

Title	金属-溶液界面における蛍光タンパク質発光の電圧制御
Author(s)	FARHA DIBA, TRISHA
Citation	
Issue Date	2023-06
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/18710
Rights	
Description	Supervisor: 筒井 秀和, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	TRISHA. Farha Diba		
学位の種類	博士 (マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 571 号		
学位授与年月日	令和 5 年 6 月 23 日		
論文題目	Voltage Control of Fluorescence Protein Emissions at the Metal-Solution Interface		
論文審査委員	筒井秀和	北陸先端科学技術大学院大学	准教授
	水谷五郎	同	教授
	芳坂貴弘	同	教授
	平塚祐一	同	准教授
	沼野利佳	豊橋技術科学大学	教授

論文の内容の要旨

Numerous natural proteins that emit fluorescence have been discovered from various organisms, and their genetically engineered variants have been generated in the last several decades. A variety of physicochemical phenomena exhibited by fluorescence proteins have been utilized to develop many key technologies in life science over the last few decades. Accordingly, the physicochemical properties of fluorescence proteins have been deeply investigated in the bulk solution that mimics the cellular environment, but those at the less common environment such as surface and interface have not been deeply investigated. In this research work, it was found that the fluorescence protein exhibits voltage-dependent photoluminescence after its immobilization on the metal-solution interface. Upon the blue light photoexcitation, a yellow-emitting, version of green fluorescence protein (GFP), called Venus was immobilized on the gold electrode surface, robust enhancement or decrease of fluorescence was induced by applying negative or positive bias, respectively. This previously unappreciated phenomenon was then implemented as a protein-based microdisplay. Several experiments have been done to solve the mechanism for cathodic enhancement utilizing the characteristic optical properties in the three different fluorescence proteins. From the simultaneous electrochemical and fluorescence measurements in Venus, a solid correlation was found between the modulation of fluorescence and current reflecting cathodic hydrogen evolution, which led to a hypothesis that shift in the protonation-deprotonation equilibrium of the chromophore driven by hydrogen evolution at the metal surface underlies the phenomena. The hypothesis predicted that voltage dependency should be also found in the photoconversion from green to red of fluorescence protein which is known as a protonation-dependent process. The hypothesis was verified by observing clear voltage dependency for the photoconversion in Kikume Green - Red (KikGR), an engineered photoconvertible fluorescence protein, at the interface. Later experiments have been done to address how the shift in protonation equilibrium is driven by hydrogen evolution. The analysis using iR-pHluorin, a fluorescence protein variant with the inverse pH-sensitivity revealed that there exists an interface-specific mode of protonation-deprotonation reaction, and where the protonation equilibrium is directly coupled to the cathodic hydrogen evolution.

The interface-specific mode is distinct from that conventionally seen in protein in the bulk solution and there the protonation patterns of the constituent titratable residues are determined through the acid-base equilibrium of the

local environment. Interface-specific mechanism-based possible applications are then discussed, including monitoring of hydrogen evolution reactions at near neutral conditions.

Keywords:

Fluorescence protein, Photoluminescence, Imaging, Protonation-deprotonation, Hydrogen Evolution Reaction (HER).

論文審査の結果の要旨

蛍光タンパク質は、そのポリペプチドの折り畳みの際に自己触媒的に明るい蛍光発色団を形成するユニークな分子である。遺伝子工学的に任意の細胞や、任意のタンパク質に繋げて蛍光団を導入することが可能であることが最大の利点であり、細胞局所環境の分子センサーの材料として主に用いられる。このような経緯から、蛍光タンパク質の物性は、細胞環境を模した水溶液中（バルク）で盛んに調べられてきた。その一方で、表面や界面などにおける物性の探究は必ずしも十分にされてこなかった。

本論文は、金属と溶液の界面に固定された蛍光タンパク質が金属電圧に依存的な蛍光変調を示す、という興味深い現象を発見し、その現象の詳細な記載、変調のメカニズムを解明、更にはその変調メカニズムに基づく水素電極反応場（HER）のその場解析の提案を行うものである。具体的には、界面に置かれた蛍光タンパク質は、溶液に対して -1.5 V程度の負電圧で最大数倍にまで輝度を増し、これは繰り返し可能であった。この現象を用いることで、蛍光タンパク質で駆動するマイクロメートルスケールのセグメントディスプレイを試作し、動作に成功している。また pH 逆依存性という特殊な蛍光タンパク質の挙動を調べることで、この輝度変調が、単に電極近傍溶液の pH 変化では説明することが出来ないことを見出している。次に、電流・電圧関係と光学信号を同時計測することで、輝度変調は実際には電圧依存ではなく、電流依存であったことを見出す。さまざまな条件における実験を通じて、金属-溶液界面に置かれた蛍光タンパク質では、バルク環境とは異なる界面特有の水素イオンの伝達経路が生じているという仮説に至り、この仮説は、pH 逆依存性を示す蛍光タンパク質や、蛍光団がプロトン化されているときのみ紫外光により色変換を示す特殊な蛍光タンパク質（KikGR）を用いた実験で検証された。

本論文は、最終章で提案する水素電極反応（HER）の反応場のイメージングの他、蛍光タンパク質を用いた記憶素子など、従来知られていなかった界面における蛍光タンパク質物性の様々な潜在性を示すものであり、高いオリジナリティを持つ一連の研究で構成されており、学術的貢献も大きい。このことから、博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。