

2021 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	共鳴 IR 法による蛍光タンパク質発色団部位の選択的赤外分光計測
キーワード	①蛍光タンパク質、②発色団、③共鳴 IR 法

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	タカハシ ヒロナ 高橋 広奈
配付時の所属先・職位等 (令和3年4月1日現在)	岡山理科大学 理学部 化学科 講師
現在の所属先・職位等 (令和4年7月1日現在)	岡山理科大学 理学部 化学科 講師
プロフィール	2017年3月東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻修了、博士(理学)を取得。2016年4月～2017年3月まで日本学術振興会特別研究員(DC2)。2017年4月より岡山理科大学理学部化学科・助教。2021年4月より現職。

1. 研究の概要

本研究では蛍光タンパク質発色団近傍の局所的な分子構造解析を目指して、「共鳴 IR 法による蛍光タンパク質発色団部位の選択的赤外分光計測」に取り組んだ。具体的には過渡蛍光検出赤外(TFD-IR)分光法と顕微鏡技術を組み合わせた共鳴 IR 法を開発し、これまで実現できなかった**水溶液中**での**蛍光タンパク質発色団部位の選択的赤外分光計測**を行った。最終的には、発色団部位の分子構造、電子状態および周囲のタンパク質との相互作用が、吸収・発光特性に与える影響を解明し、蛍光タンパク質の吸収・発光特性を制御する指針とする。

2. 研究の動機、目的

複数のタンパク質同士の相互作用により新たな機能を発現することは古くから知られている。こうした「分子間相互作用」から生じる生体内の機能制御を研究する際には、蛍光タンパク質が利用されてきた。例えば、2つの生体分子を別々の蛍光タンパク質でラベリングし、蛍光タンパク質間のエネルギー移動を観察すれば、生体分子の会合状態を可視化することができる【J. Zhang et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3 (2002) 906】。このような蛍光タンパク質間のエネルギー移動を利用した計測には、蛍光タンパク質に任意の吸収・発光特性を付与するテクノロジーが不可欠である。これまで、蛍光タンパク質の吸収・発光特性はそこに含まれる発色団と発色団を取り囲むタンパク質との相互作用により決まると考えられてきたが、発色団の構造や周囲との相互作用を分光学的に明らかにした研究は、測定の高難さから数が限られている。そこで私は、**振動分光法に基づいた発色団の分子構造解析**に取り組み、**吸収・発光特性に与える影響を解明**したいと考えた。

本研究目的である**蛍光タンパク質発色団部位の選択的な赤外分光測定**のためには、1) 水中の希薄な溶質分子の赤外スペクトル測定、および 2) タンパク質の**発色団部位のみ**の**選択的赤外スペクトル測定**、の2点を実現する必要がある。通常、水溶液中では水の強い赤外吸収に阻害されて溶質分子の赤外スペクトル測定は不可能である。さらに、**蛍光タンパク質の赤外スペクトル測定**においては、周囲の大部分を占めるタンパク質部分の赤外吸収に妨害されて測定は困難となる。**蛍光タンパク質発色団部位の分子構造解析**を行うためには、上記の2点を克

服した新たな振動分光法の開発が不可欠であった。

そこで、TFD-IR 分光法を顕微鏡技術と組み合わせることで、水溶液中において蛍光タンパク質発色団部位の選択的な赤外分光計測が可能と着想した (図 1)。その鍵となる TFD-IR 分光法は振動励起準位を経由する多光子過程を利用して赤外情報を蛍光に変換する手法である。蛍光分子に対して赤外光を照射して特定の振動に励起し、振動励起した分子を可視光で選択的に電子励起することで S_1 状態から発生する蛍光 (過渡蛍光) を検出する。これを蛍光タンパク質に適用した場合、タンパク質部位は可視光ではエネルギー的に S_1 状態に励起できないため蛍光が発生しないが、発色団部位からは過渡蛍光が発生するため、発色団部位のみの信号抽出が可能と考えた。この分光法では、赤外光の波長が分子振動と一致しない場合には蛍光が発生しないため、蛍光強度をモニターしながら赤外波長掃引することで、発色団部位のみの選択的赤外スペクトル測定を実現できる。

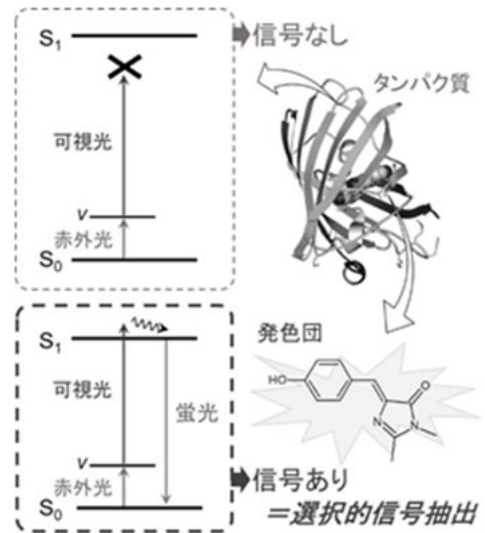


図1 TFD-IR法による蛍光タンパク質発色団部位の選択的赤外分光計測

3. 研究の結果

本研究の遂行には、水中の希薄な溶質分子の赤外スペクトル測定法の確立が不可欠であった。私はすでに、TFD-IR 分光法を顕微鏡技術と組み合わせた共鳴 IR 法を確立することで、水溶液中における蛍光性分子の赤外スペクトル測定を実現した【H. Takahashi et al. Chem. Phys. Lett., 758, 137942 (2020)】。

従来、水は極めて強い赤外吸収を有するため、水溶液中での赤外分光測定は困難である。これは、光軸方向の空間分解能が波長程度であるため、反射法で測定する場合にも赤外光が水へ侵入する範囲が大きく、水の吸収による影響が除外できないからである。そこで、TFD-IR分光法と赤外超解像原理を組み合わせた共鳴IR法により、この問題を克服した。TFD-IR分光法では、可視光と赤外光が空間的に重なった部分からのみ過渡蛍光が発生する。可視光の波長は赤外光の1/10程度であるので、2つの光を同軸からレンズに入射した場合、重なり部分は赤外光の回折限界よりも小さくすることが可能である。過渡蛍光を利用すると赤外光の回折限界を突破した1 μm 以下の領域からの光のみを検出することができ、赤外光が水に完全吸収される前に信号検出が可能になる。実際に蛍光性生体分子の一種であるフラビンモノヌクレオチド (FMN) について過渡蛍光強度をモニターしながら赤外波長を掃引することで共鳴IRスペクトルを構築したところ、水による吸収が存在する振動数領域でもいくつかの明瞭なピークが観測された。得られたスペクトルの振動数は赤外吸収 (KBr)、共鳴ラマンおよび非共鳴ラマンスペクトルと一致しており、たしかに水溶液中での赤外スペクトル測定が可能となった。

この手法を蛍光タンパク質の一種である turboGFP について、 $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ という希薄な水溶液を僅か50 μl 程度だけ用いて極めてS/N比の高いスペクトルを得ることに成功した。既報のラマンスペクトル【B. F. Alasdair et al., Biochemistry, 39 (2000) 4423】と比較すると、発色団の振動情報が完全に一致しており、かつ、ラマンスペクトルに現れているタンパク質由来のバンドは共鳴IRスペクトルには観測されていないため、着想通り発色団のみの選択的な赤外スペクトルが得られた。更に蛍光タンパク質 turboGFP およびそれと同一の発色団をもちながら吸収・発光特性の異なる4つの蛍光タンパク質 (図2) をターゲットとして、

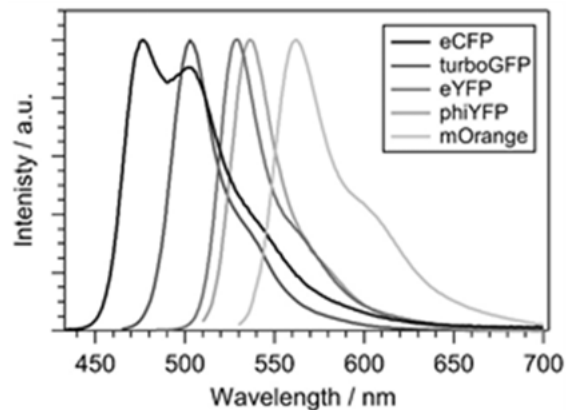


図2 同じ発色団をもつ蛍光タンパク質の発光スペクトル

測定を行ったところ、非常に高いS/N比で発色団部位のみの赤外スペクトルを選択的に得ることに成功した。それぞれのスペクトルを比較すると、ピークの現れる位置や相対強度などのスペクトル構造が異なることを見出した。この違いは発色団の構造の違いを反映しているはずであり、解析を進めることで、局所的な構造解析が行える。

また、ラマンスペクトルが測定されている蛍光タンパク質については、共鳴IRスペクトルにおいていくつかのバンドがラマンスペクトルに比べて増強されることが分かった。この信号増強にはFranck-Condon因子が関わると考えている。TFD-IR分光法は S_0 状態において赤外光で振動励起した $v=1$ から S_1 状態の $v=0$ への電子励起が寄与する（所謂、 $1 \rightarrow 0$ 遷移）。このとき、Franck-Condon原理により、励起状態の構造変化が小さい場合、波動関数の重なりが小さいこの遷移は起こりにくい。一方、励起状態との間で構造変化が大きい場合、波動関数の重なりが生じ、信号強度が増大する。したがって、TFD-IR分光法において、信号増強されるのは基底状態と励起状態間の構造変化に沿った振動モードである。これは共鳴ラマンにおいてFranck-Condon型といわれるAlbrechtのA項によるラマン強度増大と同じ原理であり、私の発案した手法が、「共鳴IR」法というべき手法であることの所以にもなっている。このことは、蛍光タンパク質において信号増強されるバンドを基に、電子状態の議論も可能であることを示す。

4. 研究者としてのこれからの展望

発色団や周囲のタンパク質の構造と、吸収・発光特性の相関に関する知見を基にした新規蛍光タンパク質の設計・開発は、近年盛んに行われてきている【S. Zhong et al., *J. Neurosci. Methods*, 313 (2019) 68】。しかし、従来タンパク質の構造解析に用いられてきた手段のうち、X線構造解析では静的な条件での構造しか得られない。分子構造に敏感な振動分光法では、赤外分光法では溶媒の水が赤外光を吸収してしまうため、また、可視共鳴ラマン分光法では発色団からの蛍光に妨害されるため、水溶液中での測定は困難であった。そのため、蛍光タンパク質の分子構造解析には紫外共鳴ラマン分光法が用いられてきた。これは共鳴効果を利用して発色団周囲の芳香族アミノ酸残基の構造を選択的に観測する。一方、私の提案する手法では発色団を直接観測しながら、その分子構造・電子状態や周囲のタンパク質との相互作用を解明するため、両手法を用いることで、蛍光タンパク質の分子構造の全貌解明に繋がる。更に本手法はバックグラウンドフリーで高感度なため、非常に希薄 (10^{-5} mol dm^{-3} 以下) かつ微量 (数十 μl) な試料の測定に成功している。これは蛍光タンパク質に置き換えると、10 μg 程度の試料さえあれば測定できることになり、希少な蛍光タンパク質の分子構造解析に貢献ができる。また、本手法で利用するTFD-IR分光法は従来、振動緩和現象の観測に利用されていた。振動緩和速度は、振動エネルギーの散逸の速さを示しており、周囲との相互作用が強い場合は速く、弱い場合は遅いことから、発色団と周囲のタンパク質との相互作用の大きさを明らかにできるとも期待している。

本研究により得られた発色団分子構造の吸収・発光特性への影響をデータベース化することで、将来的にはタンパク質 – タンパク質間相互作用の研究等に適した新規蛍光タンパク質の開発の指針や、その評価法を提供していきたいと考えている。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本研究内容を The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (2021年12月)をはじめとする3件の学会発表を行うなどの成果を上げることができました。今後の研究推進の基となる、いくつかの興味深い測定結果も得られており、今後の研究へのモチベーションが更に高まっております。

ご支援くださいました日本私立学校振興・共済事業団の皆様ならびにご寄付をいただいた関係者の方々に、感謝申し上げます。