

業績紹介：揺らぎの定理による回転モーター V<sub>1</sub> のトルク測定

林 久美子（東北大・A01 公募研究代表者）

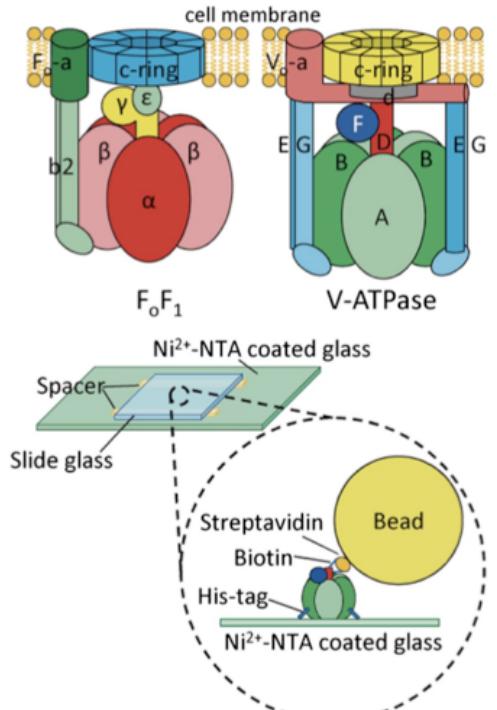
論文題目："F-subunit reinforces torque generation in V-ATPase"

著者：Jun-ichi Kishikawa, Akihiko Seino, Atsuko Nakanishi, Naciye Esma Tirtom, Hiroyuki Noji, Ken Yokoyama\* and Kumiko Hayashi\*

雑誌巻号：*Euro. Biophys. J.* **43**, 415-422 (2014).

V<sub>0</sub>V<sub>1</sub> は ATP 合成酵素 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> に類似した回転タンパク質モーターである(図 1)。V<sub>1</sub> 単独では ATP を加水分解したエネルギーで回転する。リング状の A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> サブユニット中で回転軸 DF 複合サブユニットが回転する。上記の論文では、リングや回転軸の相互作用を削った変異体の回転トルクを 1 分子計測した。トルク値の大小から、トルク発生に重要な相互作用部位を議論した。V<sub>1</sub> と 4 つの変異体（計 5 つ）のトルク比較によって(図 2)、回転軸の一部である F サブユニットがトルク発生において重要な役割を果たすことが分かった。

図 1 に実験系を示す。V<sub>1</sub> は 10 nm 程度と小さいため、300 nm 程度の回転プローブ(ビーズ)を付けて光学顕微

図 1 :F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> と V<sub>0</sub>V<sub>1</sub> (上)。回転アッセイの様子 (下)。

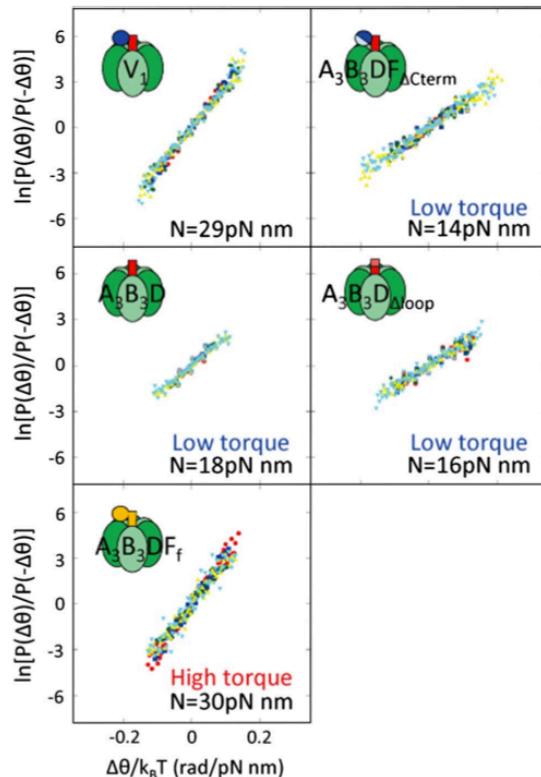
鏡で観察した。ビーズの重心から回転角度のタイムコース( $\theta(t)$ )を計算した。

非平衡統計力学とは、力が加えられたり、化学反応があったりして系にエネルギーが注入され続ける非平衡状態を扱う学問である。近年、この分野で揺らぎの定理や Jarzynski 等式などの非平衡揺らぎに関する新しい関係式が発見され、生体分子の実験で利用されてきた。私たちの研究グループは揺らぎの定理を用いた回転モーターのトルク(N)計測法を開発した[1]。

揺らぎの定理  $\ln[P(\Delta\theta)/P(-\Delta\theta)] = N \cdot \Delta\theta/k_B T$  ( $\Delta\theta = \theta(t+\Delta t) - \theta(t)$ )によると、図 2 のグラフの Y 軸( $\ln[P(\Delta\theta)/P(-\Delta\theta)]$ )と X 軸( $\Delta\theta/k_B T$ )の傾きが回転トルク値(N)である。これまで、この測定法は簡易で正確な測定方法として、回転モーターの様々な研究に応用されている[Kim et al. JBC 2011; Usukura et al. JBC 2012; Tanigawara et al. Biophys. J. 2012; Watanabe et al. JBC 2014; Kishikawa et al. Eur. Biophys. J. 2014]。

## 引用文献

- [1] K. Hayashi\*, H. Ueno, R. Iino and H. Noji\*, *Phys. Rev. Lett.* **104**, 218103 (2010).

図 2 :V<sub>1</sub> とその変異体(計 5 つ)に揺らぎの定理を応用。



## 業績紹介 : *In-situ* 光照射固体 NMR による センサリーロドプシン I の光反応サイクルの解明

川村 出 (横浜国大・A02 公募研究代表者)

論文題目 : "Color-Discriminating Retinal Configurations of Sensory Rhodopsin I by Photo-Irradiation Solid-State NMR Spectroscopy."

著者 : Hiroki Yomoda, Yoshiteru Makino, Yuya Tomonaga, Tetsuro Hidaka, Izuru Kawamura\*, Takashi Okitsu, Akimori Wada, Yuki Sudo\* and Akira Naito\*.

雑誌巻号 : *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 6960-6964 (2014)

これまでに我々はレチナール結合型-光受容膜タンパク質の光活性構造を明らかにするために、NMR 測定中に試料に対して緑色光照射が可能な *In-situ* 光照射-固体 NMR 装置を開発し、負の走光性機能を有するフォボロドプシンの M 中間体の選択的な捕捉とレチナールの構造解析に成功してきた[1]。

この論文ではさらに別な波長の光を照射できる固体 NMR 測定システムに改良し、正と負の走光性機能を有する真正細菌 *Salinibacter ruber* 由来のセンサリーロドプシン I (SrSRI) [2]に適用した。SrSRI は光を吸収することにより、K, L, M 中間体を経て基底状態に戻るフォトサイクル反応と、途中の M 中間体が紫外光を吸収して P 中間体を経て元に戻る 2 光子反応経路が提唱されている。大腸菌発現系に[20-<sup>13</sup>C]レチナールを加えて SrSRI を発現させ、PG 膜に再構成した。レチナールの 20 番目のメチル炭素を <sup>13</sup>C 安定同位体標識する実験的な理由としては、微生物型ロドプシンの光反応に特徴的なオールトランス型と 13 シス型のレチナール配座に対して NMR 信号が敏感に変化するためである。実

際にトランス-シス異性化が起きると 5-10 ppm ほど <sup>13</sup>C 化学シフト値が変化するため、容易にレチナールの構造を調べることができる。測定は CP-MAS 法によってマイナス 40 度の温度で行った。基底状態の SrSRI に 520 nm の LED 光を照射したところ、13.8 ppm に観測されていた <sup>13</sup>C NMR 信号が減少し、M 中間体の信号である 19.8 ppm の信号が増加したことから M 中間体に変換されたことがわかった。さらに M 中間体を蓄積した条件で 365 nm の LED 光を照射したところ、M 中間体の信号が減少し、24.8 ppm に P 中間体の信号が新たに現れたことから、2 光子過程を経て M 中間体が P 中間体に変換したことが判明した。

今度は基底状態に対して 365 nm の LED 光を照射したところ、興味深いことに直接 P 中間体が生成されることが判明した。これらの結果から、SrSRI は緑色光照射下では M 中間体が定常的に蓄積し、正の走光性を示すが、青色光照射下では P 中間体が蓄積し、負の走光性機能を示す機構であることが明らかとなった。

本論文で SrSRI の機能的な光中間体の捕捉が可能となったことを明らかにした。今後はレチナール光異性化によって 2 つの機能を巧みに生み出すタンパク質の構造変化を捉えることが重要である。このような成果が柔らかな分子系の理解につながると考えている。

### 引用文献

- [1] Y. Tomonaga, et al. *Biophys. J.* **101**, L50-L52 (2011)., A. Naito & I. Kawamura *Adv. Biol. Solid State NMR Chap.* **20** 387-404 (2014).  
[2] T. Kitajima-Ihara et al. *J. Biol. Chem.* **283**, 23533-23541 (2008).

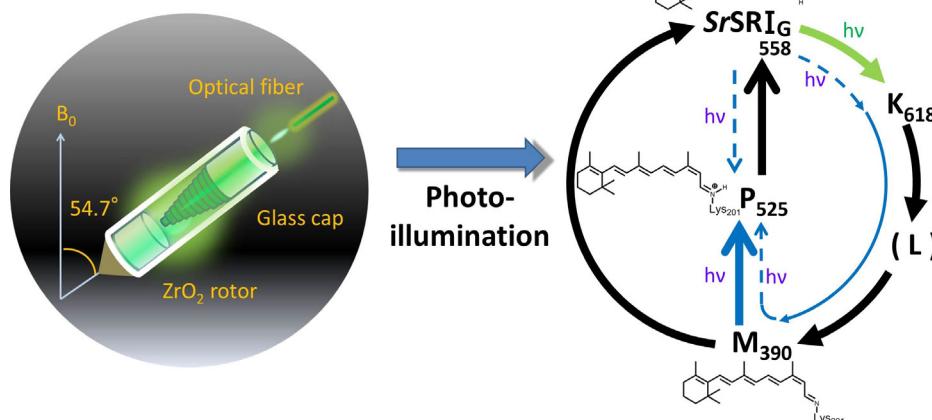


図  
*In-situ* 光照射-固体 NMR により明らかにした SrSRI の光反応経路とレチナールの構造



## 業績紹介：ナノカプセルの内包によるラジカル開始剤の反応性制御

山科 雅裕（東工大資源研・大学院生）  
吉沢 道人（東工大資源研・A03 分担研究者）

論文題目：" Safe Storage of Radical Initiators within a Polyaromatic Nanocapsule"

著者 : Masahiro Yamashina, Yoshihisa Sei, Munetaka Akita, and Michito Yoshizawa\*

雑誌巻号 : *Nature Communications*, 2014, 5, 4662.

アゾ系のラジカル開始剤 AIBN (アゾビスイソブチロニトリル) およびその誘導体は、光照射や加熱によりラジカル種を容易に生成する。そのため、実験室から工場スケールまで、様々なポリマーや有機化合物の合成に利用されている。しかしながら、それらは光と熱に対して反応性が高く、取扱いによっては爆発の危険もあるため、冷暗所で保存する必要がある。我々は既に、2つのアントラセン環を含む有機配位子と Pd(II) イオンの自己組織化により形成したナノカプセル 1 が、フラーレン C<sub>60</sub> やピレンなどを定量的に内包することを報告している[1, 2]。本研究では、このカプセルの高い分子内包能とアントラセン骨格（多環芳香族骨格）による光遮蔽および圧縮効果を利用して、上記のラジカル開始剤の光および熱安定化に初めて成功した。

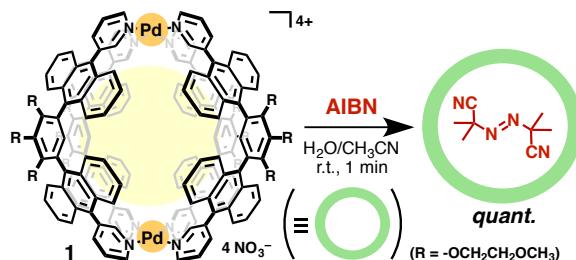


図 1. ナノカプセル 1 による AIBN の定量的内包。

AIBN とナノカプセル 1 を 1:1 の比で水系溶媒 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN = 9:1) に加え、室温で 1 分程度攪拌すると、AIBN は疎水性相互作用により定量的にカプセルに内包された（図 1）。内包体の構造は NMR、ESI-TOF MS および X 線結晶構造解析で決定した。結晶構造解析から 1 分子の AIBN がカプセルに内包され、しかも 8 つのアントラセン環によって完全に覆われていることが明らかとなった（図 2）。同様の方法で、AIBN の誘導体であり、高活性で大きなラジカル開始剤の AMMVN もカプセル 1 に内包された。

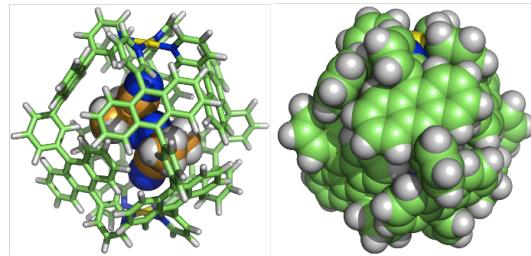


図 2. AIBN 内包体の結晶構造 : stick よび CPK モデル。

単独の AIBN は室温、有機溶媒中で 360 nm の紫外光照射で完全に分解した。これに対して、カプセル 1 に内包された AIBN は、同条件下で 380 倍以上も光安定化されることが明らかとなった。これはカプセルのアントラセン環が紫外光を吸収するため、内部の AIBN が光の影響を受け難いことに由来する。また、室温でも徐々に分解する AMMVN は、カプセル骨格からの圧縮効果により 50 °C の加熱条件に対して 645 倍の熱安定化が観測された。

水中で作製した AIBN 内包カプセルの粉末を（図 3a）、アクリル樹脂の原料である MMA (メタクリル酸メチル) のトルエン溶液に添加すると、AIBN はカプセルから瞬時に放出された（図 3b）。その溶液に光照射または加熱をすることで、ポリマーが効率良く生成することを見出した（図 3c）。すなわち、AIBN の保存容器であるナノカプセルは反応を阻害せず、既存のラジカル反応に利用できることを実証した。

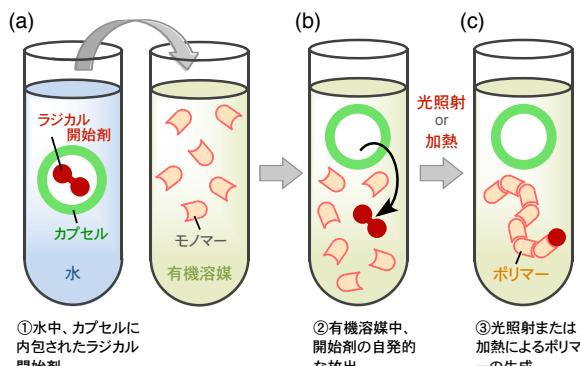


図 3. 内包されたラジカル開始剤を利用したポリマー合成。

## 参考文献

- [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).

業績紹介 : Order from Disorder:  $\pi$  系-アルキル「液体」分子を基材に自己組織化

中西 尚志 (物材機構・A03 計画研究代表者)

論文題目："Directed assembly of optoelectronically active alkyl- $\pi$ -conjugated molecules by adding *n*-alkanes or  $\pi$ -conjugated species"

著者 : Martin J. Hollamby, Maciej Karny, Paul H. H. Bomans, Nico A. J. M. Sommerdijk, Akinori Saeki, Shu Seki, Hiroyuki Minamikawa, Isabelle Grillo, Braian R. Pauw, Paul Brown, Julian Eastoe, Helmuth Möhwald, and Takashi Nakanishi

雑誌巻号 : *Nature Chem.* **6**, 690-696 (2014).

有機エレクトロニクス材料の開発において、分子同士が自発的に組織立って配列現象「自己組織化」は重要なプロセスである。しかしながら、有機エレクトロニクスの光・電子機能を司る分子材料である  $\pi$  共役系分子はその強い分子間相互作用（凝集力）のため、自己組織化する際に適切な配列や最終的に得られる組織構造を精密に制御することは容易ではない。また、分子を自己組織化させるタイミングに関しても、簡便で有用な方法は確立されていないのが現状である。今回の研究では、これらの問題解決に向けた  $\pi$  共役系分子に一般的に適用できる分子設計（硬い  $\pi$  骨格を柔らかく加工）および自己組織化技術の概念を見出した[1]。

先ず、基本分子基材としては  $\pi$  共役系分子の代表例であるフラーレン ( $C_{60}$ ) に、分岐したアルキル鎖を結合した化合物を設計・合成した（図 1a）。この分子設計で得られる  $\pi$  系+アルキル鎖からなる分子構造は、一般的な界面活性剤（石鹼分子）の親水部が  $\pi$  系分子（ここでは  $C_{60}$ ）に置き換わったような構造となっている。一般的な親水部（電荷部位、アンモニウム基など）一疎水（アルキル鎖）の分子成分から成る両親媒性分子は、水中において球状ミセル、棒状ミセル、ベシクル、多層二分子膜など、分子成分の親水-疎水のバランス、溶液の濃度や温度条件によって自己組織化形態が制御される。一方、設計した液状の  $C_{60}$ -アルキル化合物では、 $C_{60}$  とアルキル鎖は一様に混ざることはなく、分岐のアルキル鎖の効果で  $C_{60}$  間の相互作用が阻害され、常温でアモルファス液状（図 1b）となっている[2]。

この液状  $C_{60}$  に、同分子の構成成分である  $C_{60}$  を添加して良く混ぜ合わせた結果、 $C_{60}$  部位が層状化、アルキ

ル鎖の層で隔てられた多層ラメラ構造を形成した（図 1c）。一方、アルキル鎖側の成分としてアルカン溶媒を添加した場合は、 $C_{60}$  部位が球状に凝集し、その周りをアルキル鎖（分子成分+アルカン溶媒）が取り囲むナノメートルサイズの球状ミセルを形成することが分かった（図 1d）。さらに、分子上の分岐アルキル鎖の種類によっては、球状ミセルから棒状ミセルへ成長し、マイクロメートルサイズにおよぶファイバー状ゲルを形成した（図 1e）。言い換えると； $C_{60}$ -アルキル液状（擬似的な準安定状態）化合物に、同分子の一部の成分（ $C_{60}$  またはアルキル）を添加する簡便な操作のみで、自己組織化の起るタイミングと得られる構造体を容易且つ精密に制御できた。この現象は、異なる  $C_{60}$ -アルキル液状化合物や  $C_{60}$  以外の  $\pi$  系-アルキル液状化合物においても確認されており、 $\pi$  共役系分子一般に適用できる自己組織化の新技法と言える。

さらに、ここで得られた多層ラメラ構造およびファイバー状ゲルは、何れも組織化された  $C_{60}$  構造に由来する優れた光導電性を示すことから、過度な折り曲げにも破断、断裂しない光導電活性層の作製手法としてフレキシブルデバイスへの応用も期待できる。

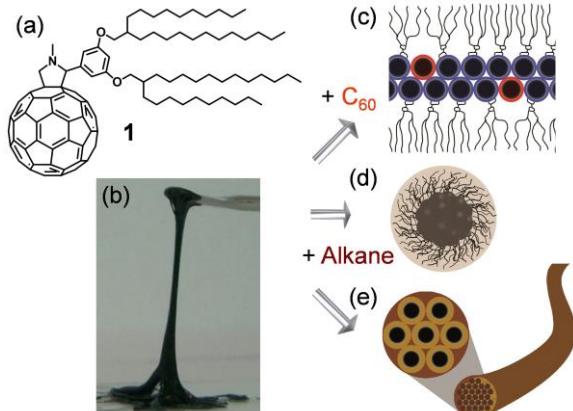


図 1. (a)  $C_{60}$ -分岐アルキル液体分子 (1) の分子構造および(b)無溶媒下、常温液状の写真、(c)  $C_{60}$  添加後のラメラ構造の分子配列、(d) アルキル成分としてデカンを添加後のミセル構造、(d)ヘキサン添加で形成されるファイバー構造の模式図（さらにバンドル化してゲル化）、ここで黒塗り円断面： $C_{60}$  ナノワイヤ断面に相当。

## 引用文献

- [1] T. Nakanishi, et al., *Nature Chem.* **6**, 690-696 (2014).
- [2] T. Nakanishi, et al., *J. Mater. Chem. C* **1**, 1943-1951 (2013).



## 03 班・中西グループの研究成果が新聞に掲載される

A03 班・計画研究 中西グループらの研究成果が、2014 年 6 月 24 日の日刊工業新聞に掲載されました。これは、分岐アルキル鎖を導入した  $\pi$  共役系分子のアモルファス液状化合物（擬似的な準安定状態）に、同分子の一部の成分 ( $C_{60}$  またはアルキル) を添加する

簡便な操作のみで、自己組織化の起こるタイミングと得られる構造体を容易且つ精密に制御可能となる、 $\pi$  共役系分子一般に適用できる自己組織化の新技法に関する研究成果です。

2014年(平成26年)6月24日 火曜日 日刊工業新聞 19面

物質・材料研究機構など  
大阪大学、ポーランド・  
ワルシャワ工科大学など  
の9研究機関は、尻尾付  
きのフラーん多層膜  
やファイバー、ミセルな  
どの自己組織化構造を自  
在に作る技術を開発し  
た。有機太陽電池や発光  
デバイスなどの製造法に  
活用できる。5年後をめ  
どに実用化を目指す。英  
科学誌ネイチャー・ケミ  
ストリー電子版に23日掲  
載された。フラーんはサッカ  
ー球状に炭素が60個つ  
ながったナノカーボン材  
料。このフラーんに炭  
素鎖の尻尾をくっつけ  
た。フラーん部分が集  
まつたり、炭素鎖部分が  
集まつたりと界面活性剤  
のように自己組織化す  
る。常温では液体で、電  
子部品の細部や曲面に塗  
布できる。フラーんは  
通常固体で、粉末を溶か  
す必要があるなど扱いづ  
らかった。

自己組織化構造自在に  
尻尾付きフラーんで実現

物材機構など

10 nm

尻尾付きフラーん  
とフラーんがシ  
ト状に並んだ電顕写  
真(物材機構提供)

