

研究終了報告書

「生体量子コヒーレンス顕微分光:本当に量子効果は生命を駆動するのか？」

研究期間: 2018年10月~2022年3月

研究者: 近藤 徹

1. 研究のねらい

本研究課題は生体内の量子効果が生体機能にとってどのような意味を持つのかを実験的に検証することを目的とする。特に、光合成光反応の初期過程である励起エネルギー移動に寄与する量子効果を対象に研究を進めた。光合成光反応は光捕集アンテナタンパク質に結合する色素分子の光吸収でトリガーされる。タンパク質には多数の色素分子が結合しているが、分子間相互作用により各分子の励起状態が混ざり合うことで空間的に非局在化した励起子状態を形成する。光励起直後のフェムト秒時間領域では複数の励起子状態間で位相振動(量子的なコヒーレント振動)が生じ、二次元電子分光測定などで振動信号として実際に観測されている。これらの結果は光合成系の励起エネルギー移動に量子的な効果が寄与することを示唆する。一方で、実際にどのように寄与するか、どの程度重要な寄与なのか、といった具体的な議論はできていない。

生体量子効果の寄与がすんなりと受け入れられない大きな理由の1つに生体系特有の乱雑さがある。複数の分子が1つの量子状態を形成するには各分子の量子状態の位相が揃う必要があるが、生体系は熱的な揺らぎが大きく且つ分子ごとに不均一な環境におかれるため、量子状態の生成および保持が難しく、生体機能に大きく影響するとは考えられてこなかった。そこで本研究では、生体系の揺らぎと量子効果の関係を明らかにするため、1分子・1タンパク質レベルにおける超高速光物理現象の測定に取り組む。そのためにまずは蛍光検出型の2パルス pump-dump 顕微分光法を確立する。さらに、2つのレーザーパルスの焦点位置をずらすことで時間分解に加えて空間分解も可能な顕微分光法の開発を行う。これらの新規顕微技術を用い、1タンパク質内およびタンパク質が複数集まったタンパク質超複合体内で励起子状態がどのように振る舞うかを解明する。

2. 研究成果

(1) 概要

光合成光反応に関連する量子効果を構造や環境の揺らぎの寄与まで含めて解析するため、フェムト秒時間分解が可能な2パルス pump-dump 顕微鏡を開発した。1つ目のパルスで励起状態を生成した後、2つ目のパルスで誘導放射を誘起させることで励起状態の時間変化を調べられる。開発した顕微鏡で光合成アンテナタンパク質・アロフィコシアニン(APC)を測定し、1タンパク質内で生じる励起エネルギー移動の解析に成功した。本装置の時間分解能では量子コヒーレントの振動信号を直接観測するまでには至らなかったが、励起子状態がエネルギー移動の安定化に寄与する可能性が示唆された。

エネルギー移動の空間マッピングを行うためには2つのレーザーパルスの焦点位置を個別に走査する必要がある。そこで、焦点スポットの空間走査を行うために4f光学系を組み込ん

だ2焦点顕微鏡を作製した。これを用い、光合成光捕集アンテナ分子・クロロソームと同じようにクロロフィル分子が自己会合して形成される1次元ナノ超分子の分子内エネルギー移動過程を解析する。分子間相互作用が強く大きな量子効果が期待できるナノチューブ(NT)超分子と、分子間相互作用が弱く量子効果が小さい螺旋構造のナノファイバー(NF)超分子の2種類を測定に用いる。NFの蛍光画像を測定したところ、試料基板上に凝集している可能性が高かった。測定条件や分子組成などの最適化を進めていく。

これまでの顕微分光研究のほぼ全てが S/N に優れる蛍光測定をベースに進められてきた。一方で、過渡的な中間状態や非蛍光性の状態などは蛍光で観測するのが難しく、光反応過程を解析する上で大きな問題となっていた。また、上述した pump-dump 法を用いれば蛍光検出でフェムト秒時間分解測定も可能だが、原理的に強光励起が必須となるため、試料の光退色が深刻な問題となった。そこで、これまでの蛍光検出ベースの顕微分光研究から吸収検出ベースへ発展させるため、吸収顕微鏡の開発を行った。装置を改良して S/N を向上させ、光合成光化学系 I(PS I)タンパク質の三量体粒子(約 300 個のクロロフィル分子が結合)の蛍光・吸収イメージングに成功した。吸収スペクトル測定に向けて可視光域の波長可変光源も開発し、吸収顕微分光の基盤技術を確立した。

(2) 詳細

研究テーマ A:「フェムト秒時間分解顕微分光技術の確立」

1分子・1タンパク質レベルで超高速光物理現象を観測するため、フェムト秒時間分解が可能な顕微装置を開発した。1分子測定では通常蛍光信号を観測するが、蛍光放射はナノ秒程度で生じるため、それよりも短い時間領域で生じる過渡現象は観測できない。そこで、2つのレーザーパルスを用いる pump-dump 測定を行う。1つ目のパルスで励起状態を生成した後、時間差 ΔT だけ待ってから2つ目のパルスを照射し、誘導放射で励起状態を dump する。 ΔT に対する蛍光強度の変化を解析し、励起エネルギー移動速度を定量する手法である。100 fs 程度の時間幅のパルスレーザー光源を用い、光学プリズムを用いたパルス圧縮器を導入することで、数百 fs の時間分解能の顕微分光装置を構築した。実際の測定では試料の光退色が大きな問題となり、光強度を下げる必要があった。一方で、誘導放射を効率良く誘起するには1パルス当たりの光強度をできるだけ高くする必要がある。そこで、音響光学素子(AOM)を用いてレーザーパルスのピッキングを行い、繰返し周波数を 80 MHz から 1 MHz 程度まで落とすことで、1パルス強度を高く保ちつつ平均光強度を低く抑えた。これにより、1タンパク質の pump-dump 測定が可能となった。開発した装置を用い、光合成光捕集アンテナタンパク質の1つであるアロフィコシアニン(APC)の単一 pump-dump 測定を行い、フェムト秒スケールで生じるエネルギー移動の観測に成功した。励起状態緩和が完了する前にエネルギー移動が生じることが分かった。本装置の時間分解能では量子コヒーレントの振動信号を直接観測することはできなかったが、励起状態がエネルギー移動の安定化に寄与していることが考えられる。これを実証するには時間分解能を向上させる必要がある。現在開発中のフェムト秒時間分解顕微鏡は~20 fs 程度の時間分解能があり、今後観測に取り組んでいく。

研究テーマ B:「人工アンテナ系の1分子顕微観測」

緑色硫黄細菌は多数のクロロフィル色素分子が自己会合したクロロソームという巨大なアンテナ分子を持つ。二次元電子分光などを用いた解析から量子特性を示すことも確認されているが、その詳細についてはよく分かっていない。そこで、クロロソームと同じようにクロロフィル色素分子が自己会合したナノ超分子をモデル試料として解析を進めることにした。ナノ超分子はチューブ構造をとるナノチューブ超分子(NT)と螺旋構造のナノファイバー超分子(NF)の2種類の構造体が存在する(会合体の合成は名工大・松原翔吾氏との共同研究)。分子間の相互作用が強く量子的な振る舞いが期待できる NT と、分子間相互作用が弱く量子効果が小さい NF を比較することで、分子内エネルギー移動における量子効果の寄与を明らかにできる。また、NTとNFは μm サイズの1次元構造体であり、回折限界程度の空間分解能でもイメージングが可能である。実際に蛍光顕微鏡でNFの1分子観測を行ったところ、蛍光画像を取得できたが、分子ごとに構造が歪んでおり、試料基板上で分子が凝集している可能性が高かった。測定条件や自己会合分子の組成などを改良し、今後解析を進めていく。

分子内エネルギー移動の空間マッピングを行うためには2つのレーザーパルスの焦点位置を個別に走査する必要がある。そこで、共焦点レーザースポットの空間走査を行うために4f光学系を組み込んだ顕微鏡を作製した。上記のナノ超分子の準備が整い次第、2焦点の空間走査イメージングを進める。

研究テーマ C:「吸収顕微鏡の開発」

これまでの顕微分光研究のほぼ全てが S/N に優れる蛍光測定をベースに進められてきた。一方で、蛍光は基本的にエネルギー移動過程の最終状態から放出されるものであり、過渡的に生じる中間状態は調べられない。また、非蛍光性の状態や蛍光量子収率が低い状態は観測できない。これらの問題は吸収顕微分光法で解決できる。1分子・1タンパク質の吸収測定が可能になれば、過渡的な中間状態や非蛍光性状態も解析可能となる。これに加え、強光励起は必要ないので、pump-dump 測定で大きな問題となった試料の光退色も抑制できる。そこで、吸収顕微鏡を開発した。S/N 比を向上させることで、色素ビーズ(数百個程度の分子を内包)の蛍光・吸収同時イメージングに成功した。光合成光化学系 I(PS I)タンパク質の三量体粒子(約 300 個のクロロフィル分子が結合)の蛍光・吸収イメージングも可能になった。また、吸収スペクトル測定に向けて可視光域の波長可変光源を開発した。吸収顕微分光測定に向け、基盤技術を確立した。

研究テーマ D:「光合成タンパク質の揺らぎ解析」

その他、光合成タンパク質の1分子分光研究を進めた。光捕集アンテナタンパク質の構造揺らぎ解析手法を開発し、1タンパク質内の複数の揺らぎ成分の定量解析に成功した。また、光合成反応中心タンパク質の極低温1分子分光解析から、電荷分離に関わる色素分子の1分子ピークの検出に成功した。これらの色素ピークの時間変動から、エネルギー移動経路の揺らぎの解析に成功した。

連携研究

太古の岩石中に残された光合成タンパク質を探し出すため、3期齊藤研究者と連携して岩

石試料の顕微分光解析を行った。光合成色素分子由来の蛍光信号を得ることに成功し、太古の地質試料にも光合成物質が残存する可能性を示した。更なる発展研究のため、共焦点蛍光顕微鏡に可視域波長可変光源を組み合わせ、蛍光スペクトルと蛍光時間減衰に加えて励起スペクトルも測定可能な顕微分光装置を作製した。これらの顕微分光手法を用いて岩石試料を解析し、エネルギー移動などの光化学反応活性を保持した光合成タンパク質の探索を進める。

さらに、2期大畠研究者が開発を進める密度行列分光と近藤が開発する顕微分光を組み合わせ、マイクロ領域の量子過渡現象の定量解析を可能にするために連携研究を進めた。まずは各々で独自技術を確立するため、近藤はフェムト秒時間分解顕微技術、可視域波長可変光源作製技術、蛍光・吸収1分子顕微分光技術などを開発し、大畠氏は光位相制御技術、量子トモグラフィ技術、時間分解密度行列分光技術などを開発した。当該さきがけ期間中に互いの技術を融合するまでには至らなかったが、現在進行形で連携研究を継続しており、今後本格的に技術融合を進めていく。

3. 今後の展開

フェムト秒スケールで生じる超高速光反応過程の1分子観測に成功したが、目標としていた量子コヒーレンス由来の振動信号の検出や空間マッピングは達成できていない。超短パルスレーザーを用いた2焦点走査型の顕微装置の開発は行っており、最初の解析対象としてクロロフィル自己会合型1次元超分子の準備も進めている。装置や試料の改良、測定条件の最適化など、今後詰めるべき点は残されているが、基盤技術は確立できており、できるだけ早期に目標を達成したい。

当初の研究計画にはなかったが、研究を進める過程で吸収顕微技術の開発も目標に追加し、進めてきた。従来の蛍光検出では観測できない光反応過程の解析が可能になると期待しているが、測定感度や空間分解能をさらに改良する必要があるため、今後も技術開発を進めていく。

本研究で見込まれる成果は、①超解像+フェムト秒時間分解+2焦点走査が可能な蛍光・吸収顕微技術の確立、及び ②励起子状態などの量子状態が励起エネルギー移動にどのように寄与するか の解明、の2つである。①については、基盤となる技術は開発してきたが、それらを統合・最適化して量子効果の直接観測が可能な顕微分光装置を完成させる必要がある。②については、試料の選定を終えたが、測定条件などを今後詰めていく必要がある。以上を達成し、量子効果の役割を明らかにすると共に、生体量子効果がどのようなパラメータで制御されているかを明らかにできれば、新規材料開発や人工光合成実現に向けた応用研究へ繋げられる。今後2～3年を目途に上記①②を達成し、まずは学術論文などで研究成果をアウトプットしていく。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

当初の計画では、①フェムト秒時間分解顕微鏡の開発および1分子レベルでのエネルギー移動解析、②生体膜に埋め込まれたタンパク質超複合体で生じるエネルギー移動の時空間マッピング、③in vivo 観測の実現、という3つのステップを予定していた。①についてはフェムト秒時間分解顕微鏡を開発し実際に光合成タンパク質の1分子解析に成功した点で進展があった。しか

し、肝心の量子コヒーレンス由来の振動信号の1分子観測は未達成のままである。また、②で必要となる時間・空間分解可能な顕微装置については、ベースとなる光学装置は完成したものの、実際に試料を測定するまでには至っていない。そのため、研究課題全体の達成率としては到底満足できるものではない。一方で、吸収顕微法の開発という当初の計画にはなかった課題に取り組めた点は非常に良かった。将来的により高度な顕微分光解析が必要となった際、蛍光顕微だけでは力不足であり、吸収顕微は大きな助けとなる。

【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

本研究開始当初は東北大学に所属し、さきがけ専任研究者としてプロジェクトをスタートさせたが、研究スペースを確保するのに大きな労力・時間を費やした。その後、東京工業大学に異動して研究室を新たに立ち上げることとなり、研究環境の整備や光学装置の再構築にさらに多くの労力・時間を費やすことになった。このように思うように研究を軌道に乗せられず歯痒い思いをしたが、現在では研究環境も整ってきた。学生さんも何人か研究室に参加してくれたので、今後は研究のペースを上げていける。

研究費は当初の計画通り、フェムト秒パルスレーザーや光学装置・顕微鏡構築部品などの購入費として使用した。また、研究室を新たに立ち上げる際にはスタートアップ支援をいただき、実験室のインフラ整備費用に充てることができた。研究費の執行に関しては概ね計画通り進めることができた。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

本研究で期待できる技術的な成果として、フェムト秒時間分解+2焦点走査が可能な蛍光・吸収顕微技術の確立、が挙げられる。本研究では光合成タンパク質の解析に用いる予定だが、広く一般的な光物性計測にも応用できる。例えば、カーボンナノチューブやグラフェンといった炭素系材料の光物性測定にも活用でき、材料科学などの他分野への波及効果が期待できる。本研究の科学的な成果としては、励起子状態などの量子状態と光合成光反応がどのように相関するか明らかにする点であり、人工光合成分野の高効率光電変換デバイスの開発などで新しい設計指針を提供できると考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

1. **Kondo T.***, Gordon J.B., Pinnola A., Dall'Osto L., Bassi R., and Schlau-Cohen G.S.*, "Microsecond and millisecond dynamics in the photosynthetic protein LHCSR1 observed by single-molecule correlation spectroscopy", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116, 11247–11252, 2019.

これまでの1分子蛍光解析では、複数のダイナミクスが観測されても、それが1つの蛍光体に由来するか、複数の蛍光体に由来するかは判別できなかった。そこで二次元蛍光寿命相関分光法(2D-FLC)を改良し、動的特性の違いを基に複数のダイナミクス成分を区別して定

量化できる新規分光手法を確立した。複数の色素結合部位で生じる構造揺らぎを区別して定量評価することに成功し、それぞれがエネルギー輸送調整弁として機能することを突き止めた。

2. **Kondo T.***, Mutoh R., Tabe H., Kurisu G., Oh-Oka H., Fujiyoshi S., and Matsushita M., “Cryogenic single-molecule spectroscopy of the primary electron acceptor in the photosynthetic reaction center”, *J. Phys. Chem. Lett.*, 11, 3980–3986, 2020.

タンパク質構造ダイナミクスの影響を定量解析するため、極低温1分子分光測定を行った。液体ヘリウム温度まで冷却すると構造揺らぎが遅くなるため、様々な準安定構造でトラップして光学特性を調べられる。そこで、6 K で光合成反応中心タンパク質の1分子励起スペクトル測定を行い、結合する複数の色素分子の吸収ピークを分解して解析した。電荷分離に関わる色素分子の1分子観測に世界で初めて成功した。

3. Moya R., **Kondo T.**, Norris A.C., and Schlau-Cohen G.S.*, “Spectrally-tunable femtosecond single-molecule pump-probe spectroscopy”, *Opt. Express*, 29, 28246–28256, 2021.

2パルス pump-dump 顕微鏡を開発し、フェムト秒スケールで生じる励起状態ダイナミクスの1分子解析に成功した。励起状態緩和速度を1分子ごとに評価してヒストグラムを作成し、超高速現象が生じる時間スケールのバラつき具合を調べた。

(2) 特許出願: 0件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表(招待講演)】

- [1] **近藤徹**, “複数の分子が織りなす安定・高効率な生体光反応”, 第 102 回日本化学会(シンポジウム講演), オンライン開催, 2022 年 3 月
- [2] **近藤徹**, “光合成光捕集制御に関わるタンパク質構造揺らぎの単一タンパク質分光解析”, 第 76 回日本物理学会(シンポジウム講演), オンライン開催, 2021 年 3 月
- [3] **Kondo T.**, “Next challenge in biological photophysics: From static/isolated protein to dynamic-assembled protein network”, 第 57 回日本生物物理学会(シンポジウム講演「カレントトピック・セッション」), フェニックス・シーガイア・リゾート宮崎, 2019 年 9 月

【受賞】

2020: 日本物理学会若手奨励賞

【学会誌寄稿】

近藤徹, “単一タンパク質分光でみえる光合成の光反応制御に関わる複数のタンパク質構造揺らぎ”, 日本物理学会誌(日本物理学会) 76, 17–22, 2021