第 1 回公開シンポジウム　開催報告

藤井 正明　（東工大資源研・総括班、事務局）

本特定領域研究の第 1 回公開シンポジウムが、平成 25 年 10 月 5 日（土）に、キャンパスイノベーションセンター東京（東京都港区芝浦）で開催された。本シンポジウムは、今年度発足する本特定領域研究の内容を、関連する研究分野の方々に広く知っていただくことを目的に開催されたものである。また、現在本領域の公募研究が募集されており、本シンポジウムはその説明会としての性格もあった。

最初に、田原太平領域代表から、本特定領域研究の全体についての説明が行われた。どのような考えで申請に至ったか、領域全体としてどのような研究を目指すのかが説明された。さらに、公募の方針について具体的な説明がなされた。続いて、北尾彰朗 A01 班班長、水谷泰久 A02 班班長、神取秀樹 A03 班班長から、各班の研究概要について説明が行われた。

休憩をはさみ、後半部では各研究項目から 1 名ずつ研究構想の発表が行われた。A01 項目からは森田明弘氏（東北大院理）が溶液・高分子の界面に関する理論研究の構想を紹介した。界面は従来実験が困難で未知の部分が多かったのであるが、田原代表の開発した新たな非線形分光法により一気に解明が進みつつある研究課題である。その理解にはシャープな理論が不可欠であり、森田氏の理論と計算により SFG 発生、界面輸送、反応場としての界面に関して最新の成果が講演された。

A02 項目からは、高橋聡氏（東北大多元研）が、一分子計測によるタンパク質のフォールディング運動に関する研究を発表した。高橋氏は様々な工夫を凝らした新たな顕微分光装置を用いてタンパク質のフォールディングの測定を行っており、20 マイクロ秒から数十秒に渡るタンパク質の運動を蛍光検出により観測に成功している。一分子の選別装置との結合など野心的な研究構想も提示され、多くの質問が向けられた。

A03 項目からは村橋哲郎氏（分子研）が柔らかな有機多核金属複合体の創成に関する研究が講演された。近年様々な構造の超分子錯体が創成されているが、できるだけ弱い結合相互作用を用いる点がポイントである。ここではπ−配位結合を連続させるという新たな着想で創成された例が報告された。この連続多点π配位結合は交換、スライドなど特異な動的な挙動があることが明らかになっており、まさしく柔らかな分子系であり、多くの質問が出された。発表の後には研究交流会が開かれ、そこでも参加者の間で熱い討論が続けられた。

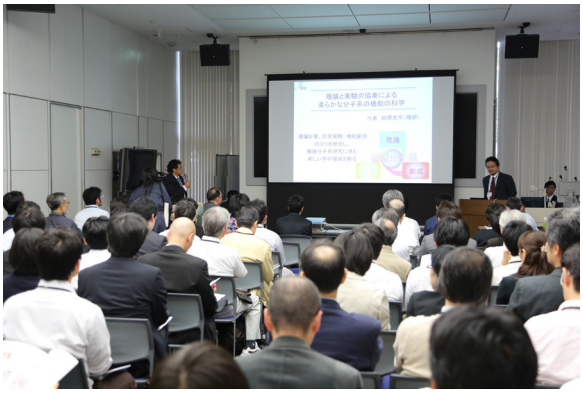
シンポジウムのプログラムは以下のとおりであった。

プログラム

14:00	本特定領域研究のねらい （経過、研究構想、公募方針） 田原　太平（理研）
14:25	A01 柔らかな分子系解析項目について 北尾　彰朗（東大分生研）
14:50	A02 柔らかな分子系計測項目について 水谷　泰久（阪大院理）
15:15	A03 柔らかな分子系計測項目について 神取　秀樹(名工大)
15:40	コーヒーブレイク
16:10	研究構想 1　森田　明弘（東北大院理）
16:40	研究構想 2　高橋　聡（東北大多元研）
17:10	研究構想 3　村橋　哲郎（分子研）
17:40	まとめ
18:00-	研究交流会

シンポジウムには研究者、大学院生、合わせて 152 名の参加があった。会場には立ち見が出るほどの盛況であり、本新学術領域研究に対する分野の興味の強さを象徴していた。

最後に、シンポジウムの開催、進行をお手伝いいただいた、東工大分光化学部門のスタッフ、秘書、大学院生のみなさんに事務局を代表して深く感謝する。



業績紹介：二次元蛍光寿命相関分光法の開発

石井 邦彦　（理研・A02 計画研究分担者）
田原 太平　（理研・A02 計画研究代表者）

論文題目："Two-Dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. 1. Principle"
著者：Kunihiko Ishii and Tahei Tahara
雑誌巻号：*J. Phys. Chem. B* **117**, 11414-11422 (2013).
論文題目："Two-Dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. 2. Application"
著者：Kunihiko Ishii and Tahei Tahara
雑誌巻号：*J. Phys. Chem. B* **117**, 11423-11432 (2013).

上記 2 報の論文は、我々が数年にわたって開発を進めてきた二次元蛍光寿命相関分光法（2D-FLCS）の原理と実際についてまとめたものである。我々の研究は、「単一分子分光法を使えば複雑な分子の自発的な構造変化をリアルタイムで追跡できるのではないか？」という発想を出発点としている。顕微分光関連技術の発展により、このような実験は実現不可能ではなくなってきているが、単一分子レベルでの分光実験から有意な分子情報を得ることは依然として難しく、時間分解能・状態分解能などの点で大きな制限がある。我々は以前に、一分子の蛍光信号から可能な限り多くの情報を得る目的で時間相関光子計数法（TCSPC）を導入し、蛍光寿命の揺らぎの相関関数を計測する方法を報告した[1]。しかし、複数の状態が関与する複雑なダイナミクスに対して、状態選別的に高い時間分解能で構造変化を解析することはできていなかった。

本論文では、TCSPC を用いた蛍光相関分光データの包括的な解析方法を提案し、その有用性を実際の実験データに即して検討した。アイディアの核心は、蛍光強度の２点相関関数を各光子の励起 - 発光遅延時間を用いて二次元展開することで、情報ロスのない解析を可能にした点にある。このようにして得られる二次元マップには、異なる蛍光寿命をもつ状態間の相関の情報が完全に保存されている。後はこのマップを適切に解析して各状態の寄与を分離すれば、蛍光相関分光法が本来持つマイクロ秒以下の時間分解能で状態選別的に構造変化を解析することができることになる。

この着想を得たのは 2009 年春のことで、その後二次元展開法についての短い論文を一報出したが[2]（この論文は受理されるまでに二度他誌でリジェクトされた）、完全な形でフルペーパーにまとめるまでに 4 年を費やした。これは主に、二次元マップの適切な解析法の確立に時間を要したためである。特に、重なり合った蛍光減衰曲線を指数関数減衰成分の和に変換する逆ラプラス変換（これにより各状態の寄与を可視化できる）の不安定性に手を焼き、結局最大エントロピー法、行列ランクの制限、グローバルフィッティングを組み合わせた独自の解析法を作り出すことで信頼できる結果を得ることができた。論文を 2 報に分けたのはこのためであり、“2. Application”のかなりの部分がこの解析法の説明に向けられている。図には、これによって得られたヘアピン DNA の開閉ダイナミクスの観測結果を示している。苦労の甲斐あって、この 2 報の論文は 2 名の査読者に高く評価され、2 報とも改訂なしで受理されることとなった。

本論文で 2D-FLCS の基本的な骨格はほぼ完成したが、ここでターゲットにしている複雑な分子の自発的な構造変化は、本学術領域の中心的なテーマの一つになると予想される。今後本学術領域で 2D-FLCS を応用した柔らかな分子系の研究とそのための手法の拡張を進めていく計画である。

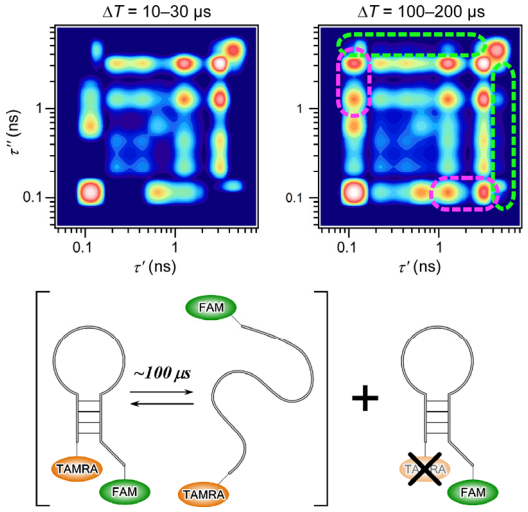


図　2D-FLCS によるヘアピン DNA の測定結果．二次元蛍光寿命相関マップの時間変化（上図）とその解釈（下図）．

引用文献

[1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **114**, 12383-12391 (2010).
[2] K. Ishii and T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* **519-520**, 130-133 (2012).

業績紹介：ヘモグロビンの Perutz 機構のリアルタイム観測に成功

石川 春人　（阪大院理・A02 計画研究分担者）
水野 操　（阪大院理・A02 計画研究分担者）
水谷 泰久　（阪大院理・A02 計画研究代表者）

論文題目："Intersubunit communication via changes in hemoglobin quaternary structures revealed by time-resolved resonance Raman spectroscopy: Direct observation of the Perutz mechanism"
著者：Kenta Yamada, Haruto Ishikawa, Misao Mizuno, Naoya Shibayama, and Yasuhisa Mizutani
雑誌巻号：*J. Phys. Chem. B* **117**, 12461–12468 (2013).

ヒトヘモグロビンは赤血球に含まれる酸素運搬体タンパク質で、αおよびβサブユニットが 2 つずつ会合した四量体構造をとっている。その酸素運搬に重要な性質は協同的酸素親和性であり、その発現機構の理解には、ひとつのサブユニットで起きた構造変化が隣接したサブユニットにどのように伝搬するかを明らかにすることが必要である。われわれは、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、サブユニット間の構造変化の伝搬を観測することに成功した。

本研究では、サブユニット間を伝播する構造変化を追跡するために、αサブユニットのヘムはそのまま（Fe ヘム）で、βサブユニットのヘムを Ni ヘムに置換した、混成ヘモグロビンを作製し、測定に用いた。この混成ヘモグロビンはダイナミクス観測のうえで 2 つの利点をもっている。ひとつは Fe ヘムとは異なり、Ni ヘムには酸素や一酸化炭素などのガス分子リガンドが結合しないという点である。ヘモグロビンの構造ダイナミクス研究では、ヘムに結合した一酸化炭素が光励起によって解離するという性質を利用し、リガンド解離をトリガーとした構造変化を追跡するやり方が一般的である。混成ヘモグロビンを用いることで、Fe ヘムを含みリガンドの光解離が起きるサブユニットと Ni ヘムを含みリガンドの光解離の起きないサブユニットをヘムグロビン分子内に共存させることができ、サブユニット間の構造変化の伝搬を調べることができる。もうひとつは、Fe ヘムと Ni ヘムとは吸収帯の極大波長が 20 nm 近く異なるので、共鳴効果によって、ヘモグロビン分子内で 2 種類のサブユニットを選択的に観測可能であるという点である。混成ヘモグロビンがもつこれらの性質を利用すると、αサブユニットでリガンドの光解離を起こし、それによって生じたαサブユニットでの構造変化がβサブユニットへどのように伝搬するかをサブユニット選択的に観測することができる。

時間分解共鳴ラマンスペクトルには、Fe ヘム由来のバンドおよび Ni ヘム由来のバンドともに波数の変化が観測された。Fe ヘム由来のバンドの変化は、その時定数が通常のヘモグロビンから得られた値と一致し、これは Ni 置換がタンパク質ダイナミクスに影響を与えていないことを示している。また、Ni ヘムに由来するバンドの変化は、時定数を約 20 μs とする単一の指数関数でよくフィットできた。これは、αサブユニットでリガンド脱離後に起きた構造変化が、サブユニット接触部位を介してβサブユニットに約 20 μs で伝播することを意味する。また、ヘムとそれに配位したヒスチジン残基間の伸縮振動バンドには、2 種類のサブユニットに共通して時定数約 20 μs の変化があることも明らかになった。興味深いことに、過去の研究で、サブユニット接触部位にも時定数 20 μs の変化があることが報告されている。これらの時定数の一致は、サブユニット接触部位に変化が起きると四次構造が変化し、2 種類のサブユニットともにヘムとポリペプチド間の相互作用が同期して変化することを示している。これは、「四次構造の変化がヘムの酸素親和性に変化を与え、ヘモグロビンは協同性をもつ」とする Max Perutz が提案した協同性発現機構から予想される変化そのものであり、この機構をリアルタイム観測したものと考えることができる。

ヘモグロビンの協同性は、構造変化、すなわち分子の柔らかさが機能を生む典型例である。今後はこの研究を発展させ、構造変化の伝搬機構をより詳しく明らかにしていきたいと考えている。

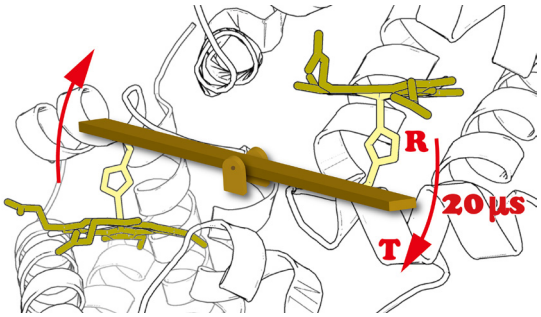


図 1. サブユニット接触部位に変化が起きると四次構造が変化し、2 種類のサブユニットともにヘムとポリペプチド間の相互作用が同期して変化することが、本研究から明らかになった。

業績紹介：配位結合性チューブによるフラーレンのキャッチ＆リリース

吉沢　道人（東工大資源研・A03 連携研究者）
林　重彦　（京大院理・A01 計画研究代表者）

論文題目："Facile Catch and Release of Fullerenes Using a Photoresponsive Molecular Tube"
著者：Norifumi Kishi, Munetaka Akita, Motoshi Kamiya, Shigehiko Hayashi, Hsiu-Fu Hsu, Michito Yoshizawa*
雑誌巻号：*J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 12976–12979.

ホスト-ゲスト化学において、狙いとするゲスト分子の選択的な内包と、必要なタイミングでのゲストの放出は、混合物から目的物の抽出プロセスや DDS の構築にとって極めて重要な機能である。しかしながら、溶媒の添加や加熱ではなく、クリーンな外部刺激（光照射など）によるゲストの放出は、これまで金属イオンなどに限られていた。

我々は最近、２つのアントラセン環を有する有機配位子 **1** と平面四配位型の Pd(II)イオンとの自己組織化により、M_2L_4 組成の配位結合性カプセルが定量的に生成し、それがフラーレン C_{60} を選択的に内包することを見出している[1,2]。今回、配位子 **1** と直線二配位型の Ag(I)イオンを用いることで、新規な配位結合性チューブ **2** によるフラーレン類の内包および光照射による放出に初めて成功した（図１）。

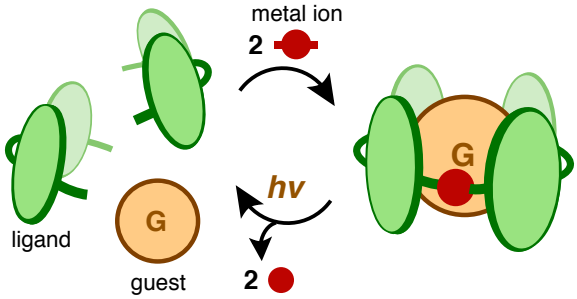


図１． 配位結合性チューブによるゲスト分子の内包と放出。

フラーレン C_{60} を内包した配位結合性チューブ **2**⊃C_{60} は、有機二座配位子 **1** と硝酸銀、C_{60} の３成分をアセトニトリル中、室温で撹拌するのみで収率良く生成した（図２）。配位子と硝酸銀のみの反応ではチューブが得られなかったことから、チューブの生成には C_{60} が鋳型として働いている。内包体の構造は NMR, ESI-TOF MS, UV-vis によって明らかにした。

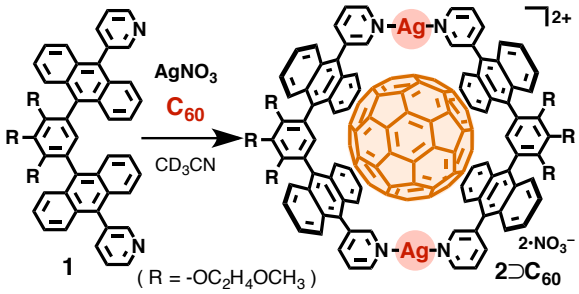


図２． ３成分の自己組織化による C_{60} を内包した配位結合性チューブの形成。

また、内包体 **2**⊃C_{60} の分子力場計算と DFT 計算により、その三次元構造および分光学的性質が明らかになった。その最安定化構造では、２つの配位子と２つの Ag(I)イオンからなる約 1 nm のチューブ状空間に、１分子の C_{60} が π−スタッキング相互作用により、隙間無く内包されていることが示された（図３）。

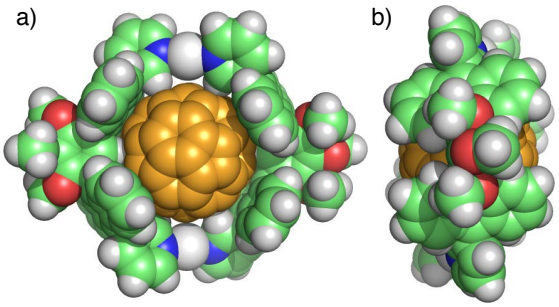


図３． C_{60} を内包した配位結合性チューブ **2** の最安定化構造：a) 正面および b) 側面図。

光照射による Ag(I)イオンから Ag(0)への光還元反応を利用して、配位結合性チューブからフラーレンの放出を達成した。実際に、C_{60} を内包したチューブ **2** のアセトニトリル溶液に室温で光を照射することで、チューブに内包された C_{60} は定量的に放出されることが明らかになった。さらに、チューブ **2** は既報のカプセル構造[1]と異なり、オープンエンドな筒型構造に由来して、官能基を有する C_{60} 誘導体の内包と光照射による放出が可能であることも明らかになった。

引用文献

[1] N. Kishi, M. Yoshizawa, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 11438-11441 (2011).
[2] N. Kishi, M. Yoshizawa, *et al.*, *Chem. Eur. J.* **19**, 6313-6320 (2013).

TSRC Workshop on Protein Dynamics 参加報告

北尾 彰朗　（東大分生研・総括班）

2013 年 8 月 5 日から 9 日まで行われた TSRC Workshop on Protein Dynamics に参加してきましたので、その様子をご報告します。TSRC（Telluride Science Research Center）Workshop は、米国 Colorado 州 Telluride で 1984 年から行われている分子科学のワークショップです。現在は 1-2 月と 6 月-8 月にかけて 40 件程度のワークショップが開催されているようです。通常は、クローズドな研究会で、30 名程度の参加者が未発表の研究成果も含めて時間をかけて密に議論を深めるという形をとります。Protein Dynamics のワークショップは今回一人あたり 45 分の持ち時間でしたが、中には参加者が 10 名程度で、一人当たり 2-3 時間かけて議論するワークショップもあるそうです。

Telluride は元々鉱山の開発に由来する山あいの町ですが、現在では高級スキーリゾートとして知られています。俳優の Tom Cruise が家をもっているなどセレブタウンとしても有名です。中心部は標高 2700m弱、周りを取り囲む山々は 3700-4300mの高地にありますので、通常月曜から始まり金曜で終了するワークショップの中間くらいに高山病の症状がひどくなる参加者が見受けられます。私自身は、初回の参加（2009 年）の際に高山病の症状が強かったことに懲りて、2 回目から高山病に効くという薬を携行してでかけています。

Protein Dynamics のワークショップは 2 年ごとに行われています。ワークショップの 4 人のオーガナイザー（日本 1 名、ヨーロッパ 1 名、米国 2 名）の内 1 名を 2007、2009 年は水谷泰久氏（阪大院理・総括班）が、2011、2013 年は私が務めました。日本からは、私以外に、片岡幹雄氏（奈良先端大）、水谷氏、林重彦氏（京大院理・計画研究代表者）、倭剛久氏（名大院理）、西坂崇之氏（学習院大理）が参加しました。また本領域の海外評価委員である Paul E. Champion 氏（Northeastern 大）と John E. Straub 氏（Boston 大）も Protein Dynamics ワークショップの常連であり、今回も参加されていました。

クローズドな会合であるため、個別の研究内容については述べませんが、全体の雰囲気はお伝えしたいと思います。研究に使われている手法としては、NMR・光ピンセットをはじめとする様々な 1 分子計測・分子動力学・QM/MM・理論モデル・時分割 X 線・中性子散乱・Mössbauer・蛍光・共鳴ラマンや様々な先端的な分光法がありました。歴史的な経緯もあって、分光や NMR の分野からの参加者が多いといえます。しかし、参加している研究者のほとんどは、複数の実験や実験－理論計算の共同研究をおこなっています。特に実験結果に対しては、ほぼ必ずそれに対応する理論計算の結果が示されるなど、理論と実験の協奏はタンパク質分野ではかなり進んでいるのが現状です。

分光や時分割関係の研究者が多いこともあり、光受容タンパク質や膜タンパク質を対象とした研究が多く見受けられました。また、水和とタンパク質ダイナミクスという古典的な話題も健在でした。水和に関しては、参加者それぞれが一家言あるということもあり、議論が盛り上がったのが印象的でした。また、いくつかの問題に関しては、異なる手法で得られた結果が一見矛盾しているように思われました。今後これらの問題がどう解明されていくのか楽しみです。

ワークショップは最後に 2 年後のオーガナイザーを決定して終了しました。次回の 2015 年は、倭氏（名大院理）がオーガナイザーを担当してくださいます。Telluride の町は小さいので、日本人からすると、どうしても食事のバリエーションが限られます。1 週間くらいがちょうどよい滞在期間で、終わってほっとしました。

水谷泰久氏（左：阪大院理・総括班）と林重彦氏（右：京大院理・計画研究代表者）。ワークショップが終わってほっとしたところ。