

「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、新規な分子分光法を開発し、自己組織化された系における構造安定性や機能発現を分子論的なレベルから解明することを目的とする。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。装置開発に関しては 16 年度でほぼ終了しており、17 年度は、装置の更なる性能向上とそれらを用いた測定実験に力点をおいてきた。新しい分光装置としては、超短パルスレーザー分光装置、生体分子分光解析装置、単一分子分光装置などであり、自己組織化された系における構造安定性や反応ダイナミクスについて興味あるデータを得ている。

2. 研究実施内容

富永グループ

(1) 可視ポンプー赤外プローブ分光法の開発とバクテリオロドプシン光反応初期過程の解明

ポンプープローブ分光装置にマルチチャンネル検出器を導入し、赤外領域における時間分解スペクトルの測定装置の構築を行い、時間分解スペクトル測定が可能となった。従来の分光器のグレーティングを回しながら測定する方法にくらべ測定時間を数十倍短くすることができる。現在、さらにソフトウェアの調整などを行っており、18 年度の早期に時間分解スペクトル測定実験を軌道に乗せる予定である。16 年度フィルム状のバクテリオロドプシンを試料として用いた場合、フェムト秒パルスによるサンプルの退色の問題があることを報告したが、回転セルの使用や励起光強度依存性の調査など、いくつかの点について検討したが、この退色の問題を解決するには至らなかった。そこで、神取グループと議論を重ね、フィルム状のバクテリオロドプシンを用いるのではなく、今後は溶液状態の試料をフローして実験を行うこととした。

(2) 赤外ポンプープローブ法による非水素結合性液体における振動ダイナミクス

赤外短パルスを用いたポンプープローブ法により、非水素結合性液体における溶質分子の励起振動状態の寿命を求めた。我々は水素結合性液体における溶質の揺らぎの問題を扱っ

ており、それをさらに深めるために非水素結合性液体の研究を行っている。その結果、水素結合性液体と非水素結合性液体では、赤外吸収スペクトルの幅と寿命に逆相関があることを見出した。これは、溶質の振動モードと溶媒の微視的な相互作用の一側面を表しているものであり、さらにこれを進めるために現在非水素結合性液体における 3-パルスフォトンエコーの実験を準備し振動数揺らぎの相関関数を求める予定でいる。

(3) 赤外ポンププローブ法による水素結合性錯体の振動ダイナミクス

赤外ポンププローブ法の応用として水素結合性錯体における振動ダイナミクスの測定を行った。水素結合は自己組織化において最も基本となる相互作用であり、モデル化合物である水素結合性錯体を選びその構造安定性や揺らぎについて調べる。四塩化炭素中におけるフェノールとベンズニトリルやアセトンなどの塩基との錯体の OH 伸縮振動モードの振動数及び励起状態ダイナミクスの錯体形成による変化を観測した。錯体形成により振動エネルギー緩和がどのように影響を受けるか興味深い結果を得ることができた。

(4) テラヘルツ電磁波分光による分子間相互作用と動的揺らぎ

無極性溶媒中における極性溶質分子の系のテラヘルツスペクトルを測定・解析を行ったところ、溶質の配向緩和に從來観測されてきた流体力学的な緩和成分以外にライブレーション的な振動成分が存在することを示した。また、既存の FT-IR 分光器を改良し、観測波数領域の低波数極限を 50 cm^{-1} とした。さらに、光伝導スイッチによるテラヘルツ波の発生と検出による装置を導入・構築した。この装置の観測波数領域は、 3 cm^{-1} 以上であり、既存のテラヘルツ電磁波分光装置とあわせて 3 cm^{-1} 以上の端数領域すべてをカバーすることができるようになった。

(5) 逆ミセル内ウォータープール中における反応と緩和

ナノメートルサイズにおける制限空間効果や界面からの影響が溶質分子の緩和や反応にどのような影響を及ぼすかということを時間分解蛍光スペクトルにより調べる。本年度は、瀬恒教授と協力し、長鎖アルキル基を持つ両親媒性のクマリン分子の合成に成功し、逆ミセルウォータープール内で観測されるナノ秒の遅い溶媒和ダイナミクスの成分が溶質の並進拡散によるものであることを示した。

(6) 大環状化合物の合成と分子認識 (担当：瀬恒)

生体関連物質の分子認識に関する基礎的知見を蓄積するとともにその応用の可能性を提示する事を目的として、アミノ酸や糖のキラリティーを可逆的に転写することのできる新しい分子システムの開発を進めている。このような分子を開発することにより、その相互作用をゲスト分子に固有のスペクトル領域の枠外、即ち、可視領域で観測することが可能となる。このことは、種々の生体分子が混在する生体系において、特定のゲストを鋭敏に検知できるという点で有益である。平成 17 年度はこれまでに合成した拡張ポルフィリン系分子システムの分子キラリティーの可逆的変換に関する速度論的検討を行った。コアとなる π 電子系に導入される置換基の位置により、分子キラリティーの変換速度が大きく影響されることを見いだした。次に、アミノ酸誘導体を含む光学活性カルボン酸によって拡

張ポルフィリン系分子システムがプロトン化を受け、可視吸収スペクトルが大きく変化すると同時に、その可視吸収バンドの位置に誘起CDシグナルを与えることを見いだした。拡張ポルフィリン系分子がプロトン化されるだけではポルフィリン π 電子系に不斉は見られない筈であるので、共役塩基であるカルボキシレート部の不斉が π 電子系に転写されたことを示している。種々のカルボン酸を用いてその構造と誘起CDシグナルの形状との相関についてデータの蓄積を行った。例えば、マンデル酸の鏡像体を用いることにより、誘起CDシグナルは反転することも確認した。

富宅グループ

(1) 生体分子分光解析装置の開発

ポリペプチド、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、新たに温度制御が可能なイオントラップを備えた生体分子分光解析装置の製作を進めている。平成17年度は前年度に始まった装置製作を完了し、解析装置の温度制御を含めた基礎的性能を調べ、実用化への検討を行った。具体的には、トラップに捕捉したイオンの構造を分光学的に調べる目的で、トラップで冷却された水和金属イオンの分光実験を行い、冷却能を詳細に検討した。この結果、室温から30K付近まで捕捉イオンの制御が可能なことを確認した。これらの開発と並行して、レーザーアブレーションを用いたポリペプチドイオンの生成源の開発を行った。またナノ秒赤外レーザーの試作と分光解析部の設計、製作を行い、水和ペプチドの分光測定の実験を進めている。

(2) 媒和金属イオンクラスターの構造と反応性

生体分子の構造と関連深いMgやCa原子とそのイオンの溶媒和過程について、レーザー分光法を駆使して構造と反応性の検討を行った。前年度に見出した $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_n$ 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_n$ の自発的イオン化を示唆するイオン化ポテンシャルの収束現象(3.1 eV)を電子構造の視点から明らかにするために、光解離分光法を用いた電子スペクトルの測定を行い、金属原子の水クラスター内での溶解過程を明らかにした。

鏑木グループ

(1) 大腸菌大量発現系により得られた膜結合型ヒトチトクロム b_5 の人工リポソーム膜への結合・埋込みの条件を解析した。チトクロム b_5 は他の膜タンパク質とは異なり、細胞質の遊離型リポソームでのタンパク合成終了後にそのC末端の疎水性TA-ドメインが単独でER膜に入り込み、膜貫通することが明らかにされている。今回、リポソーム膜に再構成させたチトクロム b_5 が細胞内ER膜に結合しているチトクロム b_5 と同一のトポロジーを持つことを確認した。この場合、自動的なリポソーム膜への結合と引き続くC末端部分の膜貫通移動が起こっていることになる。さらに、リポソームとコムギ胚芽由来無細胞タンパク合成系を利用した膜タンパク質合成実験を開始した。

(2) 植物トウモロコシに由来するチトクロム b_{561} の安定な発現系を酵母 *Pichia pastoris* にお

いて構築し、発現したタンパク質の高純度精製方法の確立に成功した。さらに、細胞質側に位置し AsA との相互作用に関与していると思われる保存性アミノ酸残基(Lys83, Arg72)の部位特異的変異体の発現と精製に成功した。現在、生化学的・生物物理的解析を行っている。野生型は AsA からの電子受容能があることを確認した。

(3) Blue-Native PAGE の手法を利用した二次元電気泳動、免疫化学的手法、及び MALDI-TOF-MS を中心としたタンパク質化学解析により、ウシクロマフィン小胞におけるタンパク質間相互作用の詳細な解析を行い、チトクロム b_{561} の C 末端親水性部分が相互作用に重要な役割を果たしていることを見いだした。現在、融合タンパク質として大腸菌で発現させたこの C 末端部分をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィー法により、相互作用しているタンパク質を分離・同定しようとしている。

松下グループ

近赤外領域の蛍光を用いた光合成アンテナ複合体の単一分子分光では装置の SN 比を 5 倍ほど改善した。このため励起レーザー光の影響がないところまで励起光強度を弱めることが出来るようになり、5 K という極低温でもタンパク質の構造が揺らいでいることを観測した。またアンテナ複合体を脂質膜中に導入する過程を再検討して、膜断片に取り込まれるアンテナ複合体の数を最適化した。これにより信頼できる統計を取る事が出来るようになり、X 線結晶構造では円、ミセル中では楕円だったアンテナ複合体 LH2 が、脂質膜中でも円ではなく楕円だということが分かった。

紫外・可視領域では、16 年度に導入したフェムト秒近赤外レーザーを光源とした多光子蛍光顕微鏡を立ち上げた。単一分子検出を前提としているので、共焦点工学系を組み、色収差をなくすために励起光と信号光に共通な部分のレンズを放物面鏡に置き換えた。放物面鏡を用いているが 1 度程度のビームスキャンには問題なく、 $f = 2.5 \text{ mm}$ の対物レンズで焦点面上 $100 \mu\text{m}$ 四方を走査することができる。色素ビーズなどは問題なく観測できており、背景光を減らして検出感度を高め、一分子レベルの観測をめざしている。

神取グループ

本研究では、バクテリオロドプシンなどのレチナール蛋白質を対象として、水素結合ネットワークを介した光駆動ポンプ機構を赤外分光により解明し、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創製の設計指針を与えることを目指している。前年度までに、低温偏光赤外分光を光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシンに適用し、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やレチナールシッフ塩基、アルギニン側鎖などの水素結合変化を明らかにしている。本年度は同様の手法を用いて以下の成果が得られた。

系統的なアミノ酸変異を導入することで、バクテリオロドプシン内部に存在する水分子の水素結合状態を、赤外の伸縮振動として完全に帰属することができた。

光駆動クロライドイオンポンプであるハロロドプシンのポンプ機構を明らかにするため、レチナールを結合するリシン側鎖に対する同位体標識試料を用いることでレチナールシッフ塩基の水素結合変化を明らかにした。水分子の水素結合変化と併せて、クロライドポンプに関する新しいモデルを提唱した。Biochemistry 誌に掲載されたこの論文は、米国化学会の Hot Article に選定されている。

またバクテリオロドプシン同様にプロトンを能動輸送する呼吸鎖酵素オキシデースの研究を行い、チロシンの水素結合変化に由来する信号を検出することに成功した。

水谷グループ

(1) ミオグロビンのリガンド脱離に伴うタンパク質構造変化

ミオグロビン (Mb) のリガンド脱離に伴う構造変化を、ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法を用いて調べた。昨年度の段階で、チロシンおよびトリプトファン残基の構造変化をとらえることに成功している。今年度はまず、高い S/N 比を得るための紫外プローブ光波長の最適化を行った。これによって、スペクトル変化の時定数を求められるレベルにまで、S/N 比が向上した。また、人工変異体を用いて、スペクトル変化を示すトリプトファン残基の同定を行った。

(2) ミオグロビン中の水素結合ネットワークとダイナミクス

Mb 中で、ヘムはプロピオン酸基によって周囲のアミノ酸残基と水素結合ネットワークを作っている。本研究では、Mb の振動エネルギー緩和におけるプロピオン酸基の影響について調べた。ヘムの側鎖にプロピオン酸基をもたない再構成ミオグロビン(rMb)を調製し、そのアンチストークスラマンバンド強度変化をもとに、振動エネルギー緩和速度を求めた。その結果、rMb では Mb に比べて、緩和速度は遅いということが明らかになった。このことは、Mb のヘムの振動エネルギー緩和経路に、プロピオン酸基が関わっていることが示しており、ヘムから溶媒である水への直接の緩和経路が存在することを示唆している。

3. 研究実施体制

「富永」グループ

- ①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）
- ②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

- ①研究分担グループ長：富宅 喜代一（神戸大学理学部、教授）
- ②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

「鰐木」グループ

- ①研究分担グループ長：鰐木 基成（神戸大学大学院自然科学研究科、教授）

②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

「神取」グループ

①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）

②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

「松下」グループ

①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）

②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

「水谷」グループ

①研究分担グループ長：水谷泰久（分子フォトサイエンス研究センター、助教授）

②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

(1) 論文（原著論文）発表

- K. Yamamoto, Md. H. Kabir, M. Hayashi, and K. Tominaga, “Low-Frequency Spectra of the Hexamethylbenzene/Tetracyanoethylene Electron Donor-Acceptor Complexes in Solution Studied by Terahertz Time-Domain Spectroscopy”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 1945-1952, (2005).
- P. Sen, T. Satoh, K. Bhattacharyya, and K. Tominaga, “Excitation Wavelength Dependence of Solvation Dynamics of Coumarin 480 in Dimyristoyl-phosphatidylcholine Vesicle”, *Chem. Phys. Lett.* **411**, 339-344 (2005).
- K. Yamamoto, K. Tominaga, H. Sasakawa, A. Tamura, H. Murakami, H. Ohtake, and N. Sarukura, “Terahertz Time-Domain Spectroscopy of Amino Acids and Polypeptides”, *Biophys. J.* **89**, L22-L24 (2005).
- H. Maekawa, K. Ohta, and K. Tominaga, “Vibrational Dynamics in Liquids Studied by Nonlinear Infrared Spectroscopy”, *Res. Chem. Intermed.* **31**, 703-716 (2005).
- “Terahertz Time-Domain Spectroscopy of Sulfur-Containing Biomolecules”, K. Yamamoto, Md. H. Kabir, and K. Tominaga, *J. Opt. Soc. Am. B* **22**, 2417-2426 (2005).
- M. Tsubaki, F. Takeuchi, and N. Nakanishi, “Cytochrome b561 Protein Family: Expanding Roles and Versatile Transmembrane Electron Transfer Abilities as Predicted by a New Classification System and Protein Sequence Motif Analyses”, *Biochim. Biophys. Acta*, **1753**, 174-190 (2005).
- F. Takeuchi, H. Hori, and M. Tsubaki, “Selective Perturbation of the Intravesicular Heme Center of Cytochrome b561 by Cysteinyl Modification with 4,4'-Dithiodipyridine”, *J.*

- Biochem.* **138**, 751-762 (2005).
- H. Kandori, H. Nakamura, Y. Yamazaki and T. Mogi, "Redox-induced Protein Structural Changes in Cytochrome bo Revealed by Fourier-transform Infrared Spectroscopy and ¹³C-Tyr-labeling", *J. Biol. Chem.* **280**, 32821-32826 (2005).
 - Jun-ichiro Setsune, Aki Tsukajima, and Junko Watanabe, "Synthesis of isocorrole and the higher homologues", *Tetrahedron Letters*, 2006, **47**, 1817-1820.
 - Nobuhiro Okai, Shinji Yoshida, Kengo Aranishi, Akihiro Takahata, and Kiyokazu Fuke, "Multiphoton Ionization and Oxidation Processes of Mg-Ammonia Clusters", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 921-929 (2005).
 - Shinji. Nonose, Sakie Iwaoka, Keisuke Mori, Yohei Shibata, and Kiyokazu Fuke, "Structures and Reactions of Hydrated Biomolecular Cluster Ions", *Europ. Phys. J. D.* **34**, 315-319 (2005).
 - Akimasa Fujihara, Chiyoko Miyata, and Kiyokazu Fuke, "Microscopic Dissolution Process of Na₃ in Water Clusters ", *Chem. Phys. Lett.* **411**, 345-349 (2005).
 - A. Asada, H. Orii, K. Watanabe, and M. Tsubaki, "Planarian peptidylglycine-hydroxylating monooxygenase, a neuropeptide processing enzyme, colocalizes with cytochrome b561 along the central nervous system", *FEBS Journal* **272**, 942-955 (2005).
 - D. Nozaki, T. Iwata, S. Tokutomi and H. Kandori, "Water Structural Changes in the Activation Process of the LOV2 Domain of Adiantum Phytochrome3", *J. Mol. Struct.* **735/736**, 259-265 (2005).
 - Y. Sato, T. Iwata, S. Tokutomi and H. Kandori, "Reactive Cysteine is Protonated in the Triplet Excited State of the LOV2 Domain in Adiantum Phytochrome3", *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1088-1089 (2005).
 - M. Shibata and H. Kandori, "FTIR Studies of Internal Water Molecules in the Schiff Base Region of Bacteriorhodopsin", *Biochemistry* **44**, 7406-7413 (2005).
 - T. Iwata, D. Nozaki, S. Tokutomi and H. Kandori, "Comparative Investigation of the LOV1 and LOV2 Domains in Adiantum Phytochrome3", *Biochemistry* **44**, 7427-7434 (2005).
 - D. Nozaki, T. Iwata, S. Tokutomi and H. Kandori, "Unique Temperature Dependence in the Adduct Formation between FMN and Cysteine S-H Group in the LOV2 Domain of Adiantum Phytochrome3", *Chem. Phys. Lett.* **410**, 59-63 (2005).
 - T. Iwata, S. Tokutomi and H. Kandori, "Mechanism of Photoactivation in the LOV2 Domain of Adiantum Phytochrome3", *Recent Res. Devel. Biochem.* **6**, 1-26 (2005).
 - Akira Sato and Yasuhisa Mizutani, "Picosecond Structural Dynamics of Myoglobin following Photodissociation of Carbon Monoxide As Revealed by Ultraviolet Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy", *Biochemistry* **44**, 14709-14714 (2005) .
 - Hitomi Sawai, Masatomo Makino, Yasuhisa Mizutani, Takehiro Ohta, Hiroshi Sugimoto,

Tadayuki Uno, Norifumi Kawada, Katsutoshi Yoshizato, Teizo Kitagawa, and Yoshitsugu Shiro, "Structural Characterization of the Proximal and Distal Histidine Environment of Cytoglobin and Neuroglobin", *Biochemistry* **44**, 13257-13265 (2005).

- Shigenori Nagatomo, Masako Nagai, Yasuhisa Mizutani, Takashi Yonetani, Teizo Kitagawa, "Quaternary Structures of Intermediately Ligated Hemoglobin and Influences from Strong Effectors; Resonance Raman Investigation", *Biophys. J.* **89**, 1203-1213 (2005).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：2 件）