

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：63903

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18203

研究課題名（和文）揺らぐ単一光応答性タンパク質の超高速分光

研究課題名（英文）Ultrafast spectroscopy of single photoresponsive proteins under fluctuation

研究代表者

倉持 光（Kuramochi, Hikaru）

分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・准教授

研究者番号：40709367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：これまで独立に発展してきた先端的な線形・非線形分光法と単一分子分光法のコンセプトを融合させた新しい分光手法の開拓を推進した。高繰り返し率の超広帯域極短パルス光源を構築し、単一分子検出感度で室温溶液中にある分子の励起スペクトルを取得し、その自発的な揺らぎを観測する新しい方法論を開発した。単一分子レベルで光応答性タンパク質の超高速ダイナミクスとその揺らぎを観測する端緒を開いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の分光法では、一般的には大多数の分子の集団に対して測定が行われるため、得られる情報はそれらの平均に対応していた。しかし実際には、室温・溶液中などで光応答性タンパク質のような巨大な分子の構造は常に揺らいでいるため、平均として得られる情報が分子本来の特性とどのように結びついているのかは自明ではなかった。本研究では、こうした従来の“平均を観る”分光法から得られるデータに隠れていた、個々の分子本来の情報を炙り出す新規な方法論を新たに開拓したという点において、高い学術的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：The project promoted the development of a new spectroscopic technique that combines the concepts of advanced linear and non-linear spectroscopy and single-molecule spectroscopy, which have been independently developed until now. A new methodology was developed to obtain excitation spectra of molecules in solution at room temperature with single-molecule detection sensitivity and to observe their spontaneous fluctuations by constructing an ultra-broadband ultrashort pulse light source with a high repetition rate. A technical basis for observing the ultrafast dynamics of photoresponsive proteins and their fluctuations at the single-molecule level was established.

研究分野：物理化学

キーワード：超高速分光 単一分子分光 光応答性タンパク質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

光応答性タンパク質の光反応初期過程は、これまでに様々な時間分解分光法を用いて研究されてきた。その時間分解能はレーザー光技術の発展とともに徐々に向上しフェムト秒領域にまで達し、近年では振動分光法や X 線回折を組み合わせることでフェムト秒スケールで進む構造変化をも実時間追跡することが可能になってきた。一方で、これら既存の時間分解分光法は大多数の分子からなるアンサンブルの“平均像”しか観ることができないという問題を抱えている。常温・凝縮相において分子の置かれている環境・その構造は熱的に揺らいでおり、こうした揺らぎは個々の分子の性質に多大な影響を及ぼす。特に、タンパク質のような巨大生体分子は分子を取り囲む周辺溶媒分子などの速い揺らぎのみならず、分子内の残基の配向揺らぎや、マイクロ秒からミリ秒にも渡る遅い時間スケールでの高次構造揺らぎを示すため、内包分子の局所化学反応の性質はその揺らぎとともに著しく変化すると考えられる。こうした遅い大きな揺らぎと局所化学反応の連関は様々な複雑生体分子の反応における重要な一般問題であり、注目を集めている。こうした熱的な揺らぎの下では瞬間瞬間において全ての分子は同一のものとみなすことはできないが、従来の時間分解計測法は大多数の分子のアンサンブル平均の情報しか得ることができない。こうした揺動する分子の“個性”を反映した個々の分子本来の反応性を明らかにし、その多様性の起源を解明することは、光応答性タンパク質のみならず、凝縮相複雑分子系の化学反応の機構を理解するために必須であり、現代の化学反応研究の最重要課題の一つである。

2. 研究の目的

光応答性タンパク質の“速い”局所的な化学反応はこれまで各種時間分解分光法で、一方“遅い”大きな揺らぎは単一分子計測でそれぞれ独立に研究されてきた。性質が大きく異なるこれら2つの運動がどのように連関し光応答性タンパク質の精緻な反応・機能の制御機構として働いているのかを実験的に検証する術はこれまでになかった。これらの問いに答えるためには、単一分子レベルでの超高速時間分解分光を実現することにより、常温・溶液中において揺らいでいるタンパク質分子一つ一つの個性を反映した反応ダイナミクスとその時間変遷を直接観測することが必要不可欠である。これを世界に先駆け実現することが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

反応ダイナミクス計測において最も一般的かつ広く用いられる時間分解吸収分光法では、分子の光吸収に伴う透過光強度の変化を検出する。そのため、単一分子の吸収断面積を考慮すると単一分子検出感度を達成することは極めて困難である。そこで、本研究では蛍光をプローブとした時間分解分光装置を開発し、遅い揺らぎとともに変遷する常温・溶液中にある光応答性タンパク質の反応ダイナミクスを直接観測する。単一光子計数法に基づいた蛍光測定は単一分子検出に十分な感度を有し、実際に生物物理分野における単一分子計測の基盤となっている。この技術と超高速分光を融合・発展させることで単一分子レベルでの超高速分光測定を実現する。

4. 研究成果

【波長可変高繰り返し極短パルス光源の開発】

新たに導入した高出力高繰り返し Yb 添加ファイバーレーザー増幅器をベースとする極短パルス光源の開発を行った。ファイバーレーザーの出力をバルク非線形光学媒質に集光し自己位相変調により発生させた広帯域光を増幅し、パルス整形することによる極短パルス光発生に取り組んだ。自己位相変調に基づく波長変換は超短パルス発生の基本的な技術であり広く用いられてきたが、従来の研究はほぼ全て kHz レーザーをベースとして

おり、MHz クラスのレーザーにおいては高い平均出力に起因する光学素子の損傷により、ほとんど未開拓であった。われわれは、可能な限り高い繰り返し周波数で、高い安定性を有する極短パルス光を発生させる条件探索に取り組んだ。具体的には、様々なバルク媒質について損傷閾値などを検証し、さらに媒質の厚み、集光条件、冷却条件について吟味した。結果、10 MHz の繰り返し周波数で出力揺らぎ 0.3% rms の高安定広帯域パルス光を得ることに成功した。この出力をプリズム、チャープミラー対とパルス整形器を用いた分散補償光学系に通すことで、500-950 nm で波長可変な <10 fs パルス (最短 6 fs) 光を得た (図 1a, b)。

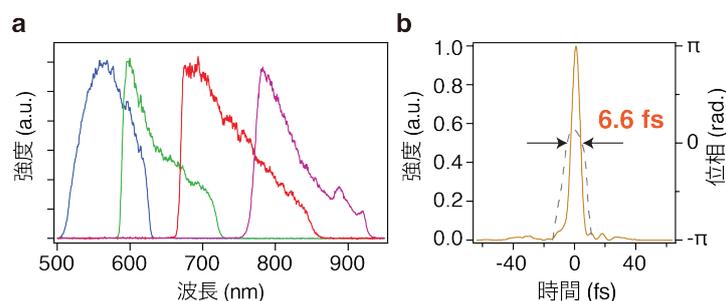


図 1 (a) 光源出力の典型的なスペクトル。いずれのスペクトルもフーリエ限界時間幅は <10 fs である。(b) Frequency-resolved optical gating (FROG) 測定から得られた圧縮後のパルスの典型的な時間および位相波形。

【共焦点顕微（時間分解）分光装置の開発】

高繰り返し極短パルス光源をベースに、単一分子レベルでの超高速分光のプラットフォームとなる共焦点蛍光顕微鏡の開発を行った。図 2a に示すように、高繰り返し極短パルス光を対物レンズにより溶液試料に集光し、試料から発せられる蛍光を時間相関単一光子計数法 (TCSPC) により検出した。TCSPC では一般的にアバランシェフォトダイオード (APD) が検出器として用いられるが、この場合、APD 特有のアーティファクト信号(アフターパルス)

により揺らぎを観る自己相関測定には2台の APD が必要となり、煩雑性が増し光子検出効率も悪くなる。そこで、検出器には冷却ハイブリッド型 GaAsP 検出器 (HyD) を用いた。以上のようにして構築した共焦点蛍光顕微鏡を用い、TCSPC により希薄典型色素溶液の蛍光寿命測定と蛍光相関分光測定を行い、視野内平均分子数 <math>< 1</math> の条件で蛍光寿命計測ができていること、すなわち単一分子検出感度を有する共焦点蛍光顕微鏡が構築できていることを確認した(図 2b)。さらに、この共焦点蛍光顕微鏡にプローブ光を導入する光学系を実装し、時間分解顕微分光装置とした。

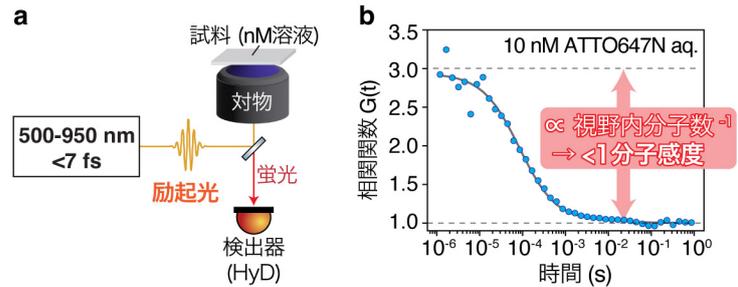


図 2 (a) 単一分子分光を行うための共焦点蛍光顕微鏡の概略図。 (b) 共焦点蛍光顕微鏡を用いた希薄色素溶液の蛍光相関分光。相関関数の振幅は視野内の平均分子数の逆数に対応し、単一分子検出感度が実現できていることを示している。

【単一分子レベルでの励起発光分光法の開発】

基底状態分子の電子状態の揺らぎ(励起エネルギー揺らぎ)を観測するための、単一分子レベルでの励起発光分光法の開発を行った。その装置の概略図を図 3a に示す。独自に開発した高繰り返し極短パルス光を複屈折性媒質 α -BBO で作られたウェッジペアから成る同軸光路干渉計に導入することで、アト秒精度の位相安定性 (<math>< 780</math>, ~ 3 as) を有するパルス対を発生させた。このパルス対を励起光として用い、パルス間の遅延時間を掃引しながら分子が発する蛍光を検出し、この信号をフーリエ解析することにより、蛍光励起スペクトルを得た(図 3b)。典型色素に対して得られた励起スペクトルは、バルク溶液に対して得られた蛍光励起スペクトルや吸収スペクトルと良い一致を示しており、広帯域極短パルスを用いた蛍光検出に基づくフーリエ分光によって励起スペクトルが得られることを実証した。また、得られた光子列の相関解析から単一分子検出感度が達成できていることが確認され、室温・溶液中で、単一分子検出感度をもって電子状態の情報(励起スペクトル)と、その揺らぎに関する情報(自己相関関数)を取得する方法論を確立した。また、この様にして得られる励起スペクトルが時間とともにどのように変化していくか、すなわちスペクトル拡散を、マイクロ～ミリ秒スケールで観測するための新しい方法論を開発した。

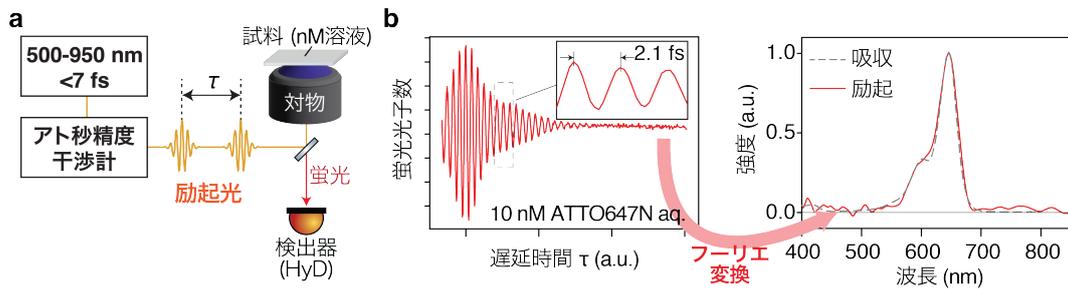


図 3 (a) 単一分子レベルでの励起発光分光装置の概略図。 (b) パルス間の遅延時間 τ を掃引しながら得られる蛍光インターフェログラム。蛍光インターフェログラムのフーリエ変換により得られた蛍光励起スペクトルはバルク溶液の吸収スペクトルと良く一致しており、室温・溶液中において単一分子検出感度での電子スペクトル計測が達成できていることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 米田勇祐, 倉持 光
2. 発表標題 室温・溶液中における単一分子レベルの発光励起分光
3. 学会等名 第17回分子科学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉持 光
2. 発表標題 数サイクルパルスを用いた複雑分子系の極限時間分解分光
3. 学会等名 自然科学研究機構先端光科学研究分野プロジェクト研究会 「放射光の量子性・干渉性に基づく革新的計測手法の探索」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hikaru Kuramochi
2. 発表標題 Tracking chemical reaction dynamics by ultrafast nonlinear spectroscopy using few-cycle pulses.
3. 学会等名 Japanese-Canadian Frontiers of Science (JCFoS) Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------