動を正確に理解し、生物がどのような方法で精密な酵素反応や特定の相手との相互作用を可能にしているのかを理解することができる。本研究成果は、そのための新しい効率的な計測方法を提案するものである。本測定方法を用いることで、従来は10時間程度の長時間のデータの積算が必要だった計測が、一時間程度のデータ積算で可能になることが示された。また、従来方法に比べてS/Nの良いデータを得ることが可能になった。この手法をタンパク質などの生体分子に適用することで、酵素反応などを正しく理解し応用することが可能になると予想される。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a powerful method for the elucidation of fast protein dynamics. In this investigation, we aim to develop "all photon time-tag detection strategy" for FCS by combining hybrid photodetector (HPD) and digitized fast photon counting board. We noticed that the correlation data obtained by the newly constructed system were affected by the spike shaped noises due to the afterpulsing effect of HPD. We found a way to eliminate the noises in the correlation data, and were successful in observing the FCS data down to the 10 ns time region within an hour, which was a significant reduction in the observation time compared to the conventional system that required more than 10 hours of data accumulation.

研究分野：生物物理学

キーワード：高速蛍光相関分光法 全光子time-tag測定法 蛋白質ダイナミクス ハイブリッド光検出器

1. 研究開始当初の背景

一分子蛍光分光法は、タンパク質の機能や特性を調べる強力な手段である。特に、タンパク質にドナー色素とアクセプター色素をラベルし、色素間距離の変動の時定数を観測する高速蛍光相関分光法は、ナノ秒からマイクロ秒に至る時間領域におけるダイナミクス情報を得る手法として、さまざまな試料への応用がなされてきた。しかし、従来の測定方法の蛍光検出効率には限界があり、これまでの実験データでは単一指数関数的な変化のみが観察され、タンパク質が示すはずの複雑なダイナミクスは報告されていない。これは、従来の測定法の蛍光検出効率が悪く、S/N が十分に良いデータが得られないことが原因だと考えられる。

従来法の検出方法は、1954年に天文学者である Hambury-Brown と Twiss により提案された実験手法を基にしており、連続する二個の蛍光光子をビームスプリッタにより分離し、二個のアバランチ光ダイオード (SPAD) を用いて検出し、二光子間の時間間隔を時間相関単一光子計数 (TCSPC) ボードにて計時する手法が用いられる。得られた光子間隔ヒストグラムから蛍光強度の変動の自己相関関数を計算する。この手法は天文学、物性物理学、分光学など多くの研究分野にて用いられる大変安定した測定方法であるけれども、ビームスプリッタを用いるために、連続する二つの蛍光光子が「たまたま」別の検出器に選別される確率 (すなわち 25%) でしか観察ができないこと、TCSPC ボードの不感時間が 100ns と長いこと、SPAD がアフターパルスと呼ばれる偽信号を出力する間 (1 μ s 程度) が不感時間となることなど数々の問題があり、蛍光光子の多数の数え落としがあった。

以上の測定の非効率性のために、タンパク質における高速蛍光相関分光法のデータの測定は長時間の積算が必須であった。典型的には、試料を設置して一晩などのデータの積算が必要であり、生物試料はその間に变性するなどの困難があった。

2. 研究の目的

本研究では、新しい光検出器と新しいデータ計測ボードを組み合わせることで、高速蛍光相関測定の効率を大きく向上させることを目的とする。さらには、新しく提案する計測方法に付随する問題点などを検討し、タンパク質試料における高速蛍光相関観察の方法論を確立する。

3. 研究の方法

本研究では、従来法と原理の異なる全光子 time-tag 測定を以下の技術により可能とする。第一に、ハイブリッド光検出器 (HPD) を採用する。HPD はアフターパルスを持たない新しい光検出器であり、マイクロ秒に近いアフターパルスを持つ SPAD と異なり、短時間内に多数の光子検出が可能である。第二に、デジタル型高速光子計数ボードを導入する。このボードは不感時間が 10ns 以内と短いため、高い繰り返し速度にて、一光子ごとに観測時間を記録する time-tag 計測が可能である。これにより、10ns 以降の時間領域におけるダイナミクスが高効率で検出可能となる。これらの技術革新の結果、蛍光光子の計数効率を格段に向上させる。さらには、本手法を用いてタンパク質試料の高速蛍光相関の観察を行う。

4. 研究成果

初年度 (半年間) の研究において HPD とデジタル型高速光子計数ボードを購入し、データ解析に必要なソフトウェアを導入した。さらに、すでに構築していた共焦点蛍光顕微鏡光学系に HPD を組み込み、蛍光相関データの取得を可能にした。

組み立てた装置を使ってローダミンなどの予備的なデータを取得したところ、100 ナノ秒以降の時間領域において大変効率的に蛍光自己相関データを取得できることを見出した。従来法では数マイクロ秒程度の時間領域まで、SPAD のアフターパルスに由来するノイズが重なったことに比べ、劇的な時間分解能の向上を達成できた。

一方で、装置として目指していた 10 ナノ秒から 100 ナノ秒に由来する手法では、多数のスパイク状のノイズが観察されることに気づいた。このノイズの由来について検討を行った。ノイズの可能性として、信号回路のインピーダンスマッチングが不十分であることに由来する反射ノイズを第一に疑ったが、検出器および、プリアンプ信号を測定した結果、この可能性は低いことを確認した。その上で、HPD の開発および製造メーカーである浜松ホトニクスと議論を繰り返した結果、このノイズは HPD に固有であり、HPD に光子が入射した際に、主信号として出力されるパルス信号に遅れて、スパイク状の副信号が出力されることが判明した。この副信号は、HPD の素子内部に光子が入射した際に副次的に発生するイオンに由来し、現在のところ完全に抑制することが難しいこと、さらに、このノイズが発生する確率は 0.1% 程度であり、HPD の個体ごとに出現位置や確率が異なることも判明した。このように、メーカーのカタログに記載されない低確率のノイズイベントが、蛍光相関信号に大きな影響を与えることを、装置を構築して初めて見出した。

このノイズを完全に抑制することが難しいことが判明したため、検出器が副信号を出力する場合に相関データが受ける影響を見積もる理論式を導出した。得られる信号は、本来の信号に検出器ノイズが重畳したコンボリューションで表現できる。このとき、ノイズの発生が 0.1% という

低確率のイベントであることにより理論式は簡略化可能であり、試料の蛍光相関データを取得したのちに、相関信号を持たない光源を用いて検出器ノイズだけを観察し、それぞれの自己相関データの差を計算することで試料に由来する相関を算出できることを導出した。さらには、この方法によりノイズをキャンセルする場合に、実的にどの程度のSN比で計測が可能になるかどうかを検討し、一分子の蛍光色素が 10^4 photons/s 以上の速度で蛍光光子を発生させる条件で実験を行うと、実用的な計測ができると予想した。

上記の検討をもとに、実際に試料とセルの散乱光を測定し、蛍光試料の相関データからノイズ信号をキャンセルできることを確認した。セルの散乱光は蛍光色素に由来する光子と異なり、ナノ秒以上の長時間の相関を持たないため、ノイズのリファレンスとして最適であった。さらには、メーカー側の配慮でノイズの少ない HPD 個体をセレクトして新たに購入し、ノイズの大きかった HPD と交換した。

以上の改善により、従来の測定方法では数時間以上必要だったデータの積算時間が短縮され、1 時間程度のデータの積算で、10 ナノ秒以降の蛍光相関の測定が可能になった。また、開発当初は予想しなかったが、蛍光色素の示すアンチバンチング信号も検出された。これは、実験装置のスペック以上の時間分解能を本装置が達成している可能性を示している。このように、実験を計画していた当初は想定しなかった驚くほどの測定効率を保つ新しい実験装置を開発することに成功した。本測定方法を現在投稿論文としてまとめている。

以上の装置開発と並行して、タンパク質試料の高速蛍光相関を計測する実験を進めた。ポリアラニン鎖にドナー色素とアクセプター色素を修飾した試料を用意し、一分子蛍光観察を行った。その結果、ドナー色素の蛍光強度揺らぎにおいて、数十ナノ秒の時定数を持つ運動を観測することができた。この運動は、ポリアラニン鎖のヘリックスコイル転移による可能性がある。しかし、ドナー色素とアクセプター色素の強度揺らぎの反相関が観測されなかった。また、溶液の粘度依存性を調べたが、顕著な依存性が観察されなかった。このため、ドナー色素の強度揺らぎとして観測された運動は、二つの色素間の距離揺らぎでは解釈できない可能性があることが示唆された。このほか、Protein A の B ドメインについて、蛍光相関測定を精力的に進めた。

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Satoshi, Nambu Shusuke, Matsui Toshitaka, Fujii Hiroshi, Ishikawa Haruto, Mizutani Yasuhisa, Tsumoto Kouhei, Ikeda-Saito Masao	4. 巻 59
2. 論文標題 Unique Electronic Structures of the Highly Ruffled Hemes in Heme-Degrading Enzymes of <i>Staphylococcus aureus</i> , IsdG and IsdI, by Resonance Raman and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3918 ~ 3928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00731	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 Rajendran Divya, Mitra Shrutarshi, Oikawa Hiroyuki, Madhurima Kulkarni, Sekhar Ashok, Takahashi Satoshi, Naganathan Athi N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Quantification of Entropic Excluded Volume Effects Driving Crowding-Induced Collapse and Folding of a Disordered Protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 3112 ~ 3120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.2c00316	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 聡
2. 発表標題 タンパク質のフォールディング研究：物性研究と生命研究の境界
3. 学会等名 東北大学生命科学研究科主催「勉強会：それ、生命に聴いてみよう！」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kimura, M.; Nakano, S.; Takahashi, Y.; Oikawa, H.; Takahashi, S.
2. 発表標題 Conformational properties of the intrinsically-disordered RGG domain of LAF-1 detected by single-molecule fluorescence spectroscopy
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会（オンライン）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村美智子, 中野沙耶, 高橋泰人, 小井川浩之, 高橋 聡
2. 発表標題 天然変性タンパク質 LAF-1 RGGドメインの一分子蛍光分光測定による構造特性評価
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 Shrutarshi Mitra, Hiroyuki Oikawa, Divya Rajendran, Athi N. Naganathan, Satoshi Takahashi
2. 発表標題 Conformational dynamics of E. coli Cytidine Repressor DNA Binding domain studied by Single-molecule Fluorescence Spectroscopy
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 聡
2. 発表標題 一分子蛍光分光法を用いた生体高分子の構造形成
3. 学会等名 「物質階層原理研究」&「ヘテロ界面研究」合同研究会（招待講演）
4. 発表年 2021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			
インド	Indian Institute of Technology Madras			