

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14651

研究課題名(和文) 蛍光検出振動分光によるタンパク質発色団構造揺らぎダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Elucidation of fluctuation dynamics of chromophore structure in protein by fluorescence detected vibrational spectroscopy

研究代表者

米田 勇祐 (Yoneda, Yusuke)

分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・助教

研究者番号：60903721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：単一分子分光法は個々の分子の物理的特性を研究するための強力な方法であるが、様々な化学的および生物学的過程が進行する室温溶液中で分子の高速な揺らぎダイナミクスを解明することは困難である。この研究では、励起スペクトルの自発的揺らぎを観測することのできる、室温溶液中のフーリエ変換に基づく蛍光励起相関分光法を開発した。この方法を用いることで、蛍光色素 ATT0647N の蛍光励起スペクトルを単一分子レベルで測定することに成功した。さらに、励起波長分解した蛍光自己相関関数がマイクロ秒からミリ秒の範囲で得られ、色素の拡散に対応する相関関数の減衰を捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光相関分光法(FCS)は、凝縮相における単一分子レベルの光子統計の揺らぎを検出することで、分子の拡散や反応過程を明らかにすることのできる手法であり、蛍光強度や寿命に基づいた解析によってナノ秒からマイクロ秒で進行するタンパク質の構造揺らぎが明らかにされてきた。一方で、こうした揺らぎは電子・振動スペクトルにも反映されることが予測されるが、既存の手法ではこれらの相関を捉えることは困難であった。今回我々が開発した新規手法では、励起波長分解した蛍光自己相関関数の測定に成功した。

研究成果の概要(英文)：This work demonstrated Fourier transform-based fluorescence excitation correlation spectroscopy (FECS) of room-temperature solutions, which can observe spontaneous fluctuation of the excitation spectrum. The method enabled us to measure the fluorescence excitation spectrum of a fluorescent dye at the single molecule level. Furthermore, this method succeeded in obtaining excitation-resolved fluorescence autocorrelation functions in the microsecond to millisecond range.

研究分野：物理化学

キーワード：単一分子分光 蛍光相関分光法 光応答性タンパク質 振動分光 構造ダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は光や熱などの周囲環境に応じて構造を絶えず変化させ、機能を発現させている。中でも光応答性タンパク質は、発色団分子の構造変化によって機能を発現すると考えられているものが多く存在する。例えば、光合成生物は一日中揺らぐ太陽光強度の中で(Fig. 1a)、強い光の条件下では余剰エネルギーを消光し、一重項酸素の発生を抑制する保護機構をもつことが知られている(A. V. Ruban, *Plant Physiol.*, **2016**, *170*, 1903)。この非光化学的消光においては、クロロフィルやカロテノイド等の発色団分子の配向・構造変化が重要であると考えられている(Fig. 1b)。しかし、こういった変化は統計的平衡に存在する化学種の間でマイクロ秒～ミリ秒といった高速な時間で進行すると予想されるため、具体的にどのような構造を持つ種がどのようなタイムスケールで変化するかを明らかにすることは難しい。光応答性タンパク質の周囲環境に適応する機能発現メカニズムを理解するためには「周囲環境に応じてタンパク質中の発色団分子がどのようなタイムスケールで変化するか」を明らかにする必要がある。

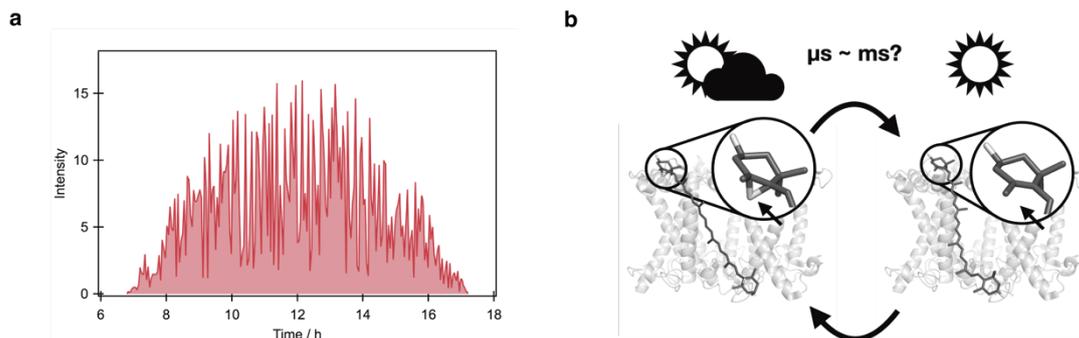


Fig. 1. (a) 日中の太陽光強度の時間変化。(b) 環境に応じたタンパク質色素構造変化。

2. 研究の目的

タンパク質中の発色団分子の構造揺らぎダイナミクスを明らかにするために、蛍光検出赤外相関分光法(Fluorescence-detected InFRared Correlation Spectroscopy, FIRCS)を開発することを目的とした。FIRCSは近年急速に発展している振動分光法の1つであり、最近では単一分子レベルの検出感度を持った装置も開発されている(L. Whaley-Mayda, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*, 3060)。この手法は赤外・可視パルスを用いた2段階励起による共鳴条件を利用することによって系の振動スペクトルを観測することのできる実験であり、タンパク質中の発色団選択的な検出も行うことができる。さらに、原理的には単一分子レベルの光子統計の相関を解析することで、系の揺らぎダイナミクスを明らかにすることができるが(Fig. 2)、スペクトル分解した相関関数の取得には至っていない。本研究ではタンパク質発色団構造揺らぎダイナミクスを明らかにすることを大きな目標とし、新規蛍光検出スペクトル相関分光手法を開発することを目的としていた。研究期間においては、その最初段階として、可視のパルス対を用いた蛍光励起スペクトル相関分光(Fluorescence Excitation Correlation Spectroscopy, FECS)の開発を行い、スペクトル分解した蛍光相関関数の取得に成功した。

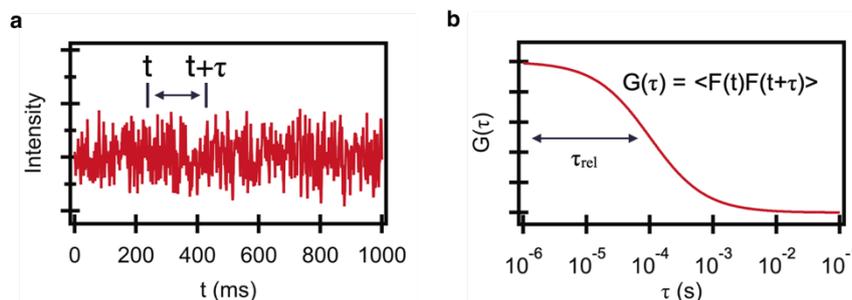


Fig. 2. (a) 蛍光強度の時間揺らぎ。(b) 揺らぎを解析して得られる相関関数。

3. 研究の方法

FECSの概念図をFig. 3aに示す。FECSは2つの広帯域可視パルス光を用いて試料を光励起し、放出される蛍光強度をパルス間の相対遅延の時間差の関数として記録する。2つの広帯域パルスの相対遅延はフリッジパターンとしてスペクトル領域に反映される。このパルス対によってサンプルを光励起すると、その蛍光強度は、レーザーのスペクトルと試料の吸収スペクトルの重なりに比例する。したがって、パルス対の時間差の関数として蛍光強度を取得すると、時間領域の干渉パターンが得られる。こうして得られる時間領域で振動する信号をフーリエ変換(FT)

することで、蛍光励起スペクトルに関する情報を得ることができる。さらに、単一分子レベルの光子統計の相関を解析することによって、アンサンブル測定では埋もれてしまう揺らぎダイナミクスを明らかにすることができる。

FECS 装置のブロックダイアグラムを Fig. 3b に示す。光源は Yb ファイバーレーザーであり、基本波を自己位相変調(Self Phase Modulation, SPM)により広帯域パルスに変換し、これを励起光源として用いた。広帯域パルスは複屈折性のウェッジ結晶を用いた共通光路干渉系(Translating-Wedge-Based Identical Pulses eNcoding System, TWINS)に導かれ、パルス対を生成し、結晶の挿入量 x を調整することで、相対遅延をアト秒レベルで制御した (J. Réhault, *et al.*, *Rev. Sci. Instrum.*, **2014**, *85*, 123107)。このパルス対を、ショートパスフィルター(Short Pass Filter, SPF)によって長波長成分を取り除いた後、対物レンズを用いて試料に照射した。試料からの蛍光はロングパスフィルター(Long Pass Filter, LPF)で励起光の散乱を除去し、共焦点配置を利用し、Hybrid Photo Detector (HPD)と TCSPC モジュールによって検出された。検出された光子データは、パルス対の時間差に対応するウェッジ結晶の位置 x 、実験開始からの経過時間 T 、パルス励起後の検出時間 t の関数 $I(x, T, t)$ として記録された。結晶の位置 x に関してフーリエ変換することで得られる任意の周波数軸は、別途行った周波数分解した自己相関測定によって得られた校正曲線により波長 $\lambda_{exc.}$ に変換した。相関の解析には規格化された相関関数 $G_{norm}(\Delta T) = \langle I(T)I(T+\Delta T) \rangle / \langle I(T) \rangle \langle I(T+\Delta T) \rangle$ または規格化されていない相関関数 $G(\Delta T) = \langle I(T)I(T+\Delta T) \rangle$ を用いた。

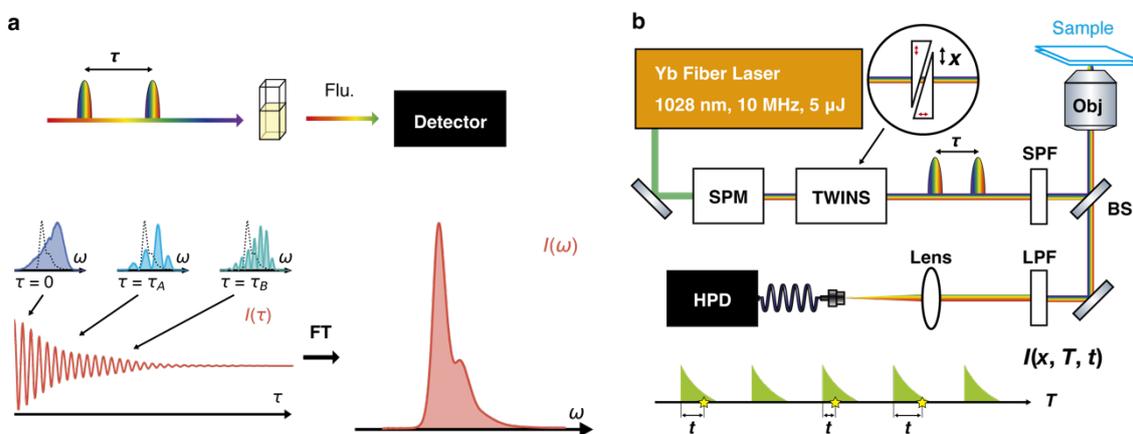


Fig. 3. (a) FECS の原理。(b) 装置のブロックダイアグラム。

4. 研究成果

FECS 装置の性能を評価するために、蛍光標準色素 ATTO647N 水溶液の蛍光自己相関測定を様々な濃度で行なった。規格化された相関関数の解析から見積もられた観測領域内の平均分子数は、水溶液の濃度と比例関係を示しており、25 nM の条件ではおよそ 1 と見積もられた。濃度 25 nM において共通光路干渉計を用いて蛍光強度を取得したところ、明確な干渉パターンが得られ、フーリエ変換から得られたスペクトルは ATTO647N の吸収スペクトルをよく再現していることが確認された。さらに、相関関数 $G(\Delta T)$ を共通光路干渉計の位置 x の関数として取得したところ、相関関数にも明確な干渉パターンが観測された(Fig. 4a)。この干渉信号をフーリエ変換して得られたスペクトルも定常状態の吸収スペクトルをよく再現しており、その強度の時間変化にも溶液中色素の拡散に由来する 150 μ s の減衰が観測された(Fig. 4b)。以上より、本研究で開発された新規 FECS 装置により、単一分子レベルでスペクトル分解した蛍光自己相関関数の測定に成功したことが確認された。今後はシステムをさらに改良することで、蛍光相互相関の取得に挑戦し、光応答性タンパク質のスペクトルの揺らぎの相関を捉えていく。

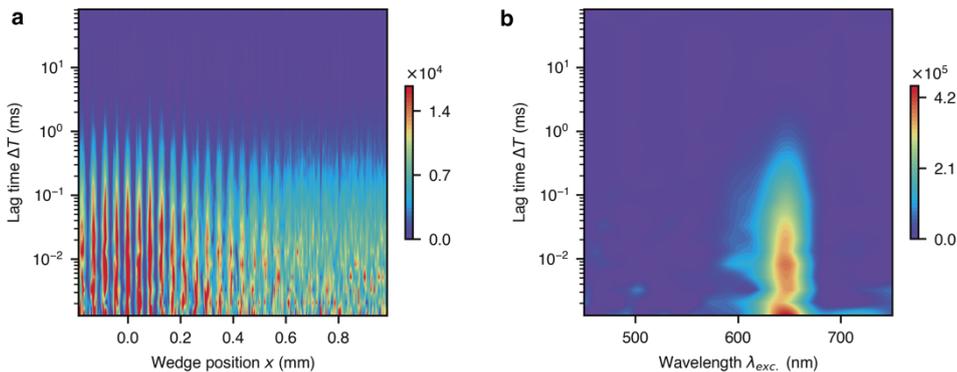


Fig. 4. (a) 相関関数の干渉パターン。(b) フーリエ変換で得られた波長分解した相関関数。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoneda Yusuke, Kuramochi Hikaru	4. 巻 127
2. 論文標題 Rapid-Scan Resonant Two-Dimensional Impulsive Stimulated Raman Spectroscopy of Excited States	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry A	6. 最初と最後の頁 5276 ~ 5286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.3c02489	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 Yoshioka Daisuke, Yoneda Yusuke, Chang I-Ya, Kuramochi Hikaru, Hyeon-Deuk Kim, Kobayashi Yoichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Quasi-Reversible Photoinduced Displacement of Aromatic Ligands from Semiconductor Nanocrystals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 11309 ~ 11317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.2c12578	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 -
1. 著者名 Kimura Ryo, Yoneda Yusuke, Kuramochi Hikaru, Saito Shohei	4. 巻 22
2. 論文標題 Environment-sensitive fluorescence of COT-fused perylene bisimide based on symmetry-breaking charge separation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 2541 ~ 2552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43630-023-00468-4	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 -
1. 著者名 米田 勇祐	4. 巻 63
2. 論文標題 先端的非線形分光によって明らかにする光化学系IIの複雑なダイナミクス	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 171 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.63.171	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 -

1. 著者名 Yoneda Yusuke, Noji Tomoyasu, Mizutani Naoto, Kato Daiji, Kondo Masaharu, Miyasaka Hiroshi, Nagasawa Yutaka, Dewa Takehisa	4. 巻 24
2. 論文標題 Energy transfer dynamics and the mechanism of biohybrid photosynthetic antenna complexes chemically linked with artificial chromophores	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 24714 ~ 24726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2CP02465A	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 Yoneda Yusuke, Arsenault Eric A., Yang Shiun-Jr, Orcutt Kaydren, Iwai Masakazu, Fleming Graham R.	4. 巻 13
2. 論文標題 The initial charge separation step in oxygenic photosynthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29983-1	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 Yoneda Yusuke, Kito Masaya, Mori Daiki, Goto Akari, Kondo Masaharu, Miyasaka Hiroshi, Nagasawa Yutaka, Dewa Takehisa	4. 巻 156
2. 論文標題 Ultrafast energy transfer between self-assembled fluorophore and photosynthetic light-harvesting complex 2 (LH2) in lipid bilayer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 095101 ~ 095101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0077910	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 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yusuke Yoneda
2. 発表標題 Exploring complex reaction dynamics using multidimensional vibrational spectroscopy
3. 学会等名 38th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米田勇祐
2. 発表標題 先端的非線形分光を用いた電子-構造ダイナミクスの解明
3. 学会等名 第44回 光化学若手の会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米田勇祐, 倉持光
2. 発表標題 高速スキャンによる励起状態共鳴2次元ラマン分光法の開発と応用
3. 学会等名 2023年光化学討論会
4. 発表年 2023年

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2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米田勇祐, 倉持光
2. 発表標題 高速スキャンによる励起状態共鳴2次元ラマン分光
3. 学会等名 第17回分子科学討論会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米田勇祐, 小西智暉, 齊藤尚平, 倉持光
2. 発表標題 フェムト秒時間分解時間領域ラマン分光による非平衡な励起状態平面化ダイナミクスの観測
3. 学会等名 日本化学会 第104春季年会 (2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 米田勇祐
2. 発表標題 先端的分光解析で解きほぐす光化学系 II の複雑な励起状態ダイナミクス
3. 学会等名 第29回 光合成セミナー2022: 反応中心と色素系の多様性 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米田勇祐
2. 発表標題 二次元分光による非局在化した電子状態から繰り広げられる光合成初期過程の探究
3. 学会等名 日本分光学会 関西支部 2022年度第2回(令和4年度)講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米田 勇祐, Arsenault Eric A, Yang Shiun-Jr, Orcutt Kaydren, Iwai Masakazu, Fleming Graham R
2. 発表標題 励起子電荷分離混成が酸素発生型光合成を駆動する
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022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
---------	---------