



業績紹介：水を媒介とした力が ABC トランスポーターを駆動する

吉田 紀生 (九大・A01 公募研究代表者)
櫻井 実 (東工大・A01 公募研究代表者)

論文題目："Water-mediated forces between the nucleotide binding domains generate the power stroke in an ABC transporter"

著者 : Tomoka Furukawa-Hagiya, Norio Yoshida, Shuntaro Chiba, Tomohiko Hayashi, Tadaomi Furuta, Yoshiro Sohma, Minoru Sakurai

雑誌巻号 : *Chem. Phys. Lett.* **616-617**, 165-170 (2014).

よく知られているように ATP のリン酸無水結合は高エネルギー結合と呼ばれ、その加水分解によって 7.3 kcal/mol の自由エネルギーが発生する。生物はこのエネルギーを通貨として用いて、生命活動を営んでいると多くの教科書に書かれている。しかしながら、モータータンパク質や薬物輸送タンパク質をはじめとする分子マシンにおいて、最もエネルギーを必要とする動力行程（パワーストローク）は ATP の加水分解時ではなく ATP のスクレオチド結合ドメイン（NBD）への結合時に起こることが多くの実験事実から判明している。すなわち、ATP の結合自由エネルギーが機械的仕事に変換されると考えられるが、そのメカニズムはよくわかつていない。本論文では、ABC トランスポーターのパワーストロークを誘導する NBD の 2 量体化が、水を媒介とした力によって起こることを報告した。

ABC トランスポーターは 2 つの NBD と 2 つの transmembrane domain (TMD) から構成されており、TMD が細胞内側に開いた構造から外側に開いた構造へと変化する過程で薬剤を細胞外に放出する。この過

程（パワーストロークに相当）は、各 NBD に ATP が結合した後、それらが 2 量体化することによって誘導される。実際、われわれは前報 (Furukawa-Hagiya et al., J. Phys. Chem. B, 117(2013)83) において、CFTR という ABC タンパク質に対し MD シミュレーションを行い、NBD に ATP が結合すると 5 ns 程度で 2 量体化が起こることを示した（図 1 上）。本論文では、その MD トrajエクトリーから 2 つの NBD 部分のスナップショットを切り出し、それらに対し 3D-RISM 計算を適用し水和熱力学量を計算した（図 1 下）。

NBD の 2 量体化過程はおよそ 3 段階に分けて考えられる（図 1 下では赤、青、緑で区別）。第一段階は 1.4 ns 付近までの過程で、最初 30 Å ほどの距離で離れていた 2 つの NBD が急接近して、二つの ATP（図 1 上の赤球）結合サイトのうちの一つの側で閉じる。第 2 段階は、4 ns 付近までの過程で、もう一つの ATP 結合サイトが閉じる。第 3 段階では、2 つの NBD がより密に結合する。図 1 下左、右はそれぞれこれらの過程の水和エンタルピー、水和エントロピーの変化を示している。興味あることに、第一段階では水和エンタルピーによる遠達力が駆動力となっていた（データは省略するがこの過程では内部エネルギーは増大）。第 2, 3 段階では、水和エンタルピー変化と内部エネルギー変化は互いにミラーイメージでほぼ相殺されてしまい、わずかに残った水和エントロピーによって駆動されることが判明した。

上の遠達力が発生するメカニズムは今後の課題である。一方、水和エントロピーの寄与は、NBD 間結合による排除体積の減少から生ずる水の並進エントロピー利得によるものと考えられる。

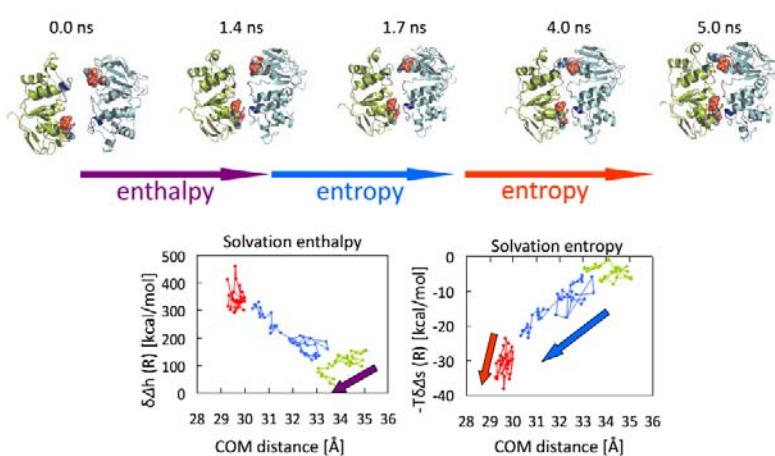


図 1 CFTR における NBD2 量体化過程
(上) と NBD 重心間距離(COM)に対する水和熱力学量の変化



業績紹介：銅(I)錯体の超高速ダイナミクスに対する置換基効果

竹内 佐年 (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："The substituent effect on the MLCT excited state dynamics of Cu(I) complexes studied by femtosecond time-resolved absorption and observation of coherent nuclear wavepacket motion"

著者: Linqiang Hua, Munetaka Iwamura, Satoshi Takeuchi, Tahei Tahara

雑誌巻号: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 2067-2077 (2015).

銅一価イオンに 2 つのフェナントロリン配位子が結合した銅(I)錯体は、可視領域に MLCT (金属から配位子への電荷移動) 遷移に帰属される強い吸収と長寿命の発光を示すため、光増感剤などの応用面で注目されている。さらに基礎的見地からも、励起状態で 2 つの配位子間の二面角が小さくなる構造変形が起こり、それが光化学的性質と密接に関係していること、また配位子の 2 位および 9 位の置換基に影響を受ける点に興味がもたれている。



金属錯体は、高い電子状態密度や強いスピン軌道相互作用により複雑で高速な緩和過程を示す。このため、超高速分光による研究が欠かせない。以前われわれは、異なる置換基をもつ 3 つの銅(I)錯体 (図 1) のダイナミクスをフェムト秒発光分光により研究し、置換基が嵩高いほど構造変形の時定数が大きくなることを見出した[1]。しかし、例えば $[Cu(phen)_2]^+$ の構造変形後の過渡状態が可視領域の発光として観測されないなど、緩和経路に未解明の点が残されていた。そこで、フェムト秒時間分解吸収分光を行い、発光による相補的な情報と合わせて、銅(I)錯体の励起状態ダイナミクスの全体像とその置換基効果を研究した。

図 2 に示す通り、 $[Cu(phen)_2]^+$ の過渡吸収スペクトルでは光励起直後に S_1 吸収が 570 nm に現れ、構造変形に対応した小さな強度増大 (0.2 ps) を示す。フェムト秒発光分光では見えなかった構造変形後の S_1 状態が吸収分光では観測された。その後、この S_1 吸収と 450

nm の褪色信号がともに時定数 1.8 ps で減衰した。このことは、 $[Cu(phen)_2]^+$ の S_1 状態は内部転換により S_0 状態に戻ることを示している。一方、 $[Cu(dpphen)_2]^+$ では構造変形に対応する吸収増大 (0.9 ps) と項間交差に対応するスペクトル変化 (11 ps) が観測された。

また 35 fs の時間分解能でポンプ - プローブ測定を行ったところ、 S_1 状態における核波束運動が観測され、その振動位相緩和時間は各錯体の構造変形の時定数とほぼ一致した。これは、励起直後の S_1 状態が明確な振動構造をもち、構造変形までのサブピコ秒の寿命の間、コヒーレントな振動を起こすことを意味する。

これらのデータから、構造変形前にコヒーレント核運動が観測される点は 3 つの錯体に共通であるが、その後の緩和過程に関して、 $[Cu(phen)_2]^+$ は他の 2 つの錯体と大きく異なることが分かった。この差異は構造変形の大きさの違いに起因すると考えられる。つまり、置換基を持たない $[Cu(phen)_2]^+$ は立体障害が小さく、平面に近い構造まで変形可能である。この結果、 S_1 と S_0 状態のエネルギーが近接し、 $S_1 \rightarrow S_0$ 内部転換のレートを増大させるため、 S_0 状態への内部転換が支配的になる。一方、 $[Cu(dmpen)_2]^+$ と $[Cu(dpphen)_2]^+$ は立体障害のため構造変形が一定程度に留まり、その結果、レートの点で内部転換を上回る項間交差により T_1 状態に緩和する。以上のように、本研究により 3 つの銅(I)錯体の緩和過程の違いを明らかにし、励起状態ダイナミクスに対する置換基効果を統一的な視点で理解することができた。

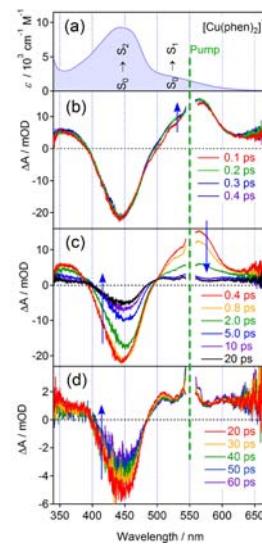


図 2 $[Cu(phen)_2]^+$ のジクロロメタン溶液 (2 mM) の (a) 定常および (b-d) フェムト秒時間分解吸収スペクトル。550 nm の励起光により S_1 状態を生成し、その後の各遅延時刻での吸収と基底状態の吸収との差をプロットしてある。最初の数百 fs には S_1 状態での構造変形による吸収の増大、次いで数 ps 領域には $S_1 \rightarrow S_0$ 内部転換による信号減衰が観測されている。10 ps 以降に見られる長寿命成分は低い収率で生成した T_1 状態に対応する。

[1] M. Iwamura, S. Takeuchi, T. Tahara, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 4143-4154 (2014).



業績紹介：凝集誘起発光性能を有する多環芳香族ナノカプセル

岡澤 佑允（東工大資源研・大学院生）
吉沢 道人（東工大資源研・A03 計画研究 分担者）

論文題目："Polyaromatic Nanocapsules Displaying Aggregation-Induced Enhanced Emissions in Water"
著者：Yusuke Okazawa, Kei Kondo, Munetaka Akita, and Michito Yoshizawa*

雑誌巻号：*J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 98-101 (2015).

芳香族分子の蛍光性能は、その外部環境に強く影響される。大多数の多環芳香族分子は、凝集状態でその蛍光性が著しく低下し、これは凝集誘起消光 (ACEQ) と呼ばれる。一方、凝集体を形成することで、蛍光性が増大する現象 (=凝集誘起発光 (AIEE)) が、最近、幾つかの分岐型分子で報告されている。しかしながら、分子内包能を持つカプセル状集合体の AIEE は見出されていない。我々は既に、2 つのアントラセン環を含む V 型の両親媒性分子が、水中で疎水性効果および $\pi-\pi$ 相互作用により、ミセル状のナノカプセルを形成することを報告している [1, 2]。今回、両親媒性分子の芳香環パネルにフェナントレンおよびナフタレン環を用いることで、凝集誘起発光性能を有する新規な多環芳香族ナノカプセルの構築に成功した（図 1）。

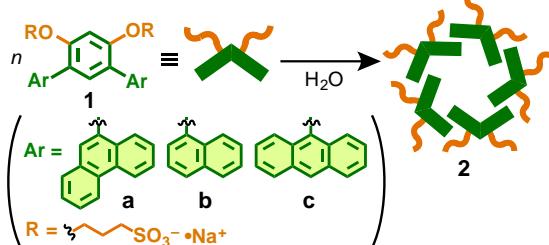


図 1. V 型両親媒性分子 1a-c から成る多環芳香族ナノカプセル 2a-c の形成。

V 型両親媒性分子 1a, b は、1, 3-ジメトキシベンゼンを出発原料として 4 段階の反応で合成した。水中、室温で、1a, b を 1 分間攪拌することにより、ナノカプセル 2a, b がそれぞれ定量的に形成した。各種 NMR、AFM、DLS により、カプセルは約 2 nm にサイズ制御された球状集合体であることが明らかとなった（図 2）。その大きさから、得られたカプセルは約 5 分子の 1a, b から構築していると考えた。

アントラセン環を含む両親媒性分子 1c はカプセル形成により、蛍光量子収率が ACEQ で著しく減少した（52%→1%）。それに対して、フェナントレンおよび

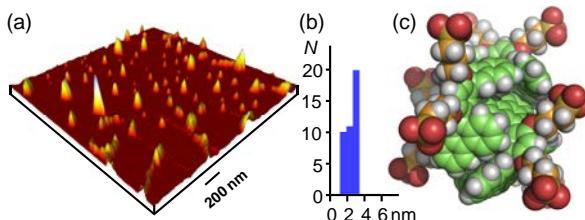


図 2. (a) ナノカプセル 2a の AFM 図と (b) そのサイズ分布. (c) ナノカプセル 2a の分子モデリング図.

ナフタレン環を持つ 1a, b は、水中でカプセル 2a, b を形成することで、蛍光量子収率がそれぞれ 2.5 倍、1.3 倍に増大した（4%→10%、20%→26%）。この現象は AIEE に由来し、自由回転可能な芳香環パネルを持つ 1a, b がカプセル状に凝集することで、その動きが抑制され、蛍光性が増大したと考えられる。また、カプセル 2a, b の耐光性は 1c の約 2 倍であった。さらに、水中で蛍光性の疎水性分子である Coumarin 102 (3) を内包したナノカプセル 2a, b \supset 3 は、紫外光照射でホスト骨格からゲスト分子への効率的なエネルギー移動 (FRET) により、蛍光性能がより向上した（図 3）。

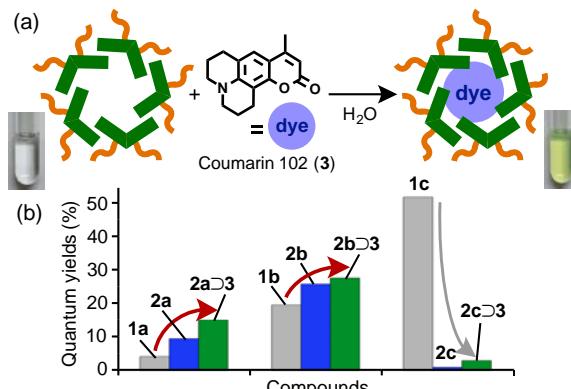


図 3. (a) ナノカプセル 2 による Coumarin 102 内包. (b) V 型両親媒性分子、カプセル、ゲスト内包体の蛍光量子収率.

以上のように、適切な芳香環パネルの選択により、V 型両親媒性分子は水中、室温で、凝集誘起発光性能を有する多環芳香族ナノカプセルを定量的に形成した。また、蛍光性分子を内包することで、それらの蛍光性能をさらに増大することに成功した。

参考文献：[1] K. Kondo, M. Yoshizawa et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 2308-2312 (2013); [2] K. Kondo, M. Yoshizawa et al., *Eur. J. Org. Chem.*, **33**, 7389-7394 (2014).



業績紹介：安定同位体標識による CPD 光回復酵素の赤外分光解析

岩田 達也（名工大・A03 連携研究者）
神取 秀樹（名工大・A03 計画研究代表者）

論文題目："Flavin Adenine Dinucleotide Chromophore Charge Controls the Conformation of Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase α -Helices"

著者：I M. Mahaputra Wijaya, Tatsuya Iwata, Junpei Yamamoto, Kenichi Hitomi, Shigenori Iwai, Elizabeth D. Getzoff, John T. M. Kennis, Tilo Mathes, and Hideki Kandori

雑誌巻号：*Biochemistry* **53**, 5864–5875 (2014).

DNA 光回復酵素は、紫外線により損傷を受けた DNA を近紫外光／青色光を用いて修復する酵素であり、発色団としてフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) (図 1a) を結合している。二電子還元型のアニオン型 (FADH⁻) が損傷 DNA を修復する始状態であり、光励起された FADH⁻から損傷 DNA への電子移動反応を端緒として修復が実現する。我々は光回復酵素が損傷 DNA を修復する反応機構を解明するため、フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法による研究を行ってきた。光誘起差 FTIR 分光法を用いれば、化学結合の生成・消失、環境変化などを捉えることができる。これまでに、試料などの測定条件を最適化することにより光回復酵素の光活性化 (FADH⁻生成) と修復における差スペクトルを計測することに成功した^[1,2]。

ところで、得られる差スペクトルには FAD、タンパク質部分、そして基質 DNA のシグナルが混在している。これらのシグナルを帰属するためには、それぞれを特異的に安定同位体で標識した試料が必要である。大腸菌はフラビンを自らの細胞内で合成するので、大腸菌で発現させた光回復酵素はそのフラビンを利用してホロタンパク質として得られる。大腸菌にレチナールを加えなければならないロドプシンと違って、このことは試料調製の利点である一方、同位体標識による信号の識別に際しては問題となる。LOV、BLUF ドメインといったフラビン結合光センサータンパク質ではフラビンとアポタンパク質の再構成によって特異的な標識試料を得ることができた^[3,4]。しかしながら光回復酵素の再構成効率は低いため、フラビンとタンパク質部分の信号を分離するのが課題であった。

今回、我々はシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) (図 1a、b) を修復する CPD 光回復酵素に対し、リボフラビンの合成が出来ない大腸菌株 (*CpXribF*)^[5]を用いてタンパク質部分のみを標識した光回復酵素の調製に成功した。その結果、フラビン、タンパク質部分、基質 DNA に由来するシグナルを帰属することが可能になったのである。

実験の結果、論文のタイトルにある α -ヘリックスの動きが観測されたのに加え、基質の C=O 伸縮に隠れていたプロトン化カルボン酸のシグナルを見出した。このカルボン酸は CPD 結合時にのみ構造変化が現れるシグナルであり、CPD と相互作用する Glu275 が有力な候補である (図 1a、結晶構造解析によると、CPD 結合時と非結合時で側鎖の向きが異なる)。このプロトン化カルボン酸は、CPD が結合した状態で FADH⁻から FADH⁻へ還元されるときには水素結合強度が弱くなり、CPD を修復して DNA を解離するときには脱プロトン化することがわかった。結晶中の FAD は修復に関与しない酸化型であるが、本論文の結果から、修復においても FAD の活性化においても、活性中心が柔軟に水素結合構造を変化させることができた。このため高い効率の修復反応が実現するものと考えられる。

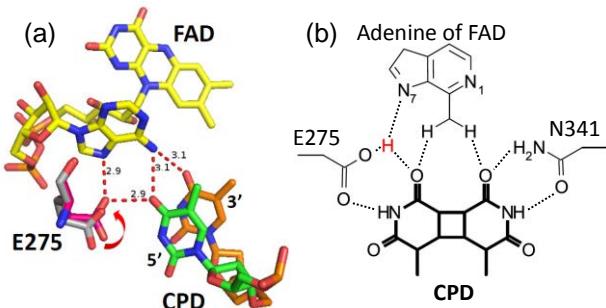


図 1. (a) CPD が結合した光回復酵素 (PDB entry 1TEZ) と非結合状態の光回復酵素 (PDB entry 1QNF) における CPD、FAD、E275 の構造。CPD が結合した状態では E275 (ピンク) は CPD の 5' 側の C4=O 基と水素結合を形成し、側鎖の向きは CPD が非結合の状態 (灰色) と異なる。(b) CPD (太線) が結合した状態での水素結合構造の模式図。FAD のアデニン環、E275、N341 と水素結合を形成している。

- [1] D. Yamada, et al., *Biochemistry* **51**, 5774–5783 (2012).
- [2] I.M. M. Wijaya, et al., *Biochemistry* **52**, 1019–1027 (2013).
- [3] T. Iwata, et al., *Biochemistry* **45**, 15384–15391 (2006).
- [4] T. Iwata, et al., *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 1015–1019 (2011).
- [5] J. Mehlhorn, et al., *PLoS One* **8**, 79006 (2013).



第 8 回ワークショップ 開催報告

須藤 雄気(岡山大院医歯薬・A03 計画研究分担者)
川村 出(横浜国大院工・A02 公募研究代表者)
江口 美陽(物材研・A02 公募研究分担者)

本新学術領域研究の第 8 回ワークショップが、平成 27 年 1 月 24 日(土)、25 日(日)に、岡山いこいの村(岡山県瀬戸内市)で開催された。本ワークショップは、「やわらか光受容分子の理解と利用に迫るブレインストーミング研究会」と題し、光受容タンパク質の理解と利用をテーマに、各々の研究者が定義する分子の協同性・協奏性を議論することで、それぞれの研究者が持つ“やわらかさ”を詳らかにし、その上で“やわらかさ”的共通原理に近づくことを目的とした。このような背景から、領域内だけでなく、領域外から多数のご参加とご発表を頂いた。

はじめに、計画班からの発表があった。総括班/A02 班の水谷泰久氏(大阪大学)からは、光受容分子への期待とともに、時間分解ラマン分光法が果たす役割について、A01 班の林重彦氏(京都大学)からは、最新の光受容タンパク質研究の成果を中心に、理論科学からみるやわらかさについて、A03 班の中西尚志氏(物材研)からは、常温液体化したピレン化合物に関する分光特性について最新の知見が紹介された。

次のセッションでは、3 名の領域外招待講演者、中嶋琢也氏(奈良先端大)、佐藤久子氏(愛媛大学)、永井健治氏(大阪大学)から、それぞれのご専門である有機分子、無機分子、タンパク質分子の研究について話題提供を頂いた。続く 3 番目のセッションでは、超高速分光の立場から、A02 の竹内佐年氏(理化学研究所)がタンパク質分子の動作原理に関する新知見を、領域外の新倉弘倫氏(早稲田大学)からは、アト秒領域での解析結果と今後の展望についての発表があった。休憩をはさみ、5 件のポスター発表が行われ、絶え間なく議論が交わされた。夕食後には、別室にて、領域の指向性について、領域外からの叱咤を含む熱い議論が交わされた(～午前 3 時)。

翌日は、午前 9 時より、世話人 3 名(須藤雄気、川村出、江口美陽)が、色素化合物と色素タンパク質の解析について、最新の知見を報告した。次のセッションでは、振動分光法を用いた解析について、3 名の方からの発表があった。領域外の小関泰之氏(東京大学)は、誘導ラマン散乱を利用したリアルタイム振動イメ

ージングの美しい結果を、A03 班の岩田達也氏(名工大)は、低温赤外分光法によるフラビン結合型光受容分子の解析結果を、A02 班の高屋智久氏(学習院大学)は、時間分解赤外分光法によるカルボテノイドの構造とダイナミクスに関する知見を発表した。

最後のセッションでは、A03 班の森本正和氏(立教大学)から、フォトクロミック分子であるジアリルエテンを使った光エネルギー→力学エネルギー変換について、領域外の江波進一氏(京都大学)から、表面選択性的分光法を用いたバルクと異なる分子の挙動について、同じく領域外の斎藤圭亮氏(東京大学)から、光合成タンパク質の理論計算から見えてきた非対称性についての発表がなされた。最後に、水谷泰久氏から閉会の挨拶がなされた。

今回のワークショップでは、全ての発表に対し、質問時間の 5 分を越えて多くの質問がなされ、議論が大変活発であった。閉会後の岡山駅への帰路(バスで 1 時間)の間にも引き続き熱い議論がなされたとのことである。年度末のお忙しい中、お集まり頂いた参加者の方々に深く感謝するとともに、会の運営を手伝ってくれた岡山大院医歯薬の塚本卓助教、土井聰子さん、栗原真理恵さんに感謝する。

最後に、余談ではあるが、瀬戸内海から登った美しいご来光のように、本新学術領域研究が今後とも強く輝いていくだろうを感じたことを述べて、報告にかえさせて頂きたい。

