

2B02

アンチストークス蛍光の特性：異種葉緑体識別能力と 人工的クロロフィル会合体検出

(1)京大院理、(2)JST さげがけ) 長谷川 慎¹, 吉田 隆彦¹, 藪田 光教¹, 寺嶋 正秀¹,
○熊崎 茂一^{1,2}

【序】 植物の葉緑体やシアノバクテリアが示す自家蛍光ではクロロフィルが最も長波長に現れる。生理的な温度におけるクロロフィル自家蛍光では、二つの光化学系色素-タンパク質複合体 (PSII と PSI) のうち PSII からの寄与が支配的であり、PSI からの蛍光を観測するためには 77K などの低温蛍光測定が用いられてきた。生理的温度で PSI のみの蛍光を観測するという例外的な現象は PSII が失われた C₄植物 (トウモロコシなど) の維管束鞘葉緑体やシアノバクテリアの異型細胞などに限られた現象であった。近赤外パルスレーザー励起 2 光子励起蛍光スペクトル顕微鏡 [1,2]によって PSI と PSII が含まれるチラコイド膜の微細構造を観察する試みの途上で、我々は「785nm - 820 nm で発振する連続発振レーザー(CW レーザー)によってもクロロフィル蛍光スペクトルが観測され、そのスペクトル形状は近赤外パルスレーザー励起や可視光線励起の場合とは異なり、PSI の蛍光スペクトルが強く観測される」という現象を見出した[3]。励起レーザー強度依存性、励起レーザー波長依存性の解析から、少なくとも見かけ 1 光子励起の現象である[3]。PSI の蛍光が相対的に強くなる原因は PSI の吸収スペクトルの裾野が PSII に比べて圧倒的に強く近赤外領域まで伸びているためであると考えられ、励起波長に比べて大幅に短波長シフトした蛍光が観察されるので既報の論文に倣ってアンチストークス蛍光と呼んでいる[4]。この顕微分光法は常温で PSII:PSI の相対蛍光強度を光学顕微鏡の空間分解で画像化するために有効であるが、これまでトウモロコシ葉緑体で我々が実証したのみであったので、得られる PSI 蛍光スペクトルに関する信頼性が不確かであった。本報告では低温蛍光スペクトルの極大波長がトウモロコシとは異なる緑藻の一種クロレラについても近赤外レーザーパルス 2 光子励起蛍光スペクトルと近赤外 CW レーザー 1 光子励起蛍光スペクトルの比較を行った。また、同じ緑藻において、培養液に有機溶媒が混入した場合に引き起こされるクロロフィル会合体の形成過程の顕微分光観察を行った。クロロフィル会合体は単量体的クロロフィルに比べ、大幅に長波長側に吸収がシフトするため、近赤外 CW レーザーによる直接励起によりアンチストークス蛍光の強度が大きいと期待されたからである。

【試料・方法】 トウモロコシ生葉(*Zea mays*)と緑藻クロレラ(*Parachlorella kessleri*, 本稿ではクロレラと呼ぶ)は閉じ込め型セル中に水および培養液と共に封入し、油浸 100 倍の対物レンズで観察した。2 光子励起蛍光は 808 nm, 0.2 ps, 76MHz のレーザー、1 光子励起アンチストークス蛍光は 785 nm の CW レーザーで得た。クロレラに人工クロロフィル会合体を形成させる処置は、通常の培養液をアセトンと混合 (体積比 85:15) することで実現した。

【結果と考察】 本クロレラにおいては 77K で系 I 蛍光スペクトルの極大波長が 725nm であり、トウモロコシなどの植物が 735-740nm に極大波長を示すのに比べ短波長である。この特徴を常温の系 I アンチストークス蛍光スペクトルが示すのか否かに着目した。クロレラの場合、連続発振レーザー(785 nm)によって増大する系 I 特有成分の極大波長は 710 nm であった[5]。トウモロコシでは葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体の両方において、系 I 特有成分の極大波長は 730 -740 nm

と得られた。よって、低温での系1蛍光スペクトルの極大波長と全く同じではないにせよ、低温系1蛍光との相関関係があることが明確に示された。

アセトン入りの培養液に移植されたクロレラ細胞が示す蛍光スペクトル変化を近赤外パルス励起とCW励起の両方、および顕微吸収スペクトルで経過を追跡した[5]。10時間以内の変化の全ての種類の蛍光スペクトルは5つのスペクトル成分に分解された[5]。それらのスペクトル成分に分解して時間変化を表示した画像を下に示す。人工的なプロセスながら、有機溶媒が緑藻細胞にもたらす変化を、細胞内部構造、スペクトル変化成分の両面から同時に明らかにした世界初の観測例と考えられ、藻類の工学的利用のためにも有用な情報が含まれていると期待される。

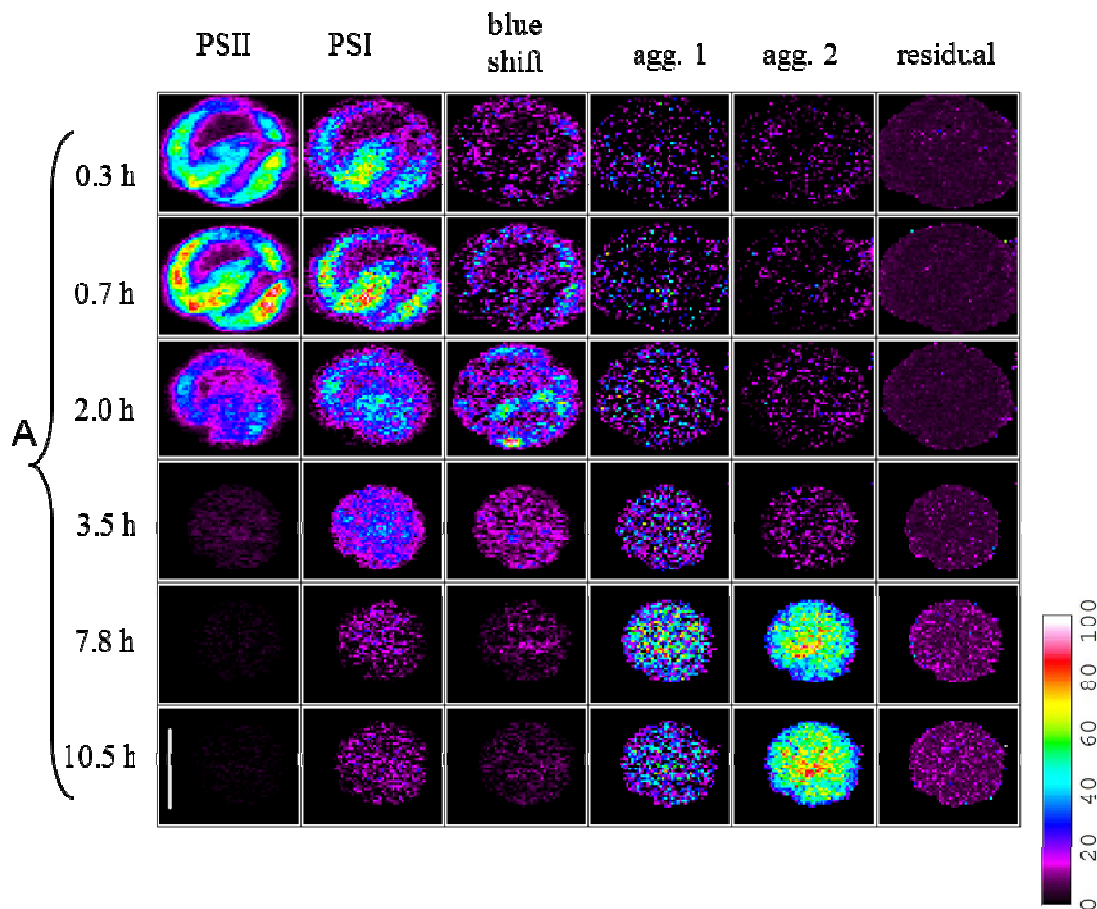


Fig. Five fluorescence components in a *P. kessleri* cell treated with acetone. Bar=5.0 μ m

[文献] [1] *S. Kumazaki M. Hasegawa, M. Ghoneim, Y. Shimizu, K. Okamoto, M. Nishiyama, H. Oh-oka and M. Terazima *J. Microsc.* 228, 240 - 254, (2007).

[2] *熊崎茂一, 長谷川 慎, 分光研究, 60(1), 19 - 21 (2011)

[3] M. Hasegawa, T. Shiina, M. Terazima, and *S. Kumazaki, *Plant Cell Physiol.*, 51(2), 225 - 238 (2010).

[4] E. Kato and T. Murakami, *Polym. Gels and Netw.*, 6, 179 - 190, (1998).

[5] M. Hasegawa, T. Yoshida, M. Yabuta, M. Terazima and *S. Kumazaki, *J. Phys. Chem. B*, 115, 4184 - 4194, (2011).

* corresponding address => kumazaki と kuchem.kyoto-u.ac.jp の間にアットマーク

2B03

光合成酸素発生反応におけるプロトン共役電子移動の高周波 ESR 研究

(東北大多元研¹, 岡山大院自然², アガペ甲山医研³) ○松岡秀人¹, 沈建仁², 河盛阿佐子³, 伊東信哉¹, 大庭裕範¹, 山内 清語¹

【序論】酸素発生型光合成反応の根幹をなす水分解-酸素発生反応は、光化学系 II 反応中心複合体で行われる。最近、光化学系IIの結晶構造解析が原子レベルの高い空間分解能で明らかにされ、チロシン残基 Yz を含むプロトン共役電子移動経路の存在が示唆された [1]。チロシン残基 Yz は、その酸化還元力から酸素発生反応において重要な役割を担うことが以前から期待されているが、実際にチロシン残基 Yz が水分子から水素を引き抜く役目を担っているのか否かについては多くの議論がなされている。本研究では、Yz の水素結合構造とプロトン共役電子移動反応機構の解明を目指して、単結晶光化学系 II に対する高周波(95GHz)パルス ESR と DFT 計算による研究を行った。

【実験】好熱性らん藻 *Thermosynechococcus vulcanus* から光化学系 II 複合体を単離・精製し、単結晶試料を作成した [1]。Yz ラジカルを安定に捕捉するため、ヒドロキシルアミン (NH₂OH) を用いて酸素発生中心 Mn₄ クラスターを取り除いた。高周波パルス ESR 測定は、Bruker 社製 ELEXSYS E600 分光器にマイクロ波パルスブリッジ (94.9GHz) を組み込むことで構築した。

【結果と考察】光化学系 II 反応中心における電子伝達系として 4 核の Mn₄ クラスター、チロシン残基(Yz)、二量体クロロフィル(スペシャルペア)、フェオフィチン(Pheo)、プラストキノン(Q_A, Q_B)などの存在が知られている (Fig.1)。暗中において非磁性分子である Yz はスペシャルペアに電子を供給すると過渡的常磁性種となるが、酸素発生中心 Mn₄ クラスターから電子を受け取り再び非磁性分子となる。そこで本研究では、ヒドロキシルアミン(NH₂OH)を用いて Mn₄ クラスターを取り除いた光化学系 II 複合体を用いることで Yz ラジカルを安定に捕捉した。

Fig.2 および Fig.3 にはそれぞれ、凍結溶液および単結晶試料中の Yz ラジカルに対して観測した ESR スペクトルを示す。測定では、まず 253K で白色光を 20 秒間照射後、光照射を行いながら 200K まで冷却した。光照射を遮断した後も、さらに測定温度 (80K) まで冷却を続けることで、チロシンラジカル Yz の捕捉を行った。解析の結果、Yz ラジカルの

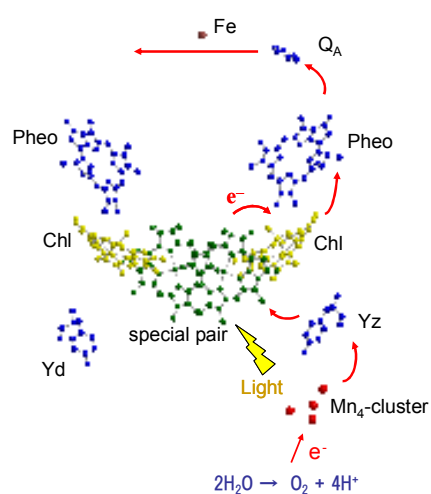


Fig.1 光化学系 II 反応中心における電子移動成分の立体配置.

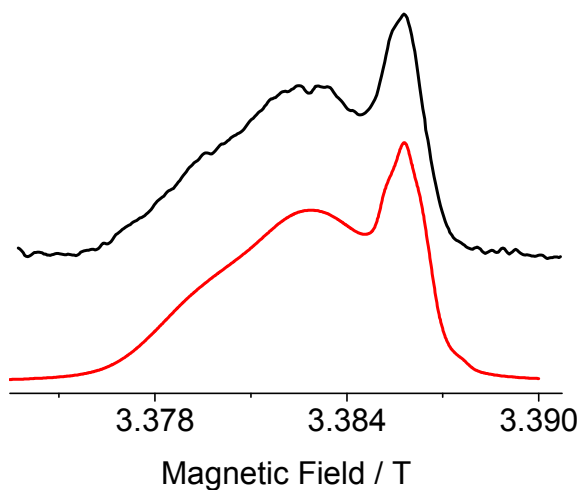


Fig. 2 光化学系 II 凍結溶液中の Y_Z ラジカルの高周波 ESR スペクトル. (a) 実測、(b) シミュレーション.

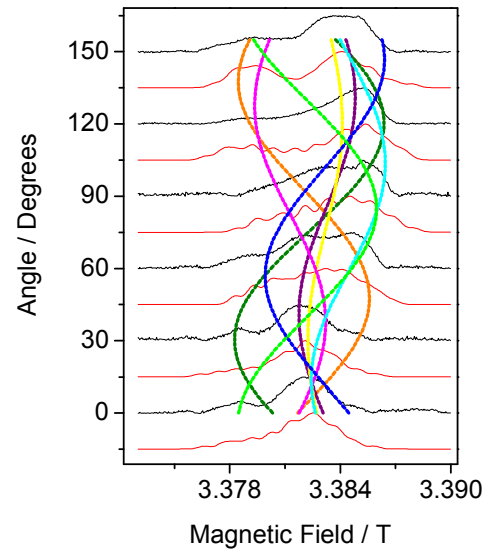


Fig. 3 単結晶光化学系 II における Y_Z ラジカルの高周波 ESR スペクトル. 黒: 実測、赤: シミュレーション.

g 値を次のように決定した: $g_x = 2.00705$, $g_y = 2.00436$, $g_z = 2.00219$.

結晶構造解析などの結果から、 Y_Z 分子は近傍の Histidine 残基と水素結合をしていることが明らかとなっている。水素結合構造からプロトン共役電子移動反応を検証するため、本研究では Y_Z ラジカルの g 値に対して DFT 計算を行った。Histidine 残基の imidazole 環は水素結合により imidazolium カチオン構造をとると仮定した DFT 計算では、最適化構造の水素結合距離が 1.60\AA 、 g_x の値は 2.00721 であった。さらに、周囲の蛋白質が及ぼす g 値への影響を調べるため、COSMO (Conductor-like Screening Model) を用いた DFT 計算も行った。その結果、最安定構造の水素結合距離は 1.69\AA 、 g_x の値は 2.0069 であり、どちらも実測をよく再現した。一方で、 Y_Z から imidazole 環への水素移動に伴って、水素結合に関与しない窒素側から水素が失われた中性の imidazole 構造を仮定した DFT 計算も行った (COSMO による周辺環境も考慮した)。得られた g_x の値は 2.0084 であり、実測を満足しなかった。その結果、 Mn_4 クラスタを取り除いた光化学系 II 反応中心では Y_Z の酸化に伴って imidazolium カチオンが生成していると結論付けられた。この結果は水分解-酸素発生反応において提唱されている Proton-Rocking Model を支持しており、 Mn_4 クラスタを取り除いた光化学系 II の実験では Y_Z 残基が水分子から水素を引抜く proton abstractor として働いていないことが示された [2]。

- [1] Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen and Nobuo Kamiya, *Nature*, **473**, 55-60 (2011).
- [2] Hideto Matsuoka, Jian-Ren Shen, Asako Kawamori, Kei Nishiyama, Yasunori Ohba, and Seigo Yamauchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4655-4660 (2011).

タンパク質の光誘起結晶化 テンプレート分子の考察

(群馬大院工¹・JST さきがけ²) 奥津哲夫^{1,2}, 黒岩高志¹, 高瀬裕太¹, 堀内宏明¹

我々はタンパク質の光誘起結晶化の現象を見だし、機構の解明を進め、実用化の検討を行ってきた¹⁾。Fig. 1 に結晶化の初期過程を示す。モノマーから分子の集合体が形成され、臨界核を超えた大きさになると自発的に結晶成長が始まる。過飽和であっても臨界核以下のクラスターは表面自由エネルギー不利のため不安定で、核形成が起こらない準安定状態の領域が存在する。タンパク質は結晶となるための分子間力が弱く、かつ分子の異方性が大きいという特徴があり、核形成が起こりにくいいため溶解度の数十倍も溶けてしまうことがある。

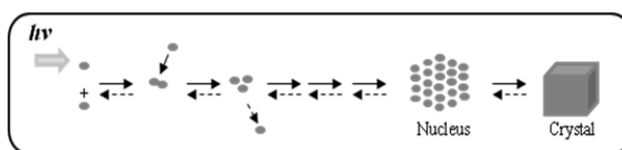


Fig.1. Light-induced crystallization mechanism of protein.

このように過飽和でありながら、核形成が自発的に始まらない溶液中のタンパクに化学反応を起こさせ、ダイマーを生成させると核形成が始まる現象が光誘起結晶化である。反応で生成したダイマーは共有結合性で安定であり、モノマーから出発する場合に比べて臨界核を超えるための段階が一つ減り、結晶化頻度が高くなると説明してきた。

本討論会では反応で生成したダイマーが臨界核に成長する構造をしているか検討する。ダイマーが結晶に成長するためには、ダイマーが結晶中の隣り合う二つの分子と同じ構造をしていることが必要と考えられる。このような分子のことをテンプレート分子と言うことにする。光化学反応で生成したダイマーは、Tyr 残基同士で結合する構造を取ることが多いので、必ずダイマーがテンプレート分子として機能するとは考えられない。そこで、テンプレート分子が生成するような反応の機構を検討した。そのために、キノンの光化学反応を応用し、様々な構造のダイマーを形成させそのうちのどれかがテンプレート分子となることを期待した。

また、一旦テンプレート分子が形成され、自発的に結晶成長が始まれば、溶液に光を当て続ける必要が無くなり、タンパク質の損傷を最小限にとどめることができる。テンプレート分子の形成を光散乱で検出した。

実験 タンパク質にはニワトリ卵白リゾチームあるいはリボヌクレアーゼ A を用いた。反応用の光源に 355nm のレーザー光を用いた。キノンにフェナンスレンキノンを用いた。タンパクは 355nm の光を吸収せずキノンのみが吸収する。散乱光は HeNe レーザー光を用い、フォトダイオードを用いて 90 度方向から検出した。

結果と考察 Fig. 2 に光散乱測定の結果を示す。横軸に光照射時間、縦軸に散乱光の強度をプロットした。試料溶液は 2mg のリゾチームを含む等電点の pH の溶液で、自発的には何も起こらない溶液である。照射を始めて 600 s 経過した頃から散乱光が急激に立ち上がり、その後増減を繰り返しながら散乱光は増えていった。途中で光照射を止めても、200s 照射すると散乱光は増加した。散乱光をもたらした物質がテンプレート分子であるか確認するために、この溶液を過飽和な溶液に滴下し成長するか確かめた。Fig. 2 の右軸に結晶の出現頻度を棒グラフで示した。この結果から、散乱光が急激に立ち上がる時、すなわちクラスターが急激に成長した時、テンプレート分子が生成したと考えられる。この実験は、リボヌクレアーゼ A でも成立した。

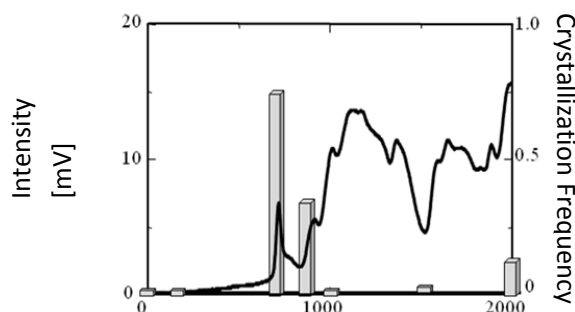


Fig.2. Light scattering measurement and crystallization frequency of Lysozyme.

次にテンプレート分子として求められる構造について考察した。リゾチームの場合分子表面の Tyr 残基は 3 個ある。このうち、 ^{53}Tyr - ^{53}Tyr 部位で結合したダイマーは結晶中の単位格子の中で隣り合う二つの分子と近い配置を有するのでテンプレート分子であると考えられる。しかしながら、反応で生じるダイマーの構造は必ずしもテンプレート分子にならないことがわかった。そこで、キノンを加えキノンのみを励起し、タンパクダイマーが生成するか確認した。電気泳動によりダイマーの存在が確認できた。次に散乱光測定を行った。結果を Fig. 3 に示す。キノンを加えた溶液に光を当てると散乱光が急激に増加する様子が確認された。また、キノンの励起でリゾチームの結晶化が促進されることも確認した。

次にテンプレート分子として求められる構造について考察した。リゾチームの場合分子表面の Tyr 残基は 3 個ある。このうち、 ^{53}Tyr - ^{53}Tyr 部位で結合したダイマーは結晶中の単位格子の中で隣り合う二つの分子と近い配置を有するのでテンプレート分子であると考えられる。しかしながら、反応で生じるダイマーの構造は必ずしもテンプレート分子にならないことがわかった。そこで、キノンを加えキノンのみを励起し、タンパクダイマーが生成するか確認した。電気泳動によりダイマーの存在が確認できた。次に散乱光測定を行った。結果を Fig. 3 に示す。キノンを加えた溶液に光を当てると散乱光が急激に増加する様子が確認された。また、キノンの励起でリゾチームの結晶化が促進されることも確認した。

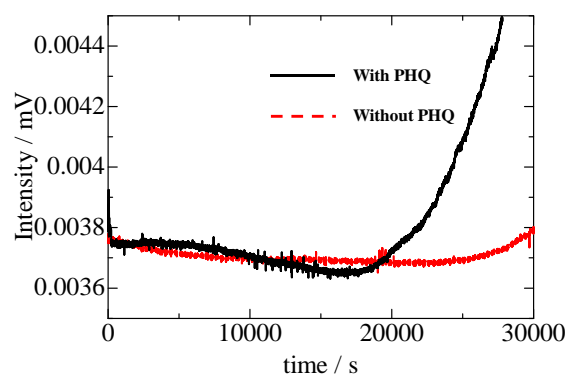


Fig. 3 Light scattering measurement of Lysozyme and PHQ mixture solution.

1) T. Okutsu, J. Photochem. Photobiology C: Photochemistry Reviews **2007**, 8, 143.

2B05

紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光による

イエロープロテイン発色団の超高速励起状態構造ダイナミクスの観測

(東工大院・理工¹, 理研・田原分子分光²)

○倉持光^{1,2}, 竹内佐年², 田原太平²

生化学的な機能や応答は様々な時間スケールで起こるタンパク質の構造変化と密接な関係を持つため、それらを理解するためには中間状態の構造を知ることが重要である。特に光受容タンパク質における構造変化は多くの場合、内包された発色団の光吸収によって引き起こされる発色団自身の、蛋白質全体から見れば非常に小さな構造変化をトリガーとして開始し、タンパク質はサブピコ秒から時には数秒に渡る高次構造変化を伴う光サイクルを経ながら機能を発現する。このような機能・構造相関の観点から様々な光受容タンパク質が活発に研究されている。とりわけイエロープロテイン(Photoactive Yellow Protein: PYP)は

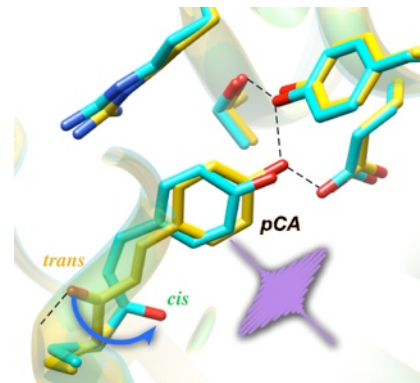


図1. PYP中におけるpCAのtrans-cis光異性化。

は紅色光合成細菌(*Halorhodospira halophila*)の負の走行性を担う光受容タンパク質として知られ、その機能発現の分子レベルでの仕組みに興味を持たれている。これまでの研究から、PYPの機能発現の分子機構はCys69に繋がれた発色団p-クマル酸 (pCA) のtrans-cis異性化に始まり(図1)、OH基のプロトン付加、脱離を含む数百ミリ秒で完了する光サイクルによると考えられている[1]。しかし、その光サイクルは多くの中間体を含む複雑なものであるため、未だに明らかでない点も多い。特に、光サイクルを開始させると考えられる最も重要なpCAのtrans-cis異性化については、赤外ポンプ・プローブ分光により光励起後 3 ± 1 psでcis体が生成すると提唱されているが[2]、励起状態における構造変化を直接観測した例は今までにない。そこで我々は今回新たに開発した紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光法(UV-FSRS)を用い、PYPの発色団であるtrans-pCA単体の励起状態における超高速構造ダイナミクスの観測を行った。

図2に示す通りFSRS[3-5]ではまず光反応を開始させるための励起光(Ex)により電子励起状態を生成させる。任意の遅延時間の後、励起状態の吸収に共鳴する狭帯域ラマンポンプ光(Rp)とフェムト秒白色光(Pr)を同時に照射し、励起状態の振動をラマン利得信号として検出する。この方法による時間分解スペクトル測定の数分解能と遅延時間精度はそれぞれRp光の帯域幅、Ex光とPr光の相互相関幅で決まる。このため従来の時間分解自発ラマン分光法とは異なり高い波数分解能を保ちながらも数十

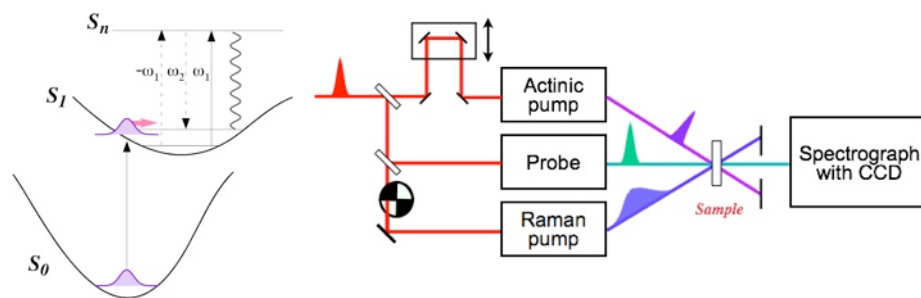


図2. FSRSの実験スキームと装置図。

フェムト秒の時間スケールで遅延時間を変えつつラマンスペクトルを測定することができる。実験では光源としてチタンサファイア再生増幅器の出力(800 nm, 80 fs, 1 kHz)を用い、OPAの第4高調波(300 nm)をEx光として、またCaF₂中で発生させたフェムト秒白色光をPr光として用いた。また紫外Rp光には狭帯域OPAの出力の第2高調波(350-375nm)を用いた。時間、波数分解能はそれぞれ約150 fs, 15 cm⁻¹であった。

図3にリン酸緩衝溶液(pH=7.0)中における*trans*-pCAの吸収、蛍光スペクトルと315 nmで光励起した場合に得られるフェムト秒過渡吸収スペクトルを示す。まず光励起直後には375 nmをピークとして320 nm から450 nmに幅広い励起状態吸収帯が現れる。次にその吸収が約1 psで減衰するとともに、350 nmを中心とする励起状態吸収と420 nmを中心とする誘導放出帯が出現することがわかる。この励起状態吸収と誘導放出はともに2.5 psの時定数で減衰することから、これらの信号は”bright”な最低電子励起状態のポピュレーションの減衰を反映していると考えられる。ここで観測された大きなスペクトル形状変化は光励起後1 psの間にpCAの励起分子に何らかのダイナミクスがあることを示唆している。この点を明らかにするために我々は、Rp光の波長がこれらの励起状態吸収に共鳴する条件でUV-FSRS測定を行った。光励起直後の吸収に強く共鳴する375 nmのRp光を用いた場合に観測されるUV-FSRSスペクトルを図4に示す。観測はストークス側で行っている。この図から分かるように、800 cm⁻¹から1700 cm⁻¹にかけて複数の過渡ラマンバンドが観測された。これらのバンドは10 ps にかけてほぼ消失するが、その中でも1180, 1370, 1630 cm⁻¹付近のバンドは特に減衰が速く、励起後約1 psにおけるスペクトル形状は励起直後におけるそれとは大きく異なる。この結果は励起後1 ps以内に大きな構造変化が起こっていることを示しており、異性化がサブピコ秒で進行している可能性を強く示唆している。講演では、過渡吸収およびUV-FSRSデータの定量的な解析結果に基づいてPYP発色団分子の励起状態における構造ダイナミクスについて詳細に議論する。

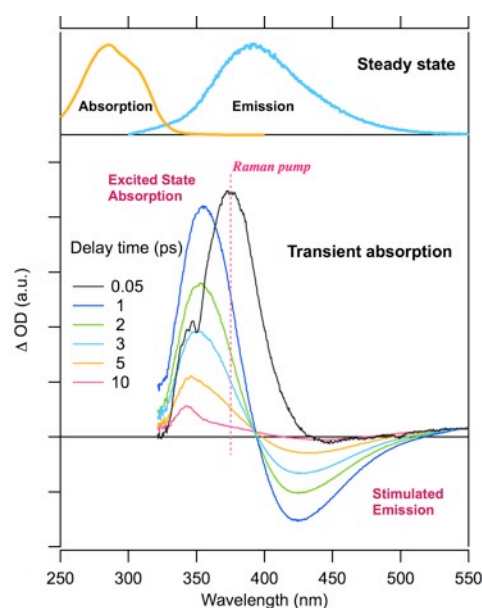


図3. *trans*-pCAの定常状態吸収、蛍光スペクトル及びフェムト秒過渡吸収スペクトル。

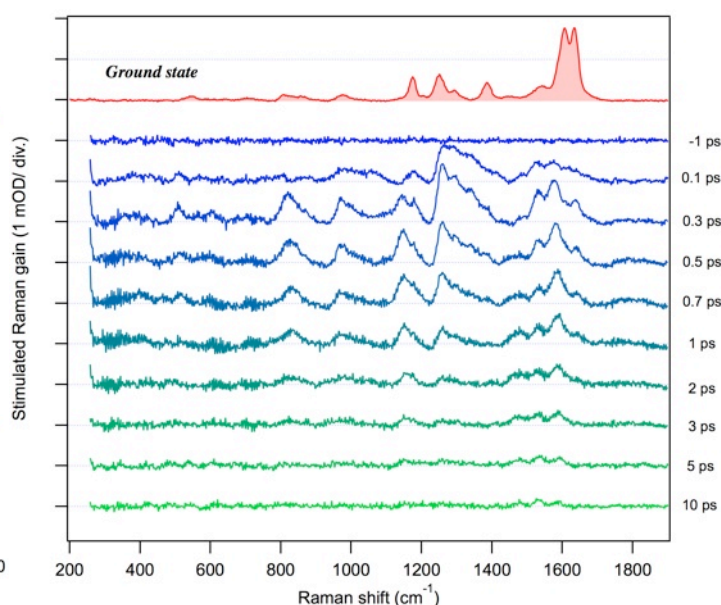


図4. UV-FSRSスペクトル(Rp=375 nm)と基底状態におけるラマンスペクトル。

【参考文献】

- [1] Hellingwerf, K. J.; Hendriks, J.; Gensch, T. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 1082. [2] Heyne, K.; Mohammed, O. F.; Usman, A.; Dreyer, J.; Nibbering, E. T. J.; Cusanovich, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18100. [3] Yoshizawa, M.; Kurosawa, M. *Phys. Rev. A* **1999**, *61*, 013808. [4] Kukura, P.; McCamant, D. W.; Mathies, R. A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 461. [5] Kovalenko, S. A.; Dobryakov, A. L.; Ernstring, N. P. *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82*, 063102.

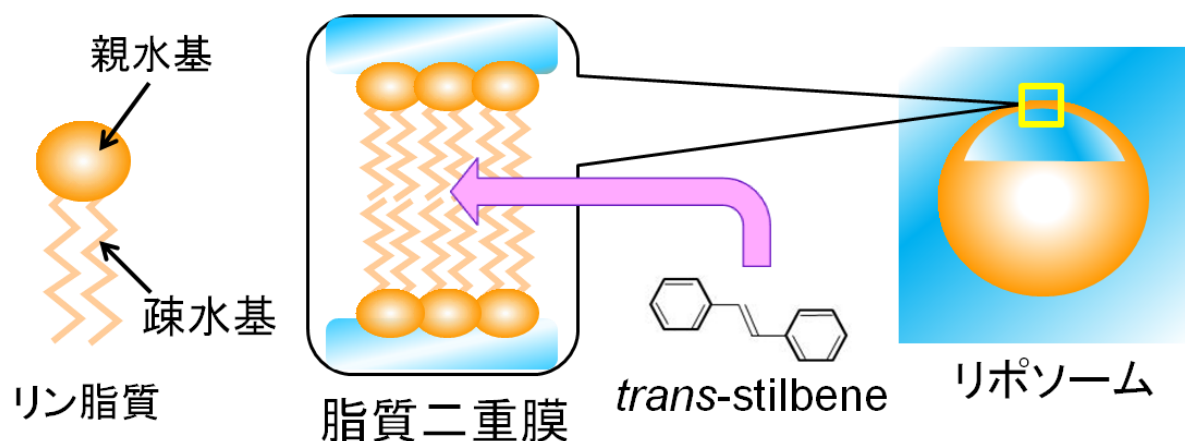
2B06

ピコ秒時間分解けい光分光法によるリポソーム脂質二重膜の粘度の評価

：温度およびリン脂質の種類に依存した膜内環境の変化

(学習院大理)○野嶋優妃, 岩田耕一

【序】 光合成における電子伝達など生体膜内で進行する生化学反応は多数ある。これらの化学反応の速度および機構は化学反応場の環境に左右される。そのため生化学反応を理解するためには、化学反応場としての生体膜の環境を知る必要がある。本研究では生体膜のモデルであるリポソームの脂質二重膜中の局所的環境をピコ秒時間分解けい光分光法を用いて調べた。リポソーム脂質膜中に *trans*-スチルベンを封入し、そのけい光寿命とけい光異方性の減衰速度から膜中の粘度を見積もった。脂質の種類や温度に対する膜中の粘度の依存性を比較し、化学反応場としての脂質二重膜の特性について考察した。



【実験】 薄膜法を用いて、リン脂質より *trans*-スチルベン内封リポソーム水溶液を得た。得られたリポソームの径をエクストルーダーにより 100 nm に調整した。リン脂質として、炭化水素鎖の炭素数が異なる以下の六種類の脂質を用いた; Egg-PC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DOPC. リポソーム中の *trans*-スチルベンのけい光スペクトルの時間変化をピコ秒時間分解けい光分光計を用いて測定した。ピコ秒時間分解けい光分光計は、モード同期チタンサファイアレーザー、再生増幅器、光パラメトリック増幅器、分光器、ストリークカメラからなる。光パラメトリック増幅器の出力を第四高調波発生により 300 nm に変換し、励起光として用いた。試料はギアポンプにより循環させ、光励起による劣化を防いだ。異なる温度におけるリポソーム試料のけい光寿命の測定には、温度可変セルホルダーを用いた。試料から生じたけい光を偏光子、偏光消光板、励起光除去用のフィルタを経て分光器に導入し、ストリークカメラで検出した。

【結果と考察】

①膜中の粘度の炭化水素鎖長に対する依存性: リポソーム脂質二重膜中のスチルベンのけい光寿命をマジックアングルで測定した。Egg-PCリポソーム膜中でのけい光減衰曲線¹⁾を図1に示す。スチルベンのけい光減衰曲線は、通常の有機溶媒中においては単一指数関数でよく近似されるが、リポソーム膜中では二重指数関数でよく近似された。これは脂質二重膜中に二種類の異なる環境が存在することを示唆する。求めたけい光寿命と既知の *trans*-スチルベンの放射減衰速度定数 ($k_f = 6.0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) とから *trans*-スチルベンの異性化反応速度定数 k_{iso} を算出した。アルカン中での *trans*-スチルベンの k_{iso} と粘度の関係(既知)から脂質膜中の *trans*-スチルベン近傍の粘度を見積もった(図2)。測定の結果から、リポソーム脂質

二重膜中にはアルカン程度の粘度をもつ環境と、その百倍程度の大きさの粘度をもつ環境の二種類が存在すると推測した。どちらの環境でも、脂質の炭化水素鎖の炭素数が多くなるにつれて、粘度が大きくなった。

けい光異方性減衰曲線の測定より得られた回転緩和時間からも脂質二重膜中の粘度を見積もった。¹⁾ その結果、脂質二重膜中に粘度が 50 倍程度異なる二種類の環境が観測された。回転緩和時間から見積もられた粘度も、脂質の炭化水素鎖の炭素数が多くなるにつれ、大きくなった。

②DMPC リポソーム脂質二重膜における膜中の粘度

温度依存性: 脂質二重膜は周囲の温度によって主にゲル相と液晶相の二種類の状態をとる。液晶相と比べ、ゲル相の脂質二重膜では炭化水素鎖のパッキングが良いため膜の流動性が小さい。炭化水素鎖の炭素数が 14 の DMPC から成る脂質二重膜のゲル相から液晶相への相転移温度は 23.9 °C と報告されている。DMPC から調整した *trans*-スチルベン内封リポソーム水溶液の温度を 50 °C から 7 °C まで変化させて、けい光寿命を測定し、その値から膜中の粘度を見積もった。DMPC リポソーム膜中でのスチルベンの各温度でのけい光減衰曲線は、二重指数関数でよく近似された。近似より得られた二種類のけい光減衰成分(τ_1 , τ_2)の強度比(I_1/I_2)の温度変化を求めた結果、相転移温度の前後で膜の温度が低くなるにつれて強度比が小さくなる傾向が観測された。けい光寿命の強度比を、膜内の粘度が異なる二種類の環境の存在比だと仮定すると、脂質二重膜の温度が低くなるにつれて、膜内の環境がより不均一になっていくと考えることができる。

①と②から、リポソーム脂質二重膜中は粘度が異なる二種類の環境が存在する不均一な反応場であることがわかった。また、脂質二重膜中の環境は低温になるにつれてさらに不均一になることが示唆された。

【参考文献】1. Y. Nojima and K. Iwata, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 1817 – 1824.

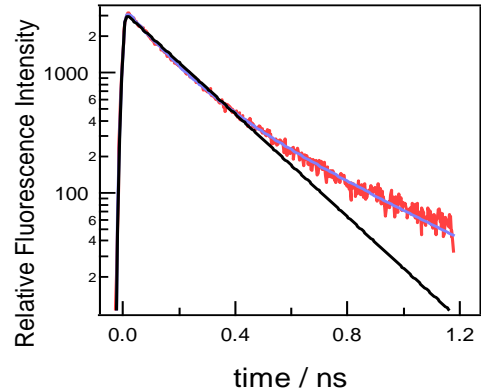


図 1: Egg-PC リポソーム膜中におけるけい光減衰曲線. 赤線が実測値, 青線が二重指数関数による近似曲線, 黒線が単一指数関数による近似曲線を表す.

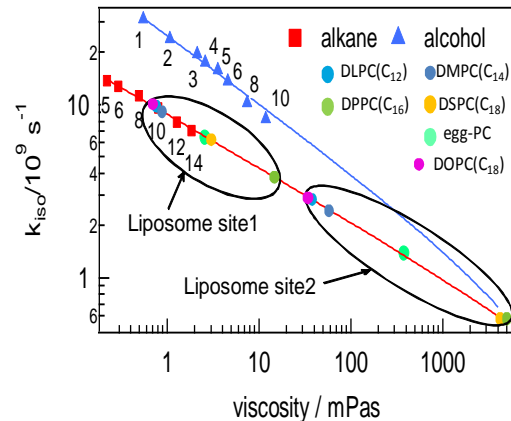


図 2: スチルベンの光異性化反応速度定数 k_{iso} と溶媒の粘度の相関. 図中の数字は溶媒分子の炭素数を示す. k_{iso} の値から見積もられた膜中の粘度が丸で表されている.

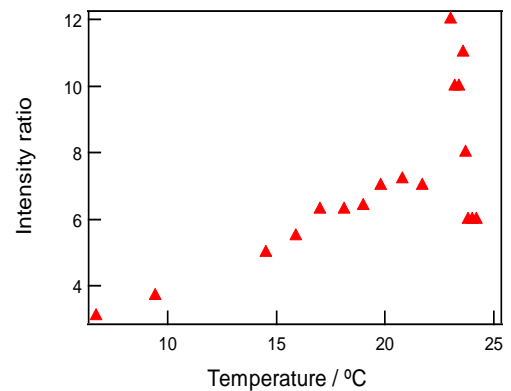


図 3: スチルベンの二種類のけい光減衰成分 (τ_1 , τ_2) の強度比 (I_1/I_2) の温度変化.

2B07

ベシクル融合による物質輸送を目指した膜表面電荷の制御

○栗原顕輔¹、鈴木健太郎^{1,2}、豊田太郎^{1,2}、菅原正^{1,2}

(1 東大院・総合, 2 複雑系生命システム研究センター)

【序】

ベシクルと呼ばれる、両親媒性分子が水中で形成する中空状の分子集合体は、人工細胞の構築や生命起源の解明に重要な役割を果たすであろうと期待されており、既に内部情報物質の複製や自己生産ダイナミクスを起こすベシクルが報告されている。一方で膜融合も重要なダイナミクスの一つであり、本来静電反発などの影響で融合しにくいベシクルどうしを接着・融合させる研究が盛んである。その中にはベシクル膜に溶け込むことで膜を再構成させる脂質を混合する、負の自発曲率を持つ脂質分子を混合する、接着したベシクルに界面活性剤などを添加して融合を図るなどの方法があるが、できるだけ簡便かつ自然な方法が原始生命の環境を構築する上で望ましい。そこで我々はベシクル膜の表面電荷を制御することで、ベシクルを融合させることを計画した。既に、(i)カチオン性膜分子の添加、(ii)分散液の pH による 2 種の脂質混合ベシクルの表面電荷制御 (iii)多価イオン(La^{3+} など)の添加などの手法を用いて、ベシクルの融合を光学顕微鏡・動的光散乱型粒度分布計・フローサイトメーターを用いて確認している。現在のところ PCR 緩衝液で膨潤したベシクルでは、(iii)の方法で融合に成功している。

【結果・考察】

1) アニオン性ベシクルに対するカチオン性膜分子の添加

アニオン性ベシクルにカチオン性膜分子を添加すると、ベシクル膜表面電荷にばらつきが生じ、電荷量の差がついたベシクルどうしが融合することが期待される。ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)とパルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール(POPG)を脂質組成比 DOPC : POPG = 90 : 10 からなるアニオン性ベシクルの分散液に対して、オクチルトリメチルアンモニウムブロード(OTAB)を添加すると、ベシクルの表面電荷が中和する。OTAB の濃度が 2-10 mM の範囲でベシクルが集合化することがわかった。アニオン性ベシクルに 10 mM の OTAB を添加したところ、図 1 に示すような接着を介したベシクルの集合化が起こった。この条件では、接着による集合化は見られたものの、融合は確認できなかった。

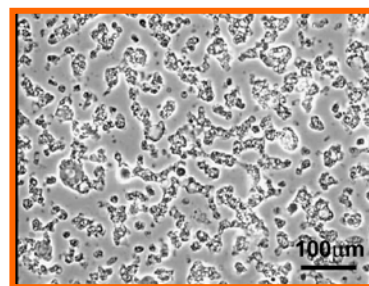


図 1. アニオン性ベシクルに OTAB を添加した時のベシクル集合化

2) 分散液の pH 調整

pH により電荷が異なるリン脂質でアニオン性と中性のベシクルを調製し、外部からプロトンを供給し表面電荷の異なる状態を作り出して接着させる。双性リン脂質のパルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)とアニオン性リン脂質の POPG とコレステロールを 80 : 10 : 10 (mol%) で混合した。アニオン性のベシクルには POPG とコレステロールを 90 : 10 (mol%) で混合した。ベシクル融合時のサイズ変化を動的光散乱法粒度分布計で調べるために、カチオン性のベシクルを孔径 1.2 μm 、アニオン性のベシクルを孔径 0.2 μm のフィルターにそれぞれ通した。両ベシクル分散液を混合し、塩酸を滴下して分散液の pH を 3 に

なるように調整した。pH = 7 (灰色の棒グラフ)とpH = 3(赤色の棒グラフ)を比較すると、粒径が 1.2 μm 付近のベシクルが現れた(図 2)。これはベシクルがヘテロに接着し、サイズが増加したことを強く示唆している。

この現象が異種のベシクル間で起こっていること、及び多数のベシクル間で起こっていることを確認するために、フローサイトメトリーによる集団計測を行った。BODIPY で蛍光標識をした中性ベシクルと消光剤を配合したアニオン性ベシクルを混合後、分散液の pH を 3 に調整すると、ベシクルの膜融合に伴う蛍光の消光を確認した(図 3)。また pH=3 のときのベシクルサイズの増大も観測された。

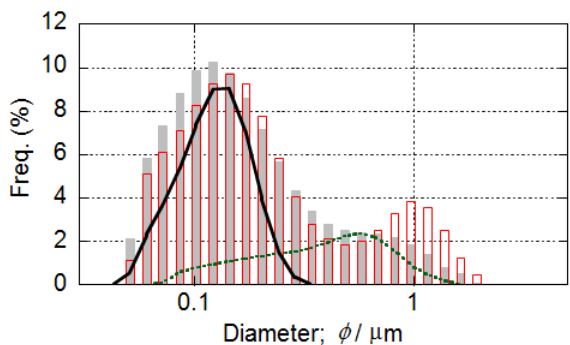


図 2. 融合に伴うベシクルのサイズ分布変化
 実線: POPG ベシクル, 破線: POPC ベシクル
 灰色のヒストグラム: pH7 の時の混合ベシクル
 赤色のヒストグラム: pH3 の時の混合ベシクル

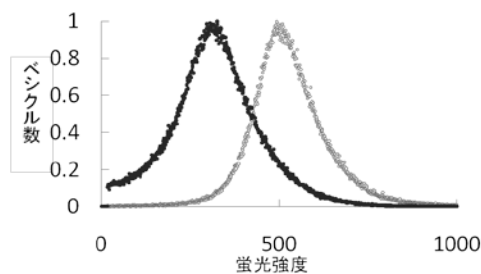


図 3. 蛍光剤配合ベシクルと消光剤配合ベシクルを混合したときのヒストグラム
 灰色: pH 7 で混合 黒色: pH 3 で混合

3) 多価イオンの添加による PCR 条件下でのベシクル融合

ベシクルの表面電荷と外水相に存在する多価イオンの静電相互作用を利用した。先行研究¹にあるように、多価イオンがベシクル間に入り込み、膜の横方向の圧縮力が増大し、外側の膜どうしの融合が起こる。我々は PCR 緩衝溶液で膨潤したベシクルでも融合した後に、肥大と分裂を起こすように、自己生産ダイナミクスに必要な膜分子を含む POPC をベースとする 1 mM ベシクル分散液を調製した。一方で POPG をベースとする 1 mM ベシクル分散液も調製した。両分散液を等量混合した後、1M 塩化ランタン水溶液を添加したところ、図 4 のようなベシクルの融合を確認した。

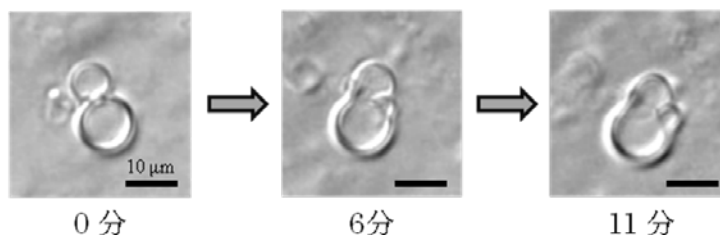


図 4. 塩化ランタン水溶液を用いた PCR 条件下における自己生産できるベシクルの融合の微分干渉顕微鏡像 (時間は塩化ランタン水溶液を添加してからの経過時間)

【まとめ・展望】

分散液の pH 変化で膜表面電荷を制御してベシクルを融合させることは、前生物的環境でも十分に起こりうることであり、仮に情報物質の基質を系に組み込むことができ、さらに熱水噴出孔を模した PCR 反応が進めば生命の起源を探る上で興味深い。

【引用文献】

1. T. Tanaka and M. Yamazaki, *Langmuir* **20**, 5160-5164 (2004).

DMPC リポソームの相転移と磁気複屈折

(学習院大理) ○仲山英之・石塚理央・玉虫雅美・石井菊次郎

【はじめに】 反磁性分子であっても分子集合体を形成すると磁場配向を示し、その結果、磁気複屈折を生じる場合がある。このような磁気複屈折は分子の磁気異方性と秩序形成の仕方に依存する。一方、脂質2分子膜は分子構造および集合状態の異なる数種類の相をもち、かつそれらの中で相転移を示す[1]。私たちは、反磁性分子の磁場配向と分子集合体の秩序形成や構造ゆらぎの関係について調べるために、DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine) およびそれにコレステロールを添加したリポソームを試料として、温度を変えて磁気複屈折を調べた。リポソームを含めベシクルの磁気変形に関する研究はすでにあるが[2,3], 相転移に関係した研究はきわめて少ない[4]。

【実験】 リポソームは、市販のDMPCを用いて逆相蒸発法で作成した。これを100 nmのフィルターでサイジングし、さらに超遠心分離後、水に分散させたものを試料とした。図1は磁気複屈折の測定に用いた光学系である。2枚の偏光子は直交ニコルの関係にあり、かつ入射光の偏光面が磁場に対して45°傾くように配置した。温度を変えるために、試料セルはヒーターとペルチェ素子を組み込んだアルミブロックの中にセットした。複屈折は、固定した2枚目の偏光子からの光強度の漏れとして測定し、磁場や温度を変えてこれを記録した。

【結果と考察】 図2に、DMPCリポソーム懸濁液とコレステロールを含んだリポソーム懸濁液について得た複屈折とDSCの測定結果を示した。前者は10 Tの磁場下、後者は無磁場下、それぞれ0.4 K/min および1

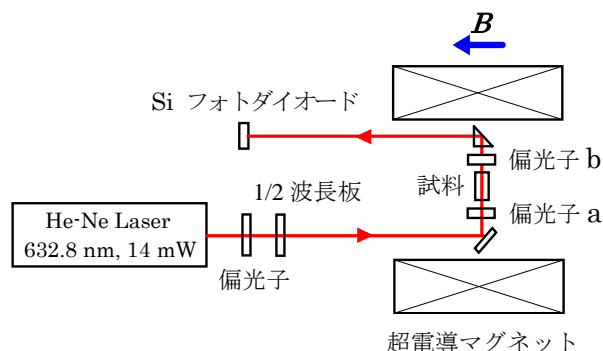


図1. 磁気複屈折測定のための光学系。

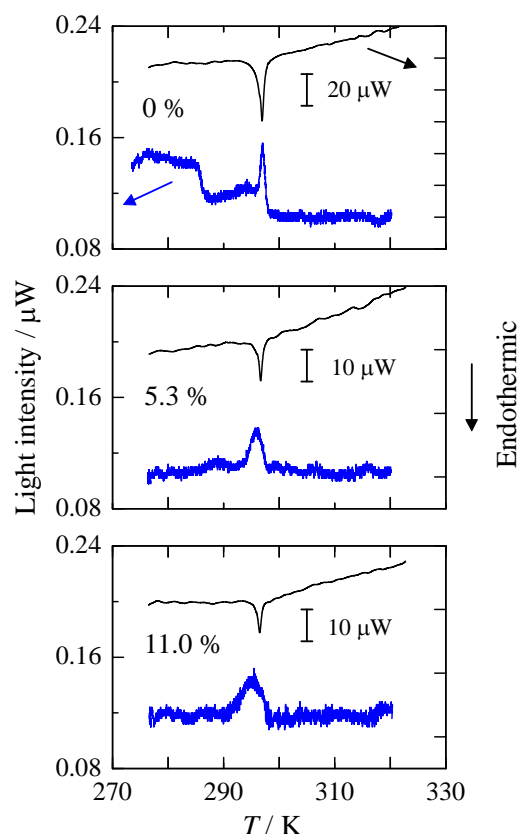


図2. コレステロール濃度の異なるDMPCリポソーム懸濁液の磁気複屈折の温度変化(下)とDSC曲線(上)。上記の複屈折は10 Tの磁場下での結果であり、偏光子から漏れた光の強度で示してある。図中の濃度は、コレステロールの濃度を示し、懸濁液中のリポソームの数密度の推定値については、講演で述べる。

K/min で連続的に昇温したときの結果である。DSC 曲線の 298 K 近傍の吸熱ピークはリップル相から液晶相への相転移 (主相転移) によるものである。また、我々の DSC の結果でははっきりしないが 285 K でゲル相からリップル相への相転移が起こることが知られている (相の特徴については後述)。これらのことをふまえて光強度の変化を見ると、コレステロールを含まないリポソーム懸濁液では、ゲル相、リップル層、液晶相の順に光強度が減少し、これに加えて主相転移点近傍で強度の極大を示す。コレステロールを 5.3 % あるいは 11.0 % 含む試料では相の違いによる光強度の違いは明瞭でなかったが、主相転移点近傍での極大は、温度幅を広げた形で明瞭に観測された。磁場を印加しない場合、上記の光強度変化は観測されなかった。したがって、観測された光強度変化は磁気複屈折に起因すると考えられる。

図 3 に、コレステロールが 0 % と 11.0 % の試料を一定温度に保持したときの光強度の磁場強度依存性を示した。コレステロールを含まない試料の場合、液晶相では磁場強度依存性が観測されず、リップル相、ゲル相および主相転移点近傍の順に磁場強度依存性が大きい。注目すべき点は、主相転移点近傍での光強度の磁場強度依存性が、他の温度と異なり、10 T まで飽和傾向を示さないことである。同様な特徴は、コレステロールを 11 % 含む試料でも見られる。

DMPC のように phosphatidylcholine 基を含む分子からなるリポソームの各相は、一般的に次のような構造的特徴を持つ[1]。ゲル相では、炭化水素が直鎖構造をとり、膜の面内方向の分子配置に秩序が存在する。リップル相では、炭化水素鎖が乱れた分子が少量存在し、膜に波打ちがある。液晶相は、炭化水素鎖が乱れた分子からなり、面内方向の秩序は乏しい。このような各相の特徴を考慮すると、液晶相が、磁気複屈折を示さないのは、元々分子の磁気異方性が小さい上に、秩序だ

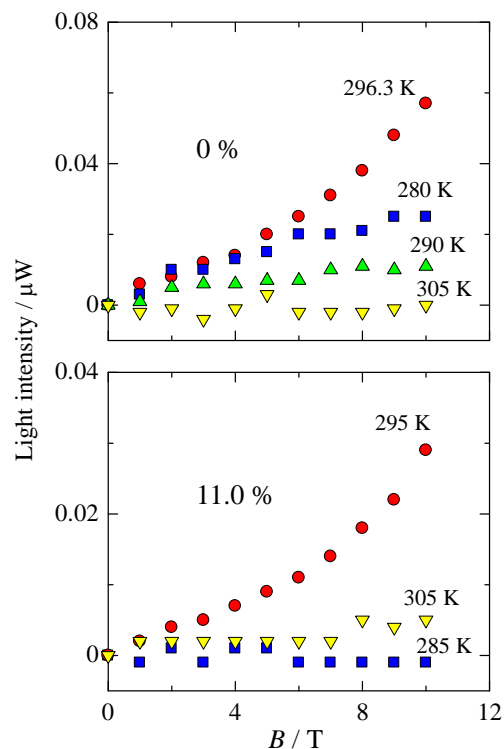


図 3. 光強度の磁場強度依存性. ただし、ゼロ磁場における光強度の漏れを差し引いた。図中の濃度は、コレステロールの濃度を示す。

った分子集合状態をとらないことに起因すると考えられる。一方、リップル相、ゲル相の順に磁気複屈折が大きいことは、この順に分子間の秩序形成の程度が増すことにより、集合体として磁気異方性を示すことによると考えられる。一方、これらの相で光強度の磁場強度依存性が飽和傾向を示すのは、リポソームの変形に対する復元力が磁場配向を妨げるためであると考えられる。これに対して、主相転移点近傍で光強度が飽和傾向を示さないことは、この領域で膜変形の復元力が小さくなっていることを示唆している。これは、構造的観点からみると、この領域で構造ゆらぎが大きくなっていることを示唆している。なお、コレステロールを含んだリポソームについての詳細は講演で述べる。

[1] R. Koynova and M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, **1376** (1998) 91.

[2] W. Helfrich, *Phys. Lett.* **43A** (1973) 409.

[3] O. V. Manyuhina et al., *Phys. Rev. Lett.* **98** (2007) 146101.

[4] T. S. Tenforde, *J. theor. Biol.* **133** (1988) 385.

2B09

固体重水素NMRによるトリ卵白リゾチーム結晶中の 水和水のダイナミクス解析

(金沢大院・自然) ○大橋 竜太郎、梶川 敬雄、水野 元博

【序】

近年、タンパク質結晶は新規機能性材料として期待されている。タンパク質結晶中には多くの水和水が存在しており、その物性に大きな影響を及ぼしている。よって、水和水の局所的な動的構造解析はタンパク質の構造と物性の関係を知る上で非常に重要である。

これまで当研究室ではトリ卵白リゾチーム結晶中の水和水の動的構造解析を行ってきており、2つの異なる運動モードを持つ水分子が存在することがわかっている。

また、 ^1H から ^2H への磁化移動を用いた測定によりタンパク質の ^1H 原子と近接した ^2H のみの信号を観測し、

タンパク質周辺の振動運動、準静止状態の水分子のNMR信号を得ることができた。

さらにこの測定により振動運動が準静止状態よりも ^1H が多い場所にあることが示唆された。本研究ではリゾチーム結晶水和水の解析をより詳細にするため、温度変化に対するタンパク質周辺の水分子の挙動を試料を冷やしながらか ^1H - ^2H 磁化移動実験を行った。

【実験】

測定試料には、トリ卵白リゾチーム結晶を重水で3回再結晶し、乾燥時間を調節して水含量を変化させた3種の試料を用いた。リゾチームは交換可能な ^1H は重水置換によってほぼ ^2H に置き換わることが知られており[1]、交換する可能性のあるタンパク質の ^1H はほとんど ^2H と交換したものと考えられる。 ^2H NMR 測定には JEOL ECA-300 を用いた。各試料に対し、磁化の励起に通常の single pulse 法と ^1H - ^2H 磁化移動を利用する VACP 法[2] を用いて ^2H NMR スペクトルを得た。 ^2H NMR 観測には四極子エコー法[3] を用い、共鳴周波数は 45.29 MHz で行った。

【結果と考察】

Fig. 2 に 149 K から 301 K まで温度を変えて測定したリゾチーム結晶の、 ^1H - ^2H 磁化移動実験のスペクトルを、Fig. 3 に磁化の励起に磁化移動を行わずに直接観測を行う single pulse 法によるスペクトルを示す。VACP 法では ^1H と近接した ^2H が見られるのに対し、single pulse 法では試料内のすべての磁化を励起して観測する。また、それぞれ図の左に水含量が 0.08 h (水 g/タンパク g) の試料 (以下、Dry) のスペクトルを、右に水含量が 0.26 h の試料 (以下、Wet) のスペクトルを示した。Fig. 2 のスペクトルはどれも中心に振動運動に特徴的な線形、外側に ^2H NMR に関わる相互作用に対してほぼ静止とみなせる状態

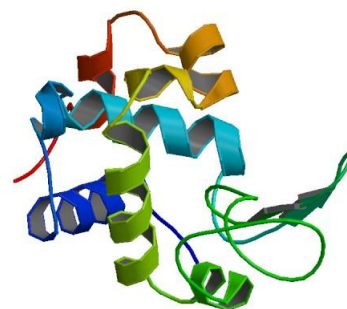


Fig. 1 トリ卵白リゾチーム
の結晶構造

(準静止状態)に特徴的な線形が見られた。振動運動と準静止状態の信号強度比は温度に対する変化が乏しく、リゾチームタンパク質周辺は 273 K でのバルクな水の凝固点の影響が小さいことが示された。また中心付近のピークに注目すると、徐々に線幅が太くなっており、振動運動が徐々に遅くなっていることが考えられる。

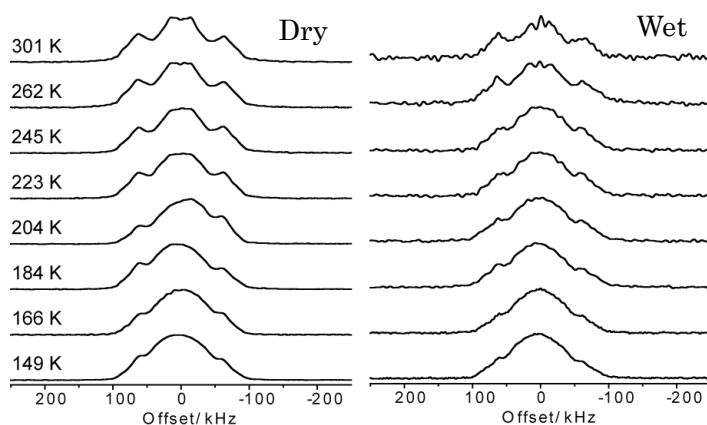


Fig. 2 温度変化に対するリゾチームの ^1H - ^2H 磁化移動実験

を用いた測定では、Wet の試料

でも Dry と同様の変化が見られたが、Dry よりも振動運動の割合が高い。これは、結晶中の水分子が Dry よりも多いため、振動運動の水分子が増えたと考えられる。

次に磁化移動によって得られたスペクトルと single pulse 法によるスペクトルとを比べると、single pulse 法の Wet と磁化移動実験とのスペクトルには大きな違いが見られた。また、対照的に Dry 試料の single pulse 測定では ± 60 kHz にみられる準静止状態の信号が

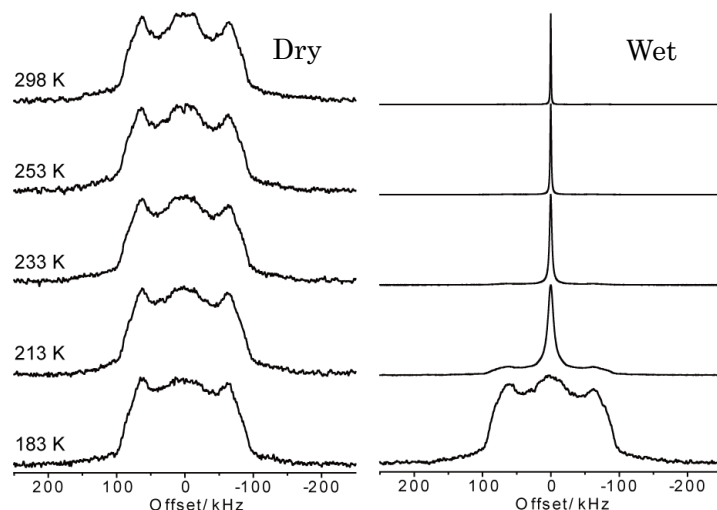


Fig. 3 温度変化に対するリゾチームの ^2H single pulse 実験

VACP 法よりも高いが、線形が温度に対して大きく変わらない、準静止状態と振動運動の比率に大きな変化がない、振動運動の線幅が温度低下とともに徐々に

増えていること、など VACP 法と共通する挙動が多く観測された。これは、Dry 試料では大部分の水分子がタンパク質と近接していることを示唆している。

以上のように、VACP 法によりリゾチーム内部の情報を選択的に取り出し、温度変化に対するタンパク質周辺の水分子の挙動を知ることができた。当日は、運動モードによるスペクトル解析を行った結果も合わせて発表したいと考えている。

- [1] O.B.Peersen, X. Wu, I. Kustanovich, S.O.Smith, J. Magn. Reson., A104, 334 (1993).
- [2] J.G.POWLES and P.MANSFIELD, Queen Mary College, London (1962).
- [3] Wasył S. Hnojewyż and Lloyd H. Reyerson, J, J. Phys. Chem. B, 65, 1694 (1961)

開口数 0.9 を有する極低温顕微分光システムの開発

(名大院・理¹、東北大院・理²) ○加藤 渉¹, 柴田 穰^{1,2}

【序論】光学顕微鏡技術と分光法を組み合わせた顕微分光法では、サンプル内部での色素分布を位置情報を維持したまま蛍光分布画像として得ることができる。顕微分光法を低温で行うことの利点として、蛍光強度が増大する、スペクトルがシャープになる、褪色が抑えられる、などが挙げられる。この利点を活かし、我々はこれまで植物細胞の極低温での蛍光イメージングを行ってきた。特に、生きた葉のような光照射により状態が変化してしまうようなサンプルは、極低温にして状態変化を止めることで、その内部を長時間にわたって詳細に観察することが可能となる。このことは、ピコ秒時間分解蛍光測定などを適用する場合にも、本質的に重要となる。これまで、室温では高い空間分解能を有した顕微分光システムで生きた葉の蛍光測定が既に行われている[1]。しかし、極低温では以下の2つの要因により室温での測定に匹敵するような高い空間分解能は実現されていない。1つ目はクライオスタットの外に対物レンズを設置する場合、サンプルとの距離が長くなり、高い開口数の対物レンズが使用できないという問題である。2つ目は、クライオスタットを使用した極低温測定を行う場合、冷媒を流すのに使用するポンプの振動により空間分解能が低下してしまうという問題である。これら2つの要因により、開口数が0.6程度の対物レンズが上限であり、空間分解能はXY方向が640 nm、Z軸方向の空間分解能は4.4 μm 程度となる。

本研究では、サンプルホルダと対物レンズの距離を小さくするために、真空対応の対物レンズをクライオスタット内部に設置する顕微鏡の開発を着想した(図1)。また、低温にする際の問題点であったポンプから生ずるサンプルの振動

を軽減させるために、サンプルホルダと冷却部分を銅メッシュで結合するなどの工夫を施した。今まで、開口数0.6の反射型の対物レンズをクライオスタット内部に設置した顕微鏡を開発したという論文が報告されているが[2]、本研究では開口数0.9の対物レンズでの実現を目指す。

【結果と考察】励起光にはパルス幅150 fsのTi:Sapphireレーザーを使い、2光子励起レーザー走査型顕微鏡にした。対物レンズを光軸方向に粗動できるように、ベローズ(蛇腹)を使った構造

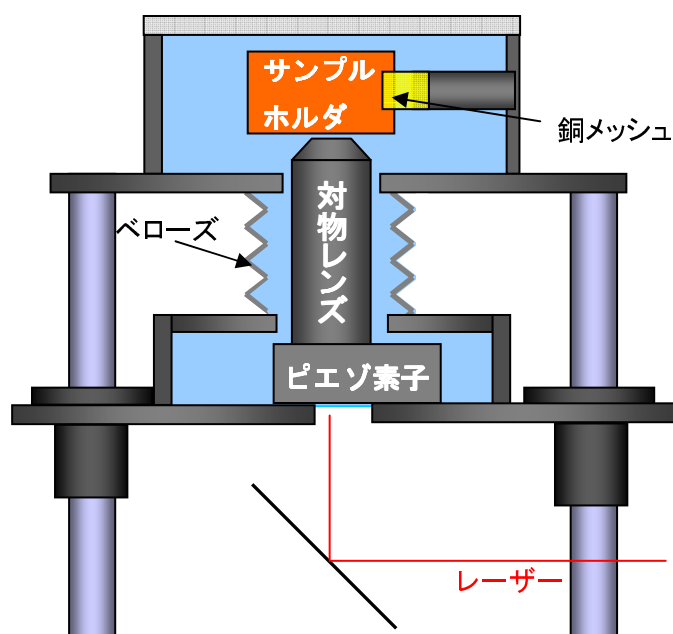


図1 真横からみた顕微鏡断面図

図中の水色は真空であることを示す

にした。この場合、サンプルルームを減圧したときに対物レンズを固定している板が上向きに引っ張られる力が数百 N に達し、逆に常圧のときは下向きにベローズのバネによる力がかかる。対物レンズを固定する板の粗動には、これらの力に耐えうる精密ボールねじを採用し、測定系が水平を保ったまま光軸方向に滑らかに動くことを可能にした。光軸方向の微動はピエゾ素子で制御しており、最小ステップ長は 1 nm である。XY 方向の粗動は、自作のテフロン製ステージを XY 方向に平行移動可能なレール上に固定し、外部から直線導入機により位置制御できるようにした。レーザー焦点のスキャンにはクライオスタット外部のガルバノミラーを使っており、本研究の光学系では最小ステップは 10 nm 程度である。本研究で用いた対物レンズは、倍率 100 倍、開口数 0.9 のミットヨの真空対応特注レンズで可視光領域の広い波長範囲で色収差も補正されている。測定時には 0.3 mm のカバーガラス越しにサンプルを観察するため、真空中に直接設置できない生体試料の観測も可能となっている。

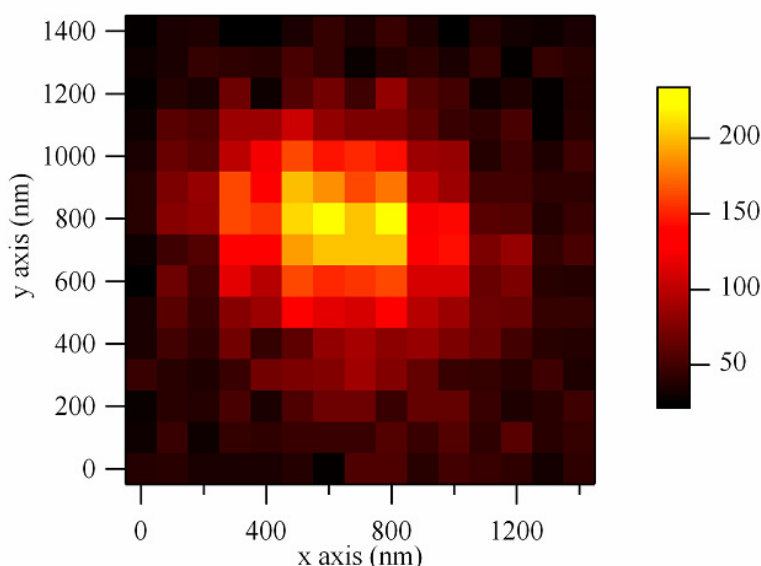


図 2 蛍光ビーズ F8811 の蛍光イメージ

実際に直径 200 nm 蛍光ビーズを測定したデータが図 2 である。測定条件は、温度 100 K、レーザー光強度 20 mW、励起波長 800 nm、検出波長 515 nm、ステップ長 100 nm である。蛍光強度分布を 2 次元のガウス関数でフィッティングしたところ、その半値幅は XY 方向で 600 nm となった。蛍光強度分布の Z 軸方向の半値幅は 1.8 μm であった。

冷媒を流すポンプの影響を考察するため、ポンプを停止できる室温での測定も行った。室温での測定でもほぼ同程度の蛍光ビーズイメージが得られた。このことから、ポンプ振動の影響は今回開発した顕微鏡ではうまく抑制できている事がわかる。現在、サンプルホルダは樹脂製の棒で放射状に四方から支えて固定しており、その棒はテフロン製のステージに設置している。温度を下げることで、このテフロンのステージがわずかに縮んでおり、サンプル位置が一方向に動くという問題がある。この問題を克服するため、線膨張係数がテフロン ($10^{-5} / \text{K}$) よりも低い石英 ($4 \times 10^{-7} / \text{K}$) を使用する予定である。講演では、生きた葉の蛍光分布画像も報告する。

【参考文献】

- [1] M. Hasegawa, T. Shiina, M. Terazima and S. Kumazaki, *Plant Cell Physiol* **51**, 225-238 (2010)
- [2] S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, and M. Matsushita, *Phys. Rev. Lett.* **100**, 168101 (2008).