



業績紹介: 2 次元ヘテロダイン検出振動和周波発生分光を用いた両性イオン脂質/水界面の超高速水素結合ダイナミクスの研究

井上 賢一 (理研・A02 計画研究協力者)
二本柳 聰史 (理研・A02 計画研究協力者)
山口 祥一 (埼玉大院理工・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 : "Cooperative Hydrogen-Bond Dynamics at a Zwitterionic Lipid/Water Interface Revealed by 2D HD-VSFG Spectroscopy"

著者 : Ken-ichi Inoue, Prashant C. Singh, Satoshi Nihonyanagi, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara

雑誌巻号 : *J. Phys. Chem. Lett.* **8**, 5160-5165 (2017).

本論文では、生体膜を構成する代表的な脂質である両性イオン脂質(DPPC)/水界面に対して 2 次元ヘテロダイン検出振動和周波発生分光法(2D HD-VSFG)を用いた超高速振動ダイナミクス測定を行い、界面水の水和構造と水素結合ダイナミクスを報告した。

我々のグループでは以前、定常状態の測定を元に両性イオン脂質/水界面ではアニオニ性のリン酸基とカチオニ性のコリン基の近傍に別の水和構造が作られ、それぞれに配向が異なる水分子が存在していると結論した[1]。しかし、その後発表された MD シミュレーションの研究には、このような異なる水分子の構造を支持するもの[2,3]とそうでないもの[4,5]があり、両性イオン脂質/水界面の水和構造に関して必ずしも統一した見解が得られているわけではなかった。

図 1(c)に本研究で得られた両性イオン脂質/水界面の 2D HD-VSFG スペクトルを示す。このスペクトルには低波数側から正(A)、負(B)、正(C)の符号をもつピークが観測された。ピーク A、B は、それぞれ正の符号を持つ OH 伸縮振動バンドのホットバンド($v=2 \leftarrow v=1$ 遷移)、 $v=1 \leftarrow v=0$ 遷移のブリーチに帰属される。ピーク C は、定常スペクトル(図 1(b))が正のバンドのみで構成されているとすると解釈することができないが、正のバンドに埋もれた負のバンドのブリーチとして解釈することができる。つまり、観測されたこれらのバンドはリン酸基とコリン基の近傍でそれぞれ上向きと下向きに配向した水分子に帰属することができ、ダイナミクスの観点から両性イオン脂質/水界面における異なる水和構造の共存を強く支持する結果が得られた。

また我々は以前、リン酸基を持つ脂質(DPPG)とコリン基を持つ脂質(DPTAP)の脂質膜／水界面を 2D HD-VSFG で研究し、DPTAP 界面の水はバルクの水と同じように 100 フェムト秒以下の、極めて速い水素結合の揺らぎを示すのに対し、DPPG 界面の水ではその揺らぎは大きく抑制されていることを報告した[6]。今回、DPPC のリン酸基周りの水分子は DPPG のリン酸基周りの水分子と異なり、バルクの水と同様に極めて速く揺らいでいることが明らかとなった。これは、DPPC のリン酸基の近傍にはコリン基が存在するためには、界面水の揺らぎが誘起されていると考えられる。この結果は、両性イオン脂質界面において官能基の協奏的な効果が存在することを示している(図 2)。

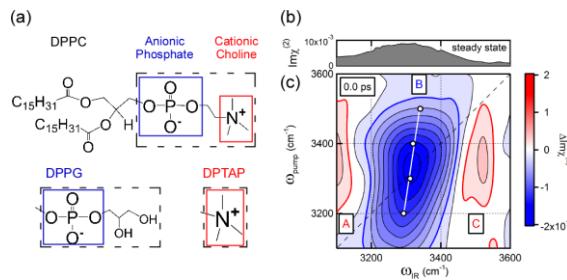


図 1. (a) 両性イオン脂質(DPPC)・アニオニ性脂質(DPPG)・カチオニ性脂質(DPTAP)の構造式。(b) 両性イオン脂質/水界面の定常 HD-VSFG スペクトル。(c) 両性イオン脂質/水界面の遅延時間 0.0 ps における 2D HD-VSFG スペクトル。

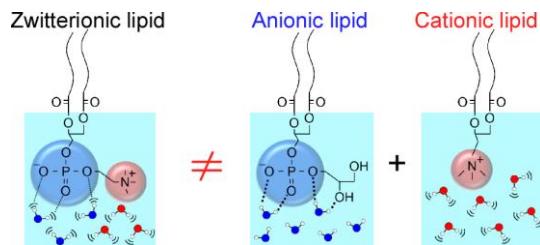


図 2. DPPC 界面・DPPG 界面・DPTAP 界面における水和構造と水素結合ダイナミクスの模式図。

引用文献

- [1] J. A. Mondal *et al.*, *JACS* **134**, 7842 (2012).
- [2] S. Re *et al.*, *JPCL* **5**, 4343 (2014).
- [3] T. Ishiyama *et al.*, *JPCL* **7**, 216 (2016).
- [4] S. Roy *et al.*, *JCP* **141**, 18C502 (2014).
- [5] T. Ohto *et al.*, *JPCL* **6**, 4499 (2015).
- [6] P. C. Singh *et al.*, *Angew. Chem.* **55**, 10621 (2016).



業績紹介：時間分解共鳴ラマン分光法の深化とタンパク質ダイナミクス観測

水谷 泰久 (阪大院理・A02 計画研究代表者)

論文題目："Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy and Application to Studies on Ultrafast Protein Dynamics"

著者 : Yasuhisa Mizutani

雑誌巻号 : *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **90**, 1344-1371 (2017).

この総説は、日本化学会学術賞の受賞論文として、主にこの 10 年間われわれが挙げたタンパク質ダイナミクスの研究成果を纏めたものである。

タンパク質ダイナミクスの特徴は、幅広い時間スケール・空間スケールに素過程が存在し、それらが互いに連動することにある。このような性質はアロステリーとして知られ、タンパク質の機能発現の要である。しかし、こうした素過程の連動性は決して自明の性質ではなく、その解明は分子科学が取り組むべき重要な課題の一つである。われわれは共鳴ラマン分光法のもつ長所を駆使することにより、タンパク質ダイナミクスに関する研究を行った。

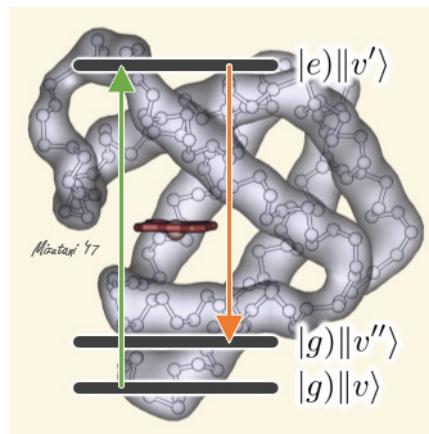
振動分光法は時間分解能が約 100 フェムト秒と高く、分子構造に関する豊富な情報を与えるので幅広い時間領域にわたるタンパク質ダイナミクスの全容を調べるには強力な手法となる。われわれは、可視領域をほぼカバーする連続波長可変ピコ秒パルス光源を開発し、これを基に高感度のピコ秒時間分解可視共鳴ラマン分光装置を製作した。これは、モード同期チタンサファイアレーザーを時間分解共鳴ラマン分光装置に適用した世界初のものであり、その後のピコ秒時間分解共鳴ラマン分光研究の先駆けとなった。さらにわれわれは紫外領域においても連続波長可変なパルス光源を開発し、ピコ秒の時間分解能をもつ共鳴ラマン分光法を可視領域から紫外・遠紫外領域にも拡張した。こうした技術開発により、共鳴ラマン分光法のもつ長所を活かしたタンパク質ダイナミクスの多面的研究が可能となった。タンパク質試料は小分子試料に比べ不安定でかつ量の限られるケースが多く、実験データに装置の性能の優劣が如実に現れる。以下に述べる観測の成功は、これらの分光装置の性能の高さによるものである。

エネルギーはすべての変化の素である。分子内および分子間でエネルギーがどのように移動するかを知ることはダイナミクスの理解に重要であり、その機構の解明には反応後の分子のさまざまな自由度にエネルギーがどのように分布しているかを時間分解観測するこ

とが必要である。われわれは、共鳴効果を利用したタンパク質の部位選択的観測、およびアンチストークスラマンバンド強度を基にしたエネルギー分布観測、というラマン分光法の優位性を最大限に活かした研究を開発した。その代表的成果がヘムタンパク質に関する研究である。われわれは、光励起後ヘムが余剰エネルギーによって一時的に“高温”状態になり、その後数ピコ秒の時間スケールで“冷却”(エネルギー緩和)していく様子や、タンパク質部分に流れたエネルギーがタンパク質内を散逸する様子をとらえることに成功した。特に後者は、タンパク質中のエネルギーの流れを残基サイズの空間分解能で研究した初めての例である。

タンパク質の機能は連動的な構造変化によって生まれる。生体中には酸素を生理的リガンドとして機能するタンパク質が多く存在するが、酸素脱離反応に伴うヘムタンパク質の時間分解測定は一般に困難であり、機構の理解のためにその実験的克服が求められていた。われわれはこうした機能発現に重要なタンパク質ダイナミクスの観測に挑み、酸素脱離反応に伴うヘムタンパク質の時間分解共鳴ラマンスペクトルの測定に初めて成功した。また、種々の光受容タンパク質について光化学反応に駆動されたタンパク質部分の最初動の様子を初めて捉え、発色団の光反応に連動した構造変化およびその機能発現における役割を明らかにした。

本総説は、刷り上がり 28 ページという長いものであるが、大変丁寧な査読をしていただき、親身になった建設的なコメントを多くいただいた。受賞から 5 年近くも経ってしまい恥ずかしい思いも強いが、自分の研究を振り返る機会をいただいたことに感謝している。今後は、これまでとは異なったアプローチからもタンパク質分子の理解を深めていきたいと考えている。





業績紹介：高速原子間力顕微鏡により明らかにされたプロテアソーム $\alpha 7$ ホモ 14 量体の $\alpha 6$ による 2 ステップ解体過程

内橋 貴之 (名古屋大・A02 公募研究代表者)

論文題目：" Two-step process for disassembly mechanism of proteasome $\alpha 7$ homo-tetradecamer by $\alpha 6$ revealed by high-speed atomic force microscopy "

著者 : Toshiya Kozai, Taichiro Sekiguchi, Tadashi Satoh, Hirokazu Yagi, Koichi Kato and Takayuki Uchihashi

雑誌巻号 : *Sci. Rep.* 7, 15373 (217).

プロテアソームは全ての真核生物において高度に保存された構造を持つ巨大なタンパク質複合体であり、ユビキチン化されたタンパク質を迅速かつ選択的に分解・除去する。プロテアソームのプロテアーゼ活性の中心を担うのは 20S コア粒子であり、7 種類のサブユニット $\alpha 1 \sim \alpha 7$ からなる α リングと、同様に 7 種類のサブユニット $\beta 1 \sim \beta 7$ からなる β リングが $\alpha\beta\alpha$ の順に積み重なった中空の樽状の形状をしている。生体内ではこれら α 、 β リングと複合体の形成はアッセンブリシャペロンを介して精密に制御されている。

α リングを構成するサブユニットのうち、 $\alpha 7$ サブユニットは単独で 7 量体のリング構造を形成し、さらに 2 つの 7 量体リングがスタッカした 14 量体ダブルリング構造を形成することが知られている。しかし、完成了 α リングには、 $\alpha 7$ サブユニットは 1 つしか組み込まれていないため、 $\alpha 7$ -14 量体は off-pathway の分子であると考えられ、なんらかの機構でホモオリゴマー状態が解消される必要がある。最近、 $\alpha 7$ ホモ 14 量体ダブルリングに $\alpha 6$ が相互作用すると、ダブルリングが解体され、 $\alpha 6: \alpha 7=1:7$ 構造になることが明らかにされた[1]。しかし、 $\alpha 7$ ホモ 14 量体の解体過程とその産物である $\alpha 6/\alpha 7$ ヘテロ 8 量体の構造は明らかになっていたくなかった。そこで高速 AFM を用いて $\alpha 7$ ホモ 14 量体と $\alpha 6$ の相互作用を直接可視化することで、ダブルリングの解体過程を明らかにすることを目的に実験を行った。

$\alpha 7$ ホモ 14 量体をアミノシランで化学修飾したマイカに強固に吸着させると 14 量体が自発的に 7 量体に分離する様子が見られた。この結果から、14 量体ダブルリングを形成する 2 個の 7 量体リング間の相互作用は比較的弱く、基板との相互作用で容易に分離することが

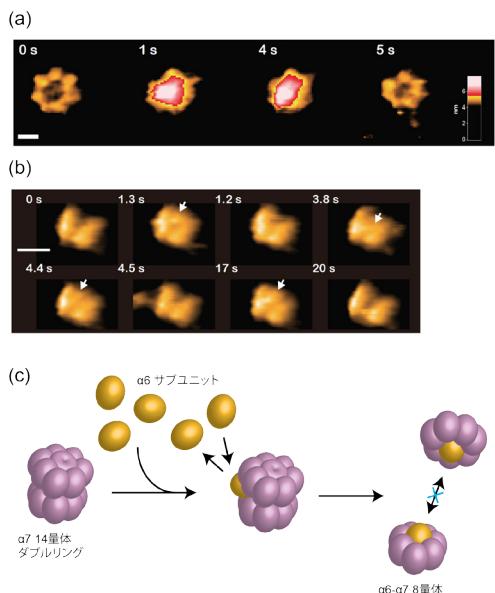


図 1 (a) $\alpha 7$ ホモ 7 量体リンク中心孔への $\alpha 6$ の結合。(b) $\alpha 7$ ホモ 14 量体のリング間隙に $\alpha 6$ が結合し、リングが分離していく様子。(c) $\alpha 6$ による $\alpha 7$ ホモ 14 量体解体過程の模式図。

示唆された。さらに、分離した $\alpha 7$ ホモ 7 量体リングの中心孔に $\alpha 6$ サブユニットが結合・解離を繰り返し(図 1a)、時間経過とともにその相互作用が強くなり、20 分ほどで $\alpha 6$ がリング中心孔からほぼ解離しないことが分かった。ダブルリングをマイカ表面に弱く吸着させてリング側面から高速AFM観察を行ったところ、積層した7量体リング間に隙間が経時に生じ、そこに $\alpha 6$ が結合する様子が観察された。これらのことから、 $\alpha 7$ ホモ 14 量体の $\alpha 6$ サブユニットによる解体は、リング積層間隙への $\alpha 6$ の結合と解離を経て、7 量体リング中心孔への $\alpha 6$ の結合によるダブルリングの再生阻止に至る 2 段階の過程を経ていると考えられる(図 1c)。実際には、 α リングの形成には、さらに 8 量体がサブユニットまで分離される必要があるが、その因子は未だ特定されていない。しかしながら、以上の結果はプロテアソームを構成するサブユニット間の相互作用が off-pathway で生じる自己集合体を自ら補正する機能を備えていることを示唆している。

引用文献

- [1] K. Ishii et al, *Sci. Rep.* 5, 18167, 2015.



業績紹介：CRISPR-Cas9 による二重鎖 DNA 切断過程の高速 AFM リアルタイム観察

内橋 貴之 (名古屋大・A02 公募研究代表者)

論文題目："Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy"

著者：Mikihiro Shibata, Hiroshi Nishimasu, Noriyuki Kodera, Seiichi Hirano, Toshio Ando, Takayuki Uchihashi and Osamu Nureki

雑誌巻号：*Nature Commun.* 8, 1430 (2017)

CRISPR-Cas システムはバクテリアが持つ獲得免疫系の一つであり、外来遺伝子の一部を自身の染色体に取り込むことで、外来遺伝子が再度侵入した場合に、これらを分離・排除する。近年、化膿レンサ球菌で発見された CRISPR-Cas9 は優れたゲノム編集技術として脚光を浴びている。DNA 切断酵素である Cas9 はガイド RNA と結合し、ガイド RNA の一部（ガイド配列）と相補的な DNA を選択的に切断する。これまでに、Cas9 単体や Cas9-RNA 複合体、Cas9-RNA-DNA 複合体など異なる状態の結晶構造が解かれ、RNA や DNA の結合に伴い Cas9 は構造を大きく変化することが示唆されていた。しかし、実際に DNA の切断過程における Cas9 の動態について、その詳細は明らかでなかった。そこで、高速 AFM により CRISPR-Cas9 が機能する様子の直接観察を試みた。

結晶構造からは、Cas9 単体ではドメインが密にパッキングした closed form をとると予想されていたが、高速 AFM 観察の結果から、Cas9 単体ではドメインがダイナミックに揺らぐ非常に柔らかい構造をとっていることがわかった（図 1a）。一方、Cas9-RNA 複合体は結晶構造で示されていたのと同様の安定した bilobe 構造をとっていた（図 1b）。これらの結果から、Cas9 単体の柔軟な構造はガイド RNA との結合に重要であり、ガイド RNA の結合は Cas9 の立体構造の安定化に寄与していることが示唆された。次に、20 塩基の標的配列を含む 600 塩基対の二重鎖 DNA と Cas9-RNA 複合体を混合して高速 AFM 観察を行ったところ、Cas9-RNA 複合体は DNA に結合と解離を繰り返すことにより標的配列を探査し、最終的に標的配列部位に安定に結合する様子が観察された（図 1c）。これまで Cas9-RNA 複合体がどのように DNA の標的配列を探査するのかは議論的であったが、Cas9-RNA 複合体は DNA 上をスライドするのではなく、三次元拡散を利用した DNA

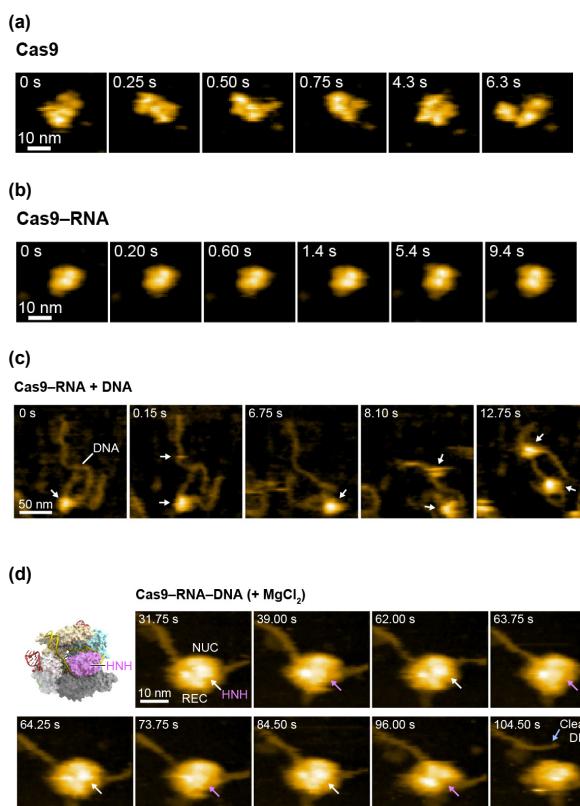


図 1 (a) Cas9 単体、(b) Cas9-RNA 複合体の高速 AFM 像。(c) Cas9-RNA 複合体による DNA の探索。(d) Cas9-RNA 複合体による DNA の切断の様子。DNA の切断部位から離れた状態の HNH ドメインを白色の矢印で、切断部位に近い状態の HNH ドメインをピンク色の矢印で示している。

への結合と解離により標的配列を探査することが直接的に示された。さらに、標的 DNA に結合した Cas9-RNA 複合体を詳細に観察すると、ヌクレアーゼ活性を持つ HNH ドメインが大きく構造変化していることが分かった。Cas9 の活性化に必要な Mg イオンを添加すると、HNH ドメインが DNA の切断部位に移動したのち、切断された DNA が Cas9 から離れる様子を撮影することにも成功した（図 1d）。これら Cas9 単体、Cas9-RNA 複合体および Cas9-RNA 複合体による DNA の探索と切断といった一連の過程を撮影した高速 AFM 動画から、CRISPR-Cas9 による DNA 切断のダイナミクスが明らかになった。本研究により得られた動的な構造情報は、より高効率・高精度なゲノム編集ツールの開発の基盤となることが期待される。



業績紹介：べん毛モーター固定子複合体 MotPS の Na イオン依存的構造変化の高速 AFM 観察

内橋 貴之 (名古屋大・A02 公募研究代表者)

論文題目："Na⁺-induced structural transition of MotPS for stator assembly of the *Bacillus* flagellar motor"

著者 : Naoya Terahara, Noriyuki Kodera, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Keiichi Namba and Tohru Minamino

雑誌巻号 : *Sci. Adv.* 3, eaao4119 (2017)

大腸菌やサルモネラ属菌などの多くの細菌は、べん毛を回転させることによって様々な環境を移動することができる。べん毛の根本には回転子と固定子から構成される回転分子モーターが細胞膜の中に存在し、これら回転子と固定子の相互作用によってべん毛が回転し、バクテリアは推進力を得る。固定子は大まかに分けて、イオンチャネルとして働く細胞膜ドメインとペプチドグリカン層に結合するペプチドグリカン結合ドメインから構成されている。これまでの研究で、べん毛モーターの固定子がバイオセンサーとして働くことが示唆されており、固定子が外環境の変化を感じる際にはペプチドグリカン結合ドメインがその情報を得て、べん毛モーターの周りに配置される固定子の数が制御されると考えられている。しかし、固定子を複合体の状態のまま精製することが困難であること、さらには構造ダイナミクスを計測することが出来なかったために、どのように固定子がセンサーとして機能するのかメカニズムは不明であった。今回、バチルス属細菌のべん毛固定子であるナトリウムイオン駆動形 MotPS 複合体の精製に成功し、さらに高速 AFM 観察によって MotPS の外部イオン濃度に依存した構造変化を観察した。

基板に吸着させた MotPS 複合体を高速 AFM で観察した結果、MotPS 複合体は大きな楕円状のドメインと小さな楕円状のドメインがリンカーで繋がった分子形態をとり、大きいドメインが細胞膜ドメイン、小さいドメインがペプチドグリカン結合ドメインに相当することが分かった。ナトリウムイオン濃度を変えて観察を行ったところ、ナトリウムイオンが存在しない時はペプチドグリカン結合ドメインの立体構造が解きほぐされた変性状態になり、ナトリウムイオンを添加すると

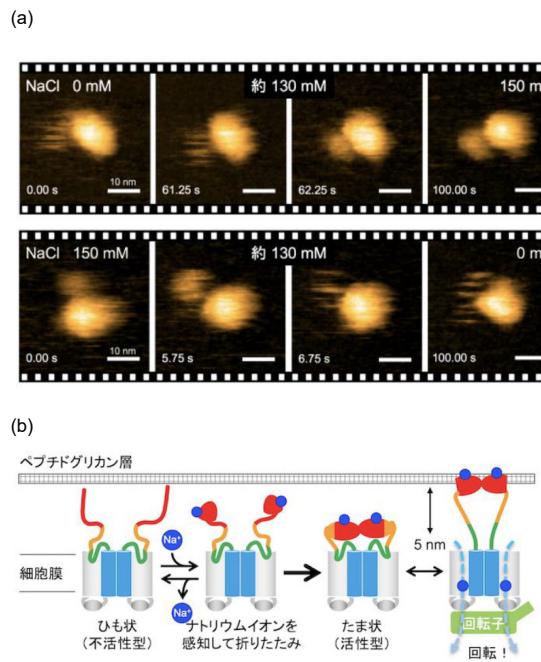


図 1 (a) NaCl の濃度変化による MotPS 複合体の構造変化の高速 AFM 像と(b)MotPS 複合体が活性化されてペプチドグリカン層に結合し、モーターに組み込まれる過程の模式図。

再び折りたたまれて立体構造をとることがわかった(図 1a)。また、リンカー領域が最大で 5 nm 伸縮することも明らかになった。以上の結果から、ナトリウムイオンがペプチドグリカン結合ドメインに結合するとこのドメインは折りたたまれて立体構造をとり、その結果 MotPS 複合体がモーターに組み込まれてナトリウムイオン駆動型の固定子として働くことが示唆された(図 1b)。

モーターの心臓部である固定子複合体 1 分子の振る舞いをリアルタイムで捉えることに初めて成功し、べん毛モーターの固定子はモーターを回転させるために必要なエネルギー源があるときのみ立体構造の変化により活性化し、モーターに組み込まれるというように、「今使えるエネルギー」を選択していることを明らかにした。この結果は、高効率で環境に優しいイオンエネルギーを利用するべん毛モーターの回転機構の解明への大きな第一歩となると期待される。



A02 班 高屋・岩田グループの沖野隼之介君が

第 11 回分子科学討論会で分子科学会優秀講演賞を受賞しました

高屋 智久（学習院大理工・A02 公募研究代表者）
岩田 耕一（学習院大理工・A02 班友）

沖野隼之介君（学習院大学自然科学研究科化学専攻 D2）が、第 11 回分子科学討論会（平成 29 年 9 月 15 日(金)～18 日(月)、東北大学）において分子科学会優秀講演賞を受賞した。沖野君は博士課程から「超高速時間分解可視・近赤外分光計による電子の溶媒和ダイナミクスの解明」に取り組んでおり、試行錯誤を重ねて分光計を設計・製作し、きわめて質の高いデータが再現よく得られるところまでこぎ着けた。沖野君が不斷の努力によって得た成果が高く評価され、今回の受賞となったと、教員として大変嬉しく思っている。

沖野君の講演「水の 2 光子イオン化により発生した電子のダイナミクス：フェムト秒時間分解マルチチャンネル可視近赤外分光による観測」の内容を簡単に紹介する。液体中では、光イオン化によって分子から十分な距離だけ脱離した電子は溶媒分子によって「溶媒和」され、数分子程度の溶媒分子に閉じ込められた「溶媒和電子」としてしばらくの間（水ならばナノ秒オーダーの時間）存在する。普通の原子・分子に比べて電子の運動はきわめて高速であるから、電子が自身よりもずっと遅く運動する溶媒分子によって溶媒和される、ということは当然のように理解できることではない。「電子がどのようにして溶媒分子によって溶媒和され、準安定的に存在できるのか？」という問題は、溶媒和電子の最初の発見（200 年以上前と言われている）以来、現在に至るまで完全な解決に至っていない。

「箱の中の粒子」のような、量子力学の簡単なモデルによれば、電子が小さな空間領域に閉じ込められると、電子がとることのできるエネルギーがとびとびとなる。電子が閉じ込められる空間が小さくなるほど、電子がとりうるエネルギーの間隔は広くなる。このエネルギー間隔を時間分解吸収スペクトル計測によって決定すれば、電子の溶媒和の度合いが時間とともにいかに変化するかを追跡することができる。ところが、従来の溶媒和電子の研究ではこのような実験原理が軽視され、精確な時間分解吸収スペクトルを計測することなく溶媒和の議論が行われていた。

そこで、沖野君は波長 600–1000 nm における光吸収を 0.3 nm の間隔で同時サンプリングできるフェムト秒時間分解マルチチャンネル可視近赤外分光を製作した。この装置により、およそ 1×10^{-3} の吸光度変化（約 0.2 % の光強度変化）を、200 fs 以下の時間分解能で測定可能であることを示した。次いで、第一の測定対象として水の 2 光子イオン化により発生した電子の溶媒和過程を選び、電子の吸収の時間変化を詳細に計測して解析した。その結果、電子の溶媒和に時定数 530 ± 50 fs で進行する成分があること、この機構による溶媒和が遅くとも光イオン化後 200 fs から進行することを見出した。

光イオン化後 200 fs 未満では電子の吸収帯が波長 1000 nm 以上の領域にまで広がっているため、吸収帯の位置を決定できていない。一方で、われわれは波長 1000–1600 nm におけるフェムト秒時間分解マルチチャンネル測定技術を既に有している。沖野君の研究が近赤外領域の分光計測にまで展開されることで、200 fs 未満の時間領域における電子のダイナミクスまで詳細に理解されるであろう。また、有機溶媒や機能性液体中に光生成する電子のダイナミクス研究への展開も期待される。今回の受賞を励みとし、溶媒和電子の研究の新しい局面を開拓していくことを期待している。





田原グループの長谷川君が分子科学討論会ポスター賞を受賞しました

石井 邦彦 (理研・A02 計画研究分担者)

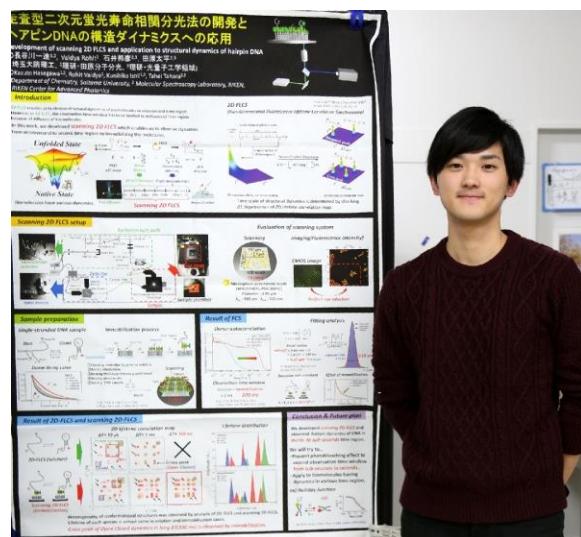
本年 9 月 15 日（金）から 18 日（月）にかけて東北大学生川内北キャンパス（仙台市）で開催された第 11 回分子科学討論会において、A02 計画班田原グループの長谷川一途君が優秀ポスター賞を受賞しました。本討論会では例年多数のポスター発表が行われ（今回は約 450 件）、その中で学会会員の学生による優秀な発表が受賞対象になりますが、長谷川君は見事に 15 名の受賞者の一人に選ばれました。

長谷川君の発表は「走査型二次元蛍光寿命相関分光法の開発とヘアピン DNA の構造ダイナミクスへの応用」と題され、私たちが最近進めている二次元蛍光寿命相関分光法（2D-FLCS）の応用に関するものです。2D-FLCS は私たちが独自に開発した一分子レベルの分子ダイナミクス計測法で、これまでにマイクロ秒オーダーの生体高分子のダイナミクス計測に応用され成果を挙げてきました。本学術領域でも私たちは 2D-FLCS を用いていくつかの共同研究を進めています。2D-FLCS は従来の一分子計測法では困難であった速い時間領域（数ミリ秒以下）のダイナミクス計測に力を発揮しますが、これまでには溶液中で自由拡散する分子を測定対象としていたため、ブラウン運動による観測領域からの散逸が避けられず、ミリ秒以上の時間領域の計測が難しいという課題がありました。私たちは最近、柔らかな分子のダイナミクスの特徴を明らかにするためには、異なる時間スケールのダイナミクスの相関を知ることが重要な目標になり得るのではないかと考え始めました。このためには可能な限り広い時間範囲の現象を「一つの計測法で」追跡が必要です。そのため、一分子計測の分野で用いられる分子の基板固定化技術を応用してブラウン運動の影響を除き、2D-FLCS による計測をミリ秒以上の比較的遅いダイナミクスにも適用しようと考えました。

長谷川君はこの計画に興味をもち、プロジェクトの初期から参画しました。最初は北里大学の卒業研究生として田原グループに加入し、インドからの留学生と協力しながら分子の基板固定、蛍光色素の褪色を防ぐための顕微鏡ステージの走査といった基盤技術の確立を進めました。学部卒業後は埼玉大学の大学院に所属しながら理研で研究を続けています。修士課程研究のテーマとして本プロジェクトのために新たに導入した

一分子蛍光測定システムの立ち上げを任せられ、白色パルス光源を用いた光学系のセットアップと調整、ピエゾステージの走査プログラムの開発、蛍光イメージング／蛍光相関測定による性能評価などを精力的に進めました。完成した装置を応用して FRET 標識したヘアピン DNA を測定し、約 100 ミリ秒までのダイナミクスを 2D-FLCS で計測可能であることを示したのが今回の発表の中心的な成果です。装置製作・評価や基板固定のための化学的手法から生体分子への応用まで中身の濃い内容を、3D グラフィックスを駆使した美しいポスターにまとめたことが、審査員の方に高く評価されたものと思います。

ポスドク以上の研究者が中心で同年代の仲間がほとんどいない環境で研究生活を送ることは学部生や修士課程の学生にとってハードルが高い面もあると思いますが、長谷川君は意欲的に研究と勉強に取り組み、その高い能力をいかんなく発揮しながら、物理化学以外にも生物学など幅広い興味をもって知識を吸収しています。周囲の年長の人間にとて彼の存在は良い刺激になっています。現在長谷川君は自身で開発した装置を応用して生物学的に重要な系のダイナミクスを調べる研究を進めようとしています。今後の発展を非常に楽しみにしています。



受賞ポスターと長谷川一途君。



A02 班藤井研究室 佐々木裕太君が分子科学会優秀ポスター賞を受賞

石内 俊一（東工大化生研・A02 班分担者）

A02 班藤井研究室の佐々木裕太君が第 11 回分子科学討論会（仙台）で「エレクトロスプレー・冷却イオントラップ法による K^+ チャンネル選択フィルターパートペプチド-アルカリ金属錯体水和とクラスターの構造研究」と題する発表を行い、優秀ポスター賞を受賞した。これは本新学術領域研究の成果であり、共同研究者として大変喜ばしく、心よりお祝い申し上げる次第である。この紙面をお借りして、簡単にその成果を紹介させていただきたい。

本研究は K^+ チャンネルの 1 つである KcsA の選択フィルター (K^+ が選択的に結合するアミノ酸配列) に注目し、この部分配列を切り出したペプチド Ac-Y-NHMe と Na^+ および K^+ の錯体をエレクトロスプレー法で真空中に取り出し、冷却イオントラップで極低温に冷却することでコンフォメーションを凍結し、赤外分光により K^+ 錯体の構造特異性を明らかにした。

図 1 に Ac-Y-NHMe ペプチドの Na^+ および K^+ 錯体の赤外スペクトルを示す。このスペクトルは、それぞれの錯体の水素クラスターが赤外吸収したときに生成する錯体モノマーイオンを検出することで測定した（厳密には Ac-Y-NHMe· M^+ · H_2 の赤外スペクトルであるが、 H_2 による摂動は小さいと見なせるので、それぞれの錯体単体の赤外スペクトルと見なせる）。それぞれのスペクトルを比較すると、amide-I 振動に顕著な違いが見出された。 Na^+ 錯体では主に 2 本のバンド（1680 および 1700 cm^{-1} ）が同程度の強度で観測されるが、 K^+ 錯体では高波数側のバンド強度が大きく低下している。量子化学計算によると、それぞれの金属イオンはペプチドの 2 つのカルボニル基が配位した構造が安定であり、これらに加えてチロシン残基のベンゼン環も配位した構造も見出された。つまり可能な構造は 2 つのカルボニル基だけが配位した構造（O/O 構造）と加えてベンゼン環も配位した構造（O/O/R 構造）であり、それぞれの理論赤外スペクトルと実測のスペクトルを比較することで、amide-I の低波数側が O/O 構造、高波数側が O/O/R 構造に由来することが分かった。したがって、実測の赤外スペクトルから、 K^+ 錯体では O/O 構造がほとんどであるが、 Na^+ 錯体では O/O/R 構造の寄与が増大することが示された。

この結果は、Ac-Y-NHMe ペプチドの配位による K^+ の安定化は 2 つのカルボニル基だけで十分であるが、 Na^+ の場合はこれらだけでは不十分であり、ベンゼン

環の配位による安定化が必要であると解釈できる。KcsA ではチロシン残基はチャンネルの外を向いているため、もし Na^+ が結合しても O/O/R 構造をとることはできないと考えられ、 Na^+ の結合が K^+ に比べて不安定であることが実験的に示された。

本研究ではさらにこれらの錯体の水和クラスターも測定しており、 Na^+ 錯体では水分子が Na^+ にのみ配位するのに対して、 K^+ 錯体ではペプチドにも配位することが分かった。 Na^+ 錯体では水分子が専ら Na^+ の安定化に寄与しているが、 K^+ の場合は、その安定化がペプチドだけで十分であるため、ペプチドの水和が観測されたと解釈できる。

今後はさらに大きな水クラスターを測定することで、アルカリ金属イオンに対する水和とペプチド配位の競合が観測されると期待され、ますますの発展がとても楽しみである。

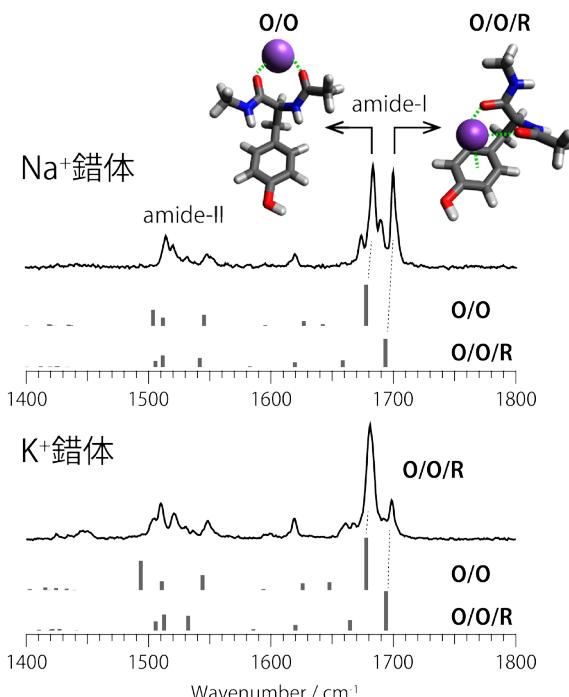


図 1 Ac-Tyr-NHMe ペプチドの Na^+ 及び K^+ 錯体の赤外スペクトルと構造帰属

