

「医療に向けた自己組織化等の分子配列制御による機能性材料・システムの創製」
平成14年度採択研究代表者

富永 圭介

(神戸大学分子フォトサイエンス研究センター 教授)

「ナノスケールにおける反応制御の基本原理の構築」

1. 研究実施の概要

本研究では、先端的分子分光を開発し、自己組織化された系における機能発現を分子論的なレベルから解明する。すなわち、分子間相互作用の協同効果、ダイナミクスの階層性と反応の方向性・選択性の発現等を、分子科学を基礎として研究する。研究対象として、1) 分子集合体・分子会合体、2) 膜貫通型タンパク質を含むタンパク質、をとりあげ、サブナノから数ナノメートルにおけるサイエンス (Science in Sub-Nano to a Few Nanometers) の構築を目指す。この研究成果を基盤として、将来的には、水溶液中における情報伝達を活用した機能性材料などのナノソフトマシンの創製の設計指針を与えることを目指す。昨年度、チーム全体としては、主要な装置の開発・導入はほぼ終了し、本年度は測定実験、その解析に力点を置く。

2. 研究実施内容

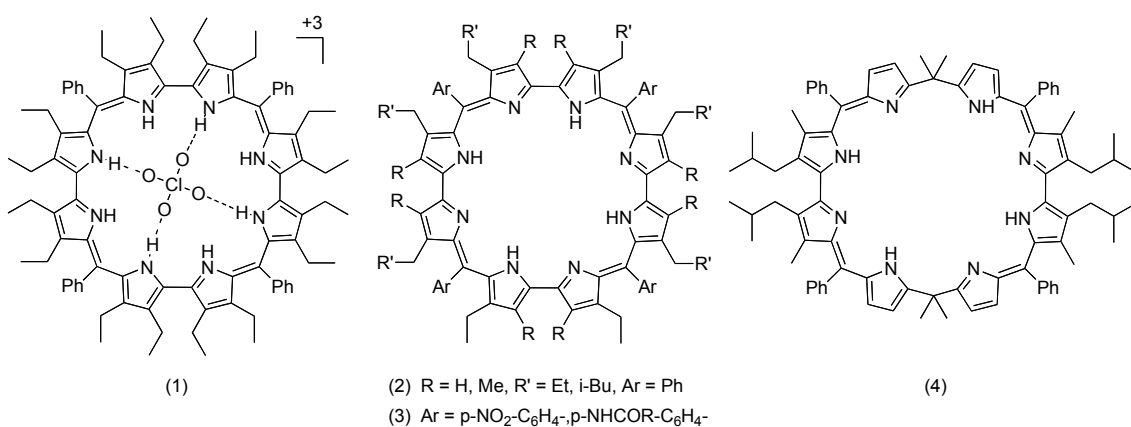
富永グループ

本研究では、自己組織化された系における反応の高効率性、方向性等を、超高速レーザーを用いた先端的分子分光法を開発し、多点における分子間相互作用と動的な揺らぎという観点から解明する。扱う系としては、自己組織化の基礎となる分子集合体、分子会合体であり、具体的には水素結合性液体、電荷移動錯体、ホスト-ゲスト分子（超分子）、逆ミセル内のウォータープール等である。また、反応の方向性に関する研究として、バクテオリオロドプシンにおける光駆動プロトンポンプの初期過程の解明を行う。

昨年度は、(1) 赤外非線形分光を用いて水素結合性液体中におけるイオンの振動状態の揺らぎをいくつかの系で測定した。その結果、揺らぎの大きさは溶質及び溶媒の両方に依存するが、揺らぎの時定数は溶質にはよらず、溶媒のみで決まるという極めて一般的な結果を得ることができた。これは、従来の分子動力学計算から予測される振る舞いと異なり、水素結合性液体における溶質分子の揺らぎを探求する上で重要な知見となりうる。(2) 赤外非線形分光の応用として、超分子に包接されたイオン (ClO_4^-) の挙動を調べる研究を開始した。8個のピロールを構成要素とする大環状ポルフィリノイドを合成し、溶液中での構造変化、イオンの認識機構等についての知見を得ることを目的としている。N-H伸縮

振動に対する偏光制御赤外過渡グレーティングの予備的な実験に成功した。(3) テラヘルツ電磁波を用いた低振動スペクトルの測定を、バクテリオロドプシン、液晶、電荷移動錯体等の生体分子、分子集合体について行っている。特に、液晶分子については、偏光方向依存性の測定を行い、配向軸に垂直と平行な成分でスペクトルが異なることを見出している。(4) 可視ポンプ赤外プローブ分光装置の開発を行い、バクテリオロドプシンの光反応における初期過程の解明を目指している。この実験のキーポイントとなるのは、赤外短パルスの安定性である。ショットごとの安定性が1%以下の赤外短パルスを得ることに成功し、溶液中における光化学反応の中間体の過渡振動スペクトルを測定することができた。(5) 逆ミセル中のウォータープール内の溶媒和ダイナミクスやプロトン移動の研究を開始した。ナノメートル領域の制限空間内における水の緩和や化学反応を調べ、バルク中のそれとどのように異なるか、制限空間効果や界面からの影響を見ることを目的としている。

また、瀬恒らは、生化学的に重要なイオン性あるいは中性の分子を補足する新しいホスト分子を開発し、その相互作用について明らかにすることを研究目的として、物質合成を行った。リン酸イオンは多くの生体分子のコンポーネントであり、分子認識部位としても重要である。リン酸イオンのようなテトラヘドラル型アニオンの形状に対してフィットするホスト分子として8つのピロールからなる環拡大ポルフィリン(オクタフィリン)が有用であることを既に見いだしている。オクタフィリンの過塩素酸イオン錯体(1)は安定性に優れているが、オクタフィリン構造のファインチューニングを念頭において、(i)ピロールβ位に置換基を導入したオクタフィリン(2)、(ii)meso-アリアル基に水溶性の置換基を有するオクタフィリン(3)、ピロール間の結合様式の異なるオクタフィリン(4)の合成を行った。8個以上のピロールを含むナノスケールのポルフィリノイドの合成については我々の研究室が世界的に優位に立っているため、その合成収率を向上し、機能の開発を行ってゆく予定である。



富宅グループ

本研究では、生命現象と深く関係したアミノ酸分子やペプチドの自己集積化過程で基本となる分子間相互作用と溶媒和相互作用を、系がより簡単で詳しい研究が可能な気相にお

いて、種々の分光学的手段を用いて検討する。またこれらの凝集体の中で起こる化学反応を詳細に調べ、その指向性の発現と構造との関係が生体内での機能発現に如何に結びつくかを分子レベルで明らかにする。ここでは、気相での凝集過程の検討を端緒として、タンパク質分子の固体表面での二次元相互作用による集積化の検討を視野に入れた研究を遂行していく。また、金属イオンを含むクラスターについての詳細な分光実験を実施する。すなわち、溶媒分子数が数個から数十個に限定されたクラスター内で、溶媒分子の数と共に金属（錯体）イオンの電子構造がどのように変化するかを調べる。また電子構造の変化に伴って、電子移動過程や酸化還元過程がどのように影響を受けるかを分子論的に明らかにする。

ポリアミド、アミノ酸クラスターの構造形成における水和分子の役割を調べるために生体分子分光解析装置の試作、開発を進めている。平成15年度は、電気スプレーイオン源とイオン導入部、及び水分子数の制御が可能な電気スプレーイオン源の製作を行った。プロトン化したトリプトファンの光解離過程およびジペプチドの水和クラスターの安定性について検討し、トリプトファンの光解離初期過程と密接に関連したアンモニウムラジカルとそのメチル置換体について、その電子構造とクラスター内での安定性を明らかにした。もう一つの研究テーマである、金属イオンを含む生体関連分子の構造と反応性の研究については、ヘムタンパクの活性中心である鉄-プロトポルフィリンの光励起緩和過程と安定性を検討するために、電気スプレーイオン法と光解離分光法を用いて以下の研究を行った。(1)ヘムタンパクの反応中心であるヘミン [鉄(III)-プロトポルフィリン] の β -解裂反応の動的機構を明らかにした。またこの反応の溶媒和過程を調べ、溶媒分子の結合エネルギーを決定すると共に、反応ダイナミクスに及ぼす溶媒の役割について、新しい知見を得た。(2)鉄-ポルフィリン錯体に軸配位子としてピリジンが付加したクラスターを生成し、光脱離過程を検討した。この結果、配位子の光脱離と β -解裂反応が協奏的に起こることを明らかにした。

鏑木グループ

高等動物の神経内分泌に携わる神経線維の末端部には、神経伝達物質の合成・貯蔵・放出に携わる小胞が存在する。この小胞膜には膜貫通型チトクロムb561を中心とする脳神経系内分泌組織特異的な電子伝達系が存在し、細胞質のアスコルビン酸から電子を受け取り、小胞内腔に存在する銅含有酸素添加酵素への電子伝達反応を媒介する。本研究ではこのような生体膜を貫通する電子伝達反応の詳細なメカニズムを明らかにすることを目的としている。

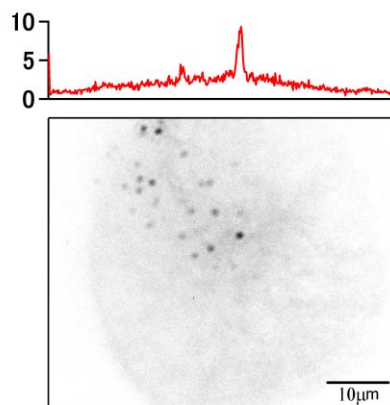
平成15年度は、まず精製チトクロムb561とアスコルビン酸、モノデヒドロアスコルビン酸ラジカルとの電子伝達反応のストップフロー法による詳細な解析を行った。この解析により、アスコルビン酸から細胞質側へムヘムへの電子伝達反応の機構モデル（協調的プロトン・電子伝達メカニズム）を提唱した。また、リポソーム小胞膜に精製したb561、小胞内腔にアスコルビン酸を埋め込んだプロテオリポソームを製作し、人工小胞外液中にドー

パミン β水酸化酵素を添加することによりb561を経由する膜貫通電子伝達を起こさせ、外液中での神経伝達物質（オクトパミン）の生合成に成功した。さらに、大腸菌での膜結合形チトクロムb5および可溶型チトクロムb5の発現系構築に成功した。

松下グループ

タンパク質の構造の揺らぎを明らかにし、機能との関わりを理解することはソフトナノマシンの設計指針を与える。しかし、タンパク質の揺らぎを直接観察することは通常のアンサンブル測定ではむづかしい。我々は一箇一箇のタンパク質を分光測定することで揺らぎを直接捉えようとしている。

平成15年度は、まず液体ヘリウム温度で測定ができる低温共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を製作した。装置は回折限界に近い空間分解能を持ち、試料の発光の検出効率は約0.5%、発光の検出限界はおよそ500 photon/secでパワーにして 10^{-16} Wのオーダーである。光合成において光エネルギー捕集を行っている色素・タンパク複合体（LH2複合体）について、この装置を使って一個のLH2複合体の発光を観測できることを確かめた。LH2複合体の結晶のX線構造は円形であるが、これまでの単一分子分光からミセル中ではLH2複合体は楕円に歪んでいることがわかっている。LH2複合体の天然の環境での構造を調べるために、LH2を脂質膜に導入した。脂質:LH2 = 600:1の試料ではLH2複合体は会合していたが、50000:1とすると脂質膜中で個々のLH2複合体が分散することが分かり、一分子分光が可能になった(前ページ)。LH2複合体は名古屋工業大学南後研究室から提供していただいた。



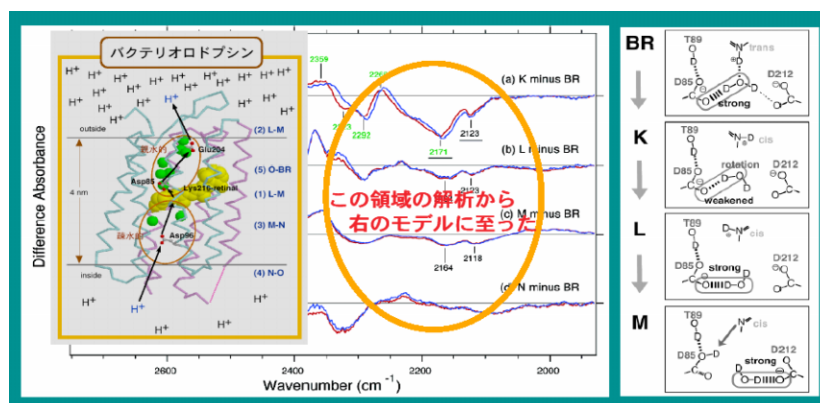
脂質膜(脂質:LH2 = 50000:1)
の蛍光画像

神取グループ

本研究では、バクテリオロドプシンを対象として、水素結合ネットワークを介した光駆動プロトンポンプ機構を、赤外分光を用いて解明し、将来的には、水溶液中における情報伝達を活用した機能性材料などのナノソフトマシンの創製の設計指針を与えることを目指している。

本研究では、バクテリオロドプシンを対象として、水素結合ネットワークを介した光駆動プロトンポンプ機構を赤外分光を用いて解明し、将来的には、水溶液中における情報伝達を活用した機能性材料などのナノソフトマシンの創製の設計指針を与えることを目指している。本年度は、低温偏光赤外分光をバクテリオロドプシンの光反応中間体に適用し、蛋白質内部でのプロトン移動にとって中心的な役割を演じる水分子の水素結合変化を測定した。特に、プロトン移動が実際に起こる後期中間体に対する測定条件を確立し、負電荷に水和した水分子がプロトン移動の過程でその水素結合をどのように変化さ

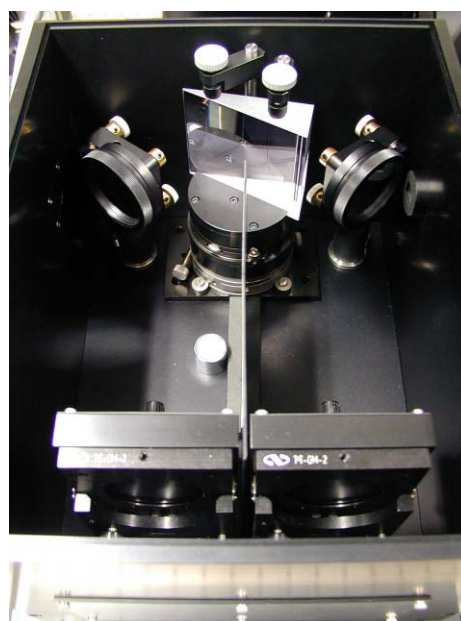
せるのか、実験的に検討できる測定系を構築した。その結果、最初のプロトン移動に伴って、1個の内部結合水が水和構造を2つのアスパラギン酸の間で変化させることを見出した。我々が「水和スイッチモデル」と呼ぶプロトン移動のモデルは、蛋白質内部での具体的なプロトン移動のモデルとして、世界で最初のものとして位置付けることができる。



水谷グループ

酵素で起きる反応においては、活性部位が反応の触媒として働いていると同時に、その残りの部分は媒質として反応が生理的に期待される方向へ起こるよう助けている。さらにタンパク質の立体構造は溶媒である水から静的・動的両面において大きな影響を受けている。タンパク質と水とが動的にどのように結びついているかという問題は、生命活動における水の役割を考えるうえで大変重要である。本研究では、ヘムタンパク質のひとつであり基礎的データが揃っているミオグロビンを対象として、高次構造変化と水和構造の変化の動的相関を調べる。その活性部位であるヘムでのリガンド脱離に伴い、高次構造と水和構造がどのように変化するかについて、スペクトル変化をピコ秒の時間刻みで追跡する。リガンド脱離に伴ってタンパク質が異方的に構造変化することに着目して、水和殻にある水分子のラマンスペクトルを選択的に抽出する。水和構造のダイナミクスと、紫外共鳴ラマン分光法から得られたタンパク質の構造ダイナミクスとを比較して、活性部位を取り巻く2つの媒質であるタンパク質と水とが、機能発現において動的にどのような相関関係を持っているかを明らかにする。

200-250 nmの紫外光を用いると、タンパク質中の芳香族アミノ酸残基や骨格のペプチド結合の共鳴ラマンスペクトルを観測できる。さらに、時間分解測定を行うことによって、スペクトル変化を



本研究で製作したフィルター前置分光

もとに、タンパク質の動的な構造情報が得られる。しかし、ピコ秒紫外パルスを使った時間分解共鳴ラマン分光法は技術的に未開拓であり方法論の確立を要する。そこで、安定なピコ秒紫外パルス光源の開発、高スループットのフィルター分光器の製作の2点を中心に分光装置の開発を行った。まず、高調波発生および誘導ラマン散乱（水素ガスあるいはメタンガス）を利用して、205-245 nmの範囲で連続波長可変なピコ秒パルス光源を製作した。また、リトロプリズムを用いたフィルター前置分光器（F3.5）を自作し、これをシングル分光器（F4.0）と組み合わせることで、レーリー散乱光やトリプトファンによる蛍光を除去し微弱なラマン散乱光を高感度で検出する検出系を製作した。この装置を用いて、アミノ酸水溶液および種々のヘムタンパク質を対象にテスト測定を行った。

3. 研究実施体制

富永グループ

研究分担グループ長：富永圭介（神戸大学分子フォトサイエンス研究センター、教授）

研究項目：新規な時間分解赤外分光法による状態相関と反応の特異性

富宅グループ

研究分担グループ長：富宅喜代一（神戸大学理学部、教授）

研究項目：金属イオンを含むクラスター・生体分子の電子状態及び構造の多様性

鏑木グループ

研究分担グループ長：鏑木基成（神戸大学大学院自然科学研究科、教授）

研究項目：膜貫通型タンパク質における電子伝達系の構造・機能解析と生理機構

松下グループ

研究分担グループ長：松下道雄（東京工業大学理学部、助教授）

研究項目：単一分子分光による酵素タンパク質の構造揺らぎと機能

神取グループ

研究分担グループ長：神取秀樹（名古屋工業大学工学部、教授）

研究項目：水素結合ネットワークを介した光駆動プロトンポンプの解明

水谷グループ

研究分担グループ長：水谷泰久（神戸大学分子フォトサイエンス研究センター、助教授）

研究項目：機能発現における水とタンパク質の動的相関

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- “Vibrational Population Relaxation and Dephasing Dynamics of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in D_2O with Third-Order Nonlinear Infrared Spectroscopy”, K. Ohta, H. Maekawa, and K. Tominaga, *J. Phys. Chem. A* 108 (No. 8), 1333–1341 (2004). (2004, February 26).
- “Vibrational Population Relaxation and Dephasing Dynamics of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in Water: Deuterium Isotope Effect of Solvents”, K. Ohta, H. Maekawa, and K. Tominaga, *Chem. Phys. Lett.* 386 (No. 1-3), 32–37 (2004). (March 1, 2004)
- S. Nonose, H. Tanaka, N. Okai, T. Shibakusa, and K. Fuke, “Structure and Reactions of Biomolecular Ions Produced with Electrospray Ionization”, *Eur. Phys. J. D24*, 335–338 (2003).
- N. Okai, A. Takahata, M. Morita, S. Nonose, and K. Fuke, “Ultrafast Relaxation Process of Excited-State NH_4 Radical in Ammonia Clusters”, *J. Phys. Chem. A* 108, 727–733 (2004).
- N. Okai, A. Takahata, and K. Fuke, “Electronic Structure, Stability, and Formation Dynamics of Hypervalent Molecular Clusters: $\text{CH}_3\text{NH}_3(\text{CH}_3\text{NH}_2)_n$ ”, *Chem. Phys. Lett.* 386, 442–447 (2004).
- M. Nakamura, F. Takeuchi, M. Tsubaki, “Cytochrome b561 is not fatty acylated but acetylated at the amino terminus in the chromaffin vesicle membranes: An approach for identification of the post-translational modification of transmembrane proteins”, *Protoplasma* 221 (2003) 41–46.
- T. Takigami, F. Takeuchi, M. Nakagawa, T. Hase, M. Tsubaki, “Stopped-flow analyses for the reaction of ascorbate with cytochrome b561 purified from bovine chromaffin vesicle membranes”, *Biochemistry* 42 (2003) 8110–8118.
- M. Tsubaki, T. Takigami, Y. Seike, F. Takeuchi, “Transmembrane electron transfer in the neuroendocrine vesicles: The ascorbate-cytochrome b561 system”, *Curr. Topics Biochem. Res.* 5 (2003) 91–103.
- M. Tsubaki, T. Takigami, Y. Seike, F. Takeuchi, “Transmembrane electron transfer catalyzed by cytochrome b561: Conserved properties and extending roles”, *Rec. Res. Develop. Biochem.* 4 (2003) 39–52.
- Y. Seike, F. Takeuchi, M. Tsubaki, “Reversely-oriented cytochrome b561 in reconstituted vesicles catalyzes transmembrane electron transfer and supports extravesicular dopamine β -hydroxylase activity”, *J. Biochem.* 134 (2003) 859–867.
- F. Takeuchi, H. Hori, E. Obayashi, Y. Shiro, M. Tsubaki, “Properties of two distinct heme centers of cytochrome b561 from bovine chromaffin vesicles:

Redox titration, EPR, and resonance Raman studies” , J. Biochem. 135 (2004) 53-64.

- M. Shibata, T. Tanimoto and H. Kandori, “Water Molecules in the Schiff Base Region of Bacteriorhodopsin” , J. Am. Chem. Soc. 125, 13312-13313 (2003).
- T. Iwata, D. Nozaki, S. Tokutomi, T. Kagawa, M. Wada and H. Kandori, “Light-Induced Structural Changes in the LOV2 Domain of Adiantum Phytochrome3 Studied by Low-Temperature FTIR and UV-Visible Spectroscopy” , Biochemistry 42, 8183-8191 (2003).
- T. Tanimoto, Y. Furutani and H. Kandori, “Structural Changes of Water in the Schiff Base Region of Bacteriorhodopsin: Proposal of a Hydration Switch Model” , Biochemistry 42, 2300-2306 (2003).

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：0件）