

4P081

SAM修飾電極を用いたシトクロム c_3 単分子の電気伝導測定

(阪大院理¹, 兵庫県立大院生命理²)

○角田 早¹, 蔡 徳七¹, 鈴木 雅之², 樋口 芳樹², 松本 卓也¹

Conductance of cytochrome c_3 molecule probed by SAM-modified electrode

(Osaka Univ.¹, Univ. of Hyogo²)

○Saki Sumida¹, Dock-Chil Che¹, Masayuki Suzuki², Yoshiki Higuchi², Takuya Matsumoto¹

【序】電子伝達タンパク質である c 型シトクロムは、ヘム鉄の酸化還元反応($\text{Fe}^{3+} + e^- \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$)に基づいて電子輸送を行う分子であるため、電子機能有機材料として期待され、多くの研究が行われてきた。タンパク質は生体内で数個-数十個の複合体で機能しているため、電子伝達機能を調べるには、単一もしくは少数分子の電気伝導測定が必要である。単一分子レベルでの電気伝導測定を行うことで、生体分子の電子伝達に関する理解が深まり、高能率な電子機能有機材料として生体系を模倣した機能を持つ分子素子への応用が期待できる。我々は c 型シトクロムの中でも 4 ヘムタンパク質のシトクロム c_3 (Cyt c_3) に着目し、単分子での I - V 測定を行ってきた。これまでに原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて 2-ピリジンチオール(2-PyS) の自己組織化単分子膜(SAM)を接合界面とした Cyt c_3 単分子の電流電圧(I - V)測定を行い、Cyt c_3 分子は 1.0 V 程度の閾値電圧(V_{th})を持つことを報告した(図 2)。今回は N 原子の位置が異なる SAM や N 原子を持たない SAM を用いて Cyt c_3 単分子の I - V 測定を行った。

【実験】真空蒸着法を用いて、劈開したマイカ基板表面に Au(111)清浄表面を作成した。この基板をオゾン・UV 処理をした後、4,4'-ジピリジルジスルフィド、ジフェニルジスルフィドのエタノール溶液中に 20 時間浸透し、それぞれ 4-PyS, ベンゼンチオール(BT)の SAM 膜形成により Au 基板の表面修飾を行った。この基板の上に Cyt c_3 水溶液を滴下し、余分な溶液を除去・乾燥し、Cyt c_3 の吸着を行った。AFM を用いて、窒素雰囲気中で I - V 測定を行った。Tip も同様の処理で SAM を形成したものを使用した。測定における負荷力は 20 nN で行った。

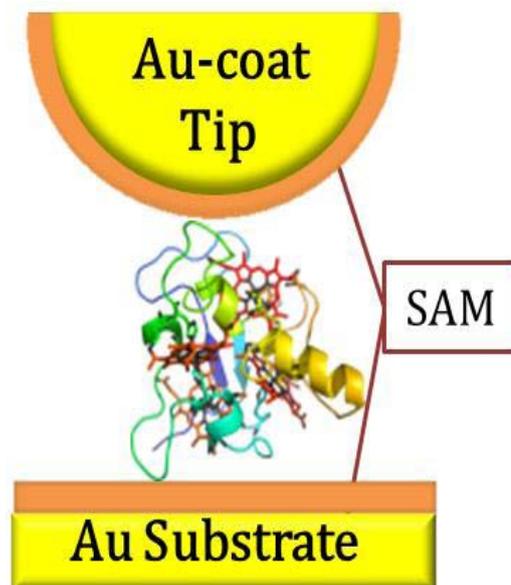


図 1 I - V 測定の概略図

【結果と考察】

図2に2-PyS SAMを用いて得たI-V曲線を示した。電流値は数倍位でばらつくが、規格化するとほとんど同じ線形を示すことをこれまでに報告してきた。2-PyS SAMを用いたI-V測定では得られたI-V曲線のうちほとんどが線形が対称なものであった。しかし、稀に線形が非対称なものも得られた。これは、Cyt α_3 の配向が異なるものが存在することによると考えられる。そこで、この非対称性が配向によるものか確認するために今回は異なるSAMを用いての測定を行った結果を以下に示す。図3に4-PyS, BT, 2-PyS SAMを用いて得たI-V曲線を示した。今回の4-PyS, BT SAMを用いた測定では対称なI-V曲線はほとんど得られず、ほとんどが非対称な線形を示した。図4に2PyS SAMを用いて測定した際に得た非対称なI-V曲線と今回得た4-PyS, BT SAMを用いたI-V曲線を規格化したものを示した。4-PyS SAMを用いて得たI-V曲線の場合は電圧の正負を反転した。図4より、異なる3つのSAMを用いて得られた非対称な線形を示すI-V曲線の線形はほとんど一致するとわかる。これにより、SAMの違いによって本質的なI-V曲線に変化はないが、対称,非対称なI-V曲線を得られる確率が異なるので、SAMによって、有意な配向が選択される可能性があると考えられる。

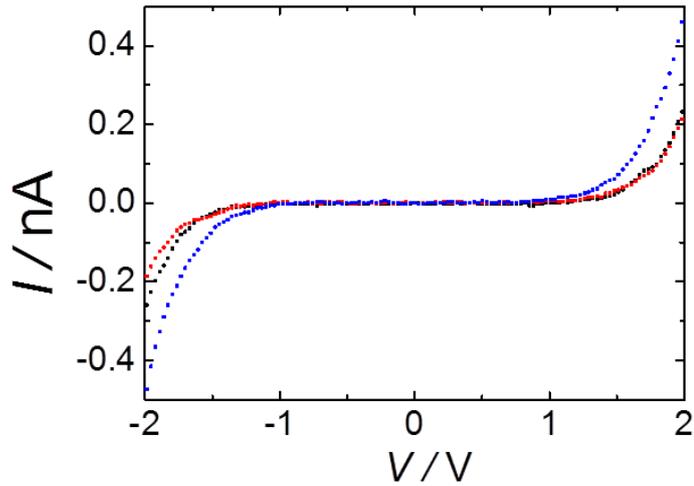


図2 2-PyS SAMを用いたI-V曲線

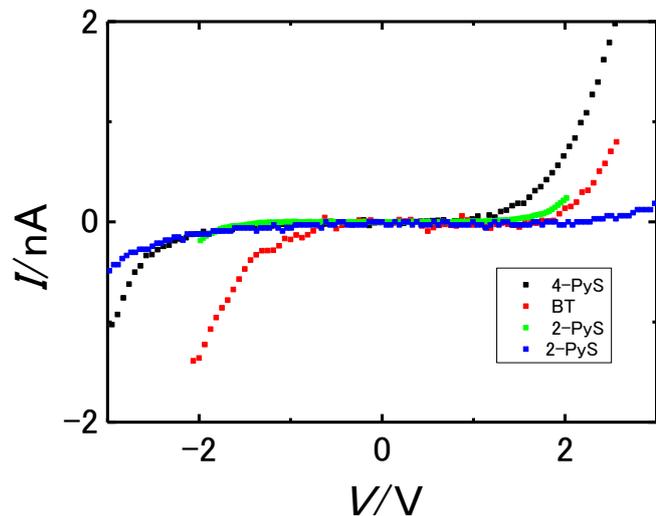


図3 さまざまなSAMを用いたI-V曲線

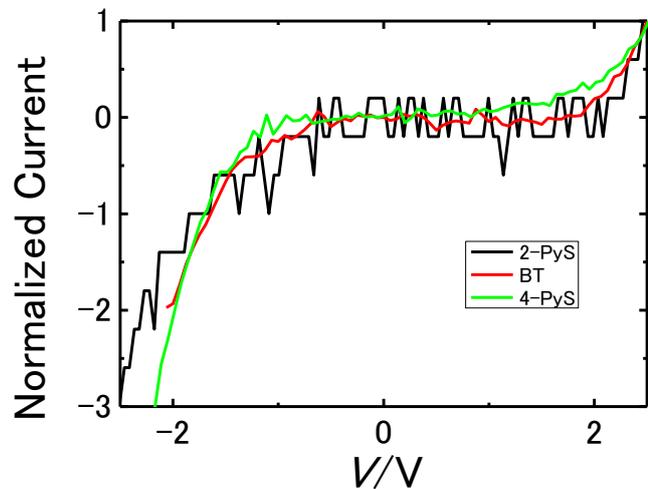


図4 規格化したI-V曲線

4P082

シリカ基板上色素単分子膜—水溶液界面の振動電子二重共鳴和周波発生
(筑波大院・数理物質)○立野 雄也, 奥野 将成, 石橋 孝章

Vibrationally-electronically doubly resonant sum frequency generation study of
dye monolayers silanized on silica substrate - water interface

(Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba)

○Yuya Tachino, Masanari Okuno, Taka-aki Ishibashi

【序】振動和周波発生(VSFG)分光法は二次の非線形光学過程に基づく手法であり, 系の反転対称性が破れる界面の振動スペクトルを選択的に得ることができる. そのため, VSFG分光法は界面分子の研究に適している. 水溶液界面では水溶液の pH や組成によって界面分子の電子状態や配向が変化する. 我々はこれまでフルオレセイン色素単分子膜の水溶液界面における VSFG スペクトル測定を行い, VSFG スペクトルの pH 依存性からフルオレセイン色素の電子状態や配向の変化について議論した^[1]. 本研究では, フルオレセイン色素や

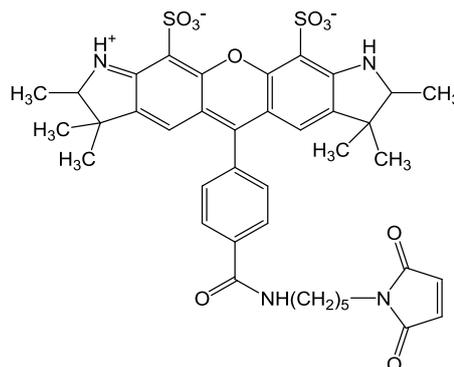


図 2. AF532 の構造式

Alexa Fluor 532(図 2, 以下 AF532)などの色素分子をシリカ基板上に導入し, 水溶液界面で VSFG スペクトルの測定を行うことで, 水溶液の変化による色素分子の電子状態や配向に対する影響について議論する.

【実験】色素単分子膜はシランカップリング剤を用いてシリカ基板上にチオール基を導入し, そのチオール基と色素分子のマレイミド基を反応させることで作製した. 図 3 に AF532 単分子膜の水溶液界面での紫外可視吸収スペクトルを示す. ことなる pH 溶液中でも紫外可視吸収スペクトルの形状と強度がほぼ等しいことから, AF532 の電子状態が pH 依存性を持たないと考えられる. よって, AF532 の電子状態と水溶液の pH を切り離して考えることができる. 緩衝液は一般的な緩衝液(pH 10.0 炭酸塩緩衝液, pH 6.9 リン酸塩緩衝液, pH 6.0 超純水, pH 4.0 フタル酸塩緩衝液, pH 1.7 シュウ酸塩緩衝液)に加え, pH 10.0~4.0 の広域緩衝液^[2]を用いた. 広域緩衝液は同じ成分で広い pH 領域で緩衝能を持っている. 異なる緩衝液を使用することで, 緩衝液の pH だけでなく, 緩衝液に含まれる化学種の違いが色素分子の電子状態や配向に影響を与えていないかについても検討した.

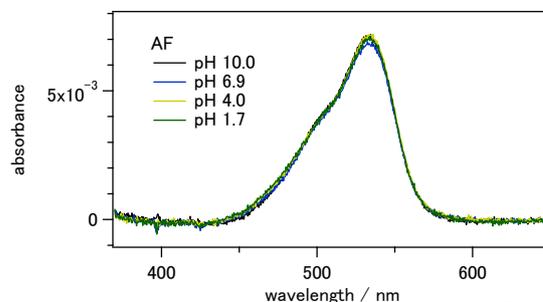


図 3. AF 532 単分子膜の紫外可視吸収スペクトル(一般的な緩衝液を使用)

緩衝液(pH 10.0 炭酸塩緩衝液, pH 6.9 リン酸塩緩衝液, pH 6.0 超純水, pH 4.0 フタル酸塩緩衝液, pH 1.7 シュウ酸塩緩衝液)に加え, pH 10.0~4.0 の広域緩衝液^[2]を用いた. 広域緩衝液は同じ成分で広い pH 領域で緩衝能を持っている. 異なる緩衝液を使用することで, 緩衝液の pH だけでなく, 緩衝液に含まれる化学種の違いが色素分子の電子状態や配向に影響を与えていないかについても検討した. VSFG スペクトルの測定には広帯域赤外光を用いるマルチプレックス方式の分光装置を用いた^[3]. 測定した SFG 強度は z-cut 水晶の SFG 強度で規格化した. SFG 過程における可視光の波長を変えて測定をすることで, 分子振動に加えて電子状態に関する情報も取得した.

【結果と考察】図 4 と図 5 に, 可視光プローブ 582 nm を使用した AF532 単分子膜の水溶液界面での VSFG スペクトルを示す. 紫外可視吸収スペクトルと同様にスペクトルの形状はほぼ変化がなかった. 一方, SFG 光の強度は各 pH で少し変化している. どちらの緩衝液でも pH 4.0 で強度が大きく, pH 6.9

で強度が小さいため、pH の変化に伴い色素単分子膜の配向が変化している可能性がある。

次に VSGF スペクトルを与える化学種が紫外可視吸収スペクトルを与えた化学種と一致しているのかを確認するため、超純水界面(pH 6.0)で 9 種類の波長(487~656 nm)の VSGF スペクトルを取得した。図 6 にそのスペクトルを示す。これらのスペクトルを複素ローレンツ関数でフィッティングし、バンドの振幅を SFG 波長に対してプロットすることで、SFG 電子励起スペクトルを得た。図 7 に 1658 cm^{-1} のピークについて、測定で得られた SFG 電子励起スペクトルと共鳴ラマンの理論⁴を利用して紫外可視吸収スペクトルから計算した SFG 電子励起スペクトルを示す。この二つのスペクトルが似た形状になることから、VSGF スペクトルと紫外可視吸収スペクトルは同じ化学種に由来すると考えている。

本発表では、AF532 の結果に加えフルオレセイン色素単分子膜の水溶液の pH の変化に対する VSGF スペクトル、測定された SFG 電子励起スペクトル、計算された SFG 電子励起スペクトルの変化についても議論する。

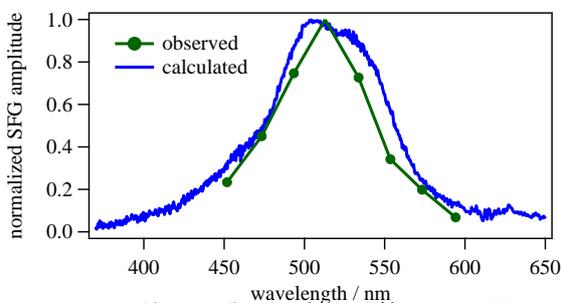


図 7. AF532 単分子膜の測定と計算により得られた SFG 電子励起スペクトル

【参考文献】

- [1]小西翔太, 他, 第 5 回分子科学討論会 札幌, 1D08 (2011).
- [2] H. T. S. Britton, *Hydrogen Ions*, 4th ed., Chapman and Hall, London, pp. 113 (1952).
- [3] T. Maeda, T. Ishibashi, *Appl. Spectrosc*, **61**, 459 (2007).
- [4] D. L. Tonks, J. B. Page, *Chem. Phys. Letters.*, **66**, 449 (1979).

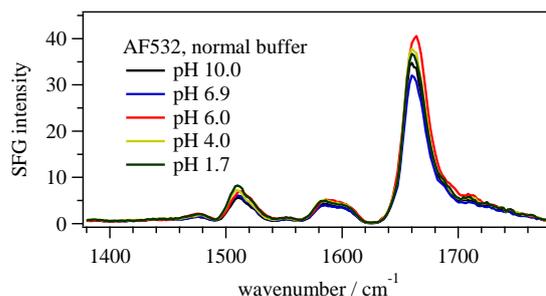


図 4. AF532 単分子膜の VSGF スペクトル 一般的な緩衝液, 可視プローブ 582 nm

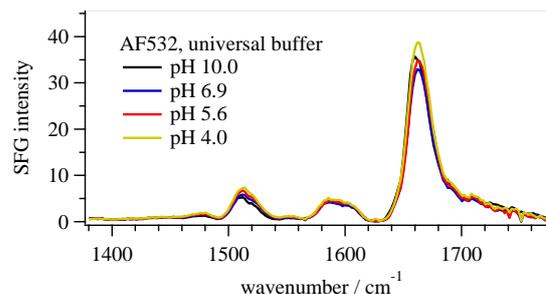


図 5. AF532 単分子膜の VSGF スペクトル 広域緩衝液, 可視プローブ 582 nm

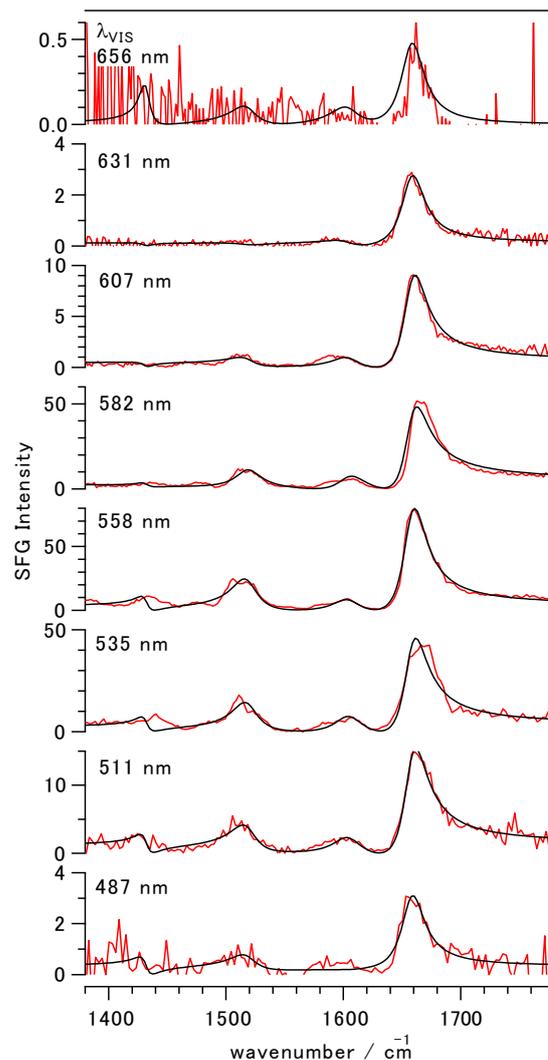


図 6. 超純水 AF532 単分子膜界面から得られた VSGF スペクトル

ジピリナート類を配位子に有する長寿命イリジウム錯体を用いた細胞内酸素濃度計測

(群馬大院理工¹, 群馬大院工²) ○藤倉 大地¹・
小野寺 研一¹・増田 剛²・吉原 利忠¹・飛田 成史¹

Intracellular oxygen measurements based on long-lifetime phosphorescence
of iridium complexes with dipyrrinato ligands

(Graduate School of Science and Technology¹, Gunma Univ.,
Graduate School of Engineering², Gunma Univ.)

○Daichi Fujikura, Kenichi Onodera, Tsuyoshi Masuda,
Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita

【序】酸素は電子伝達系の最終段階での電子受容体として、生命維持に必要不可欠な物質である。また、がん組織は正常組織と比較して低酸素状態にあることが報告されており、酸素濃度測定法の開発が望まれている。本研究室では、酸素によって消光する Ir 錯体のりん光を利用して、細胞内の酸素濃度を定量する技術の開発を行っている。酸素濃度を定量する技術を確認するには、細胞の密度、酸素の拡散速度の影響について考慮する必要がある。そこで本研究では、細胞の密度や培養液の容積を変えてりん光寿命を測定し、細胞の酸素消費速度の効果について明らかにした。また、その結果に基づき、酸素濃度を定量するための calibration 法について検討した。

【実験】細胞のりん光寿命測定に基づく細胞内酸素濃度計測法として、Nd³⁺:YAG レーザーの第二高調波 (532 nm、20 kHz)、またはレーザーダイオード (488 nm、18 kHz) を励起光とし、時間相関単一光子計数法 (TCSPC) に基づく蛍光寿命計および蛍光顕微鏡を装置として用いた (Fig. 1)。incubator 内の温度、酸素分圧は自由に変えることができ、測定時の incubator 内の温度は、37°Cとした。

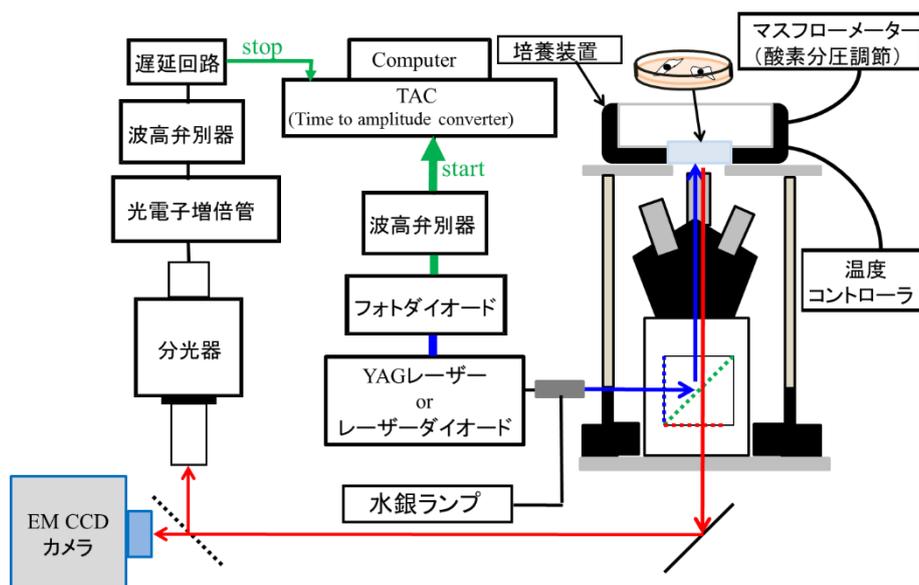


Fig. 1 培養細胞のりん光寿命測定システム

【結果・考察】本研究ではプローブとして、YAG レーザーの 532 nm の光を効率的に吸収する BTQSA(錯体 1)、近赤外発光を示し、りん光寿命が長く、酸素応答性が大きいという特徴を有し、488 nm のレーザーダイオードの光を効率的に吸収する PPZ4DMMD(錯体 2)および PPZ3DMMD(錯体 3)を用いた。Fig. 2 にそれらの構造式を示す。21 % O₂ 条件下において、細胞の密度や培養液の容積を変えてりん光寿命を測定し、細胞の酸素消費速度の効果について明らかにするために錯体 1 を、また、細胞のりん光寿命を測定し、細胞内酸素濃度を定量するために錯体 2 および錯体 3 を用いた。

錯体 1 について、細胞の密度を変えてりん光寿命を測定したところ、細胞の密度が高いほどりん光寿命が長くなり、細胞呼吸の効果が見られた。細胞のりん光寿命は、単一指数関数的な減衰ではなく二成分減衰を示し、細胞の培養条件を 21 % O₂ 条件下、2.5 % O₂ 条件下と変化させるとりん光寿命が変化することが明らかになった。Fig. 3 に MCF-7 細胞中における錯体 2 および錯体 3 のりん光減衰を示す。細胞内酸素濃度を Stern-Volmer の式を用いて算出するためには、りん光の消光速度定数 (k_q 値) をあらかじめ決定する必要がある。細胞内局在の評価により、大部分の Ir 錯体は細胞内のオルガネラ膜に局在すると考えられる。そこで、オルガネラ膜のモデル膜である DMPC 膜中での錯体 2 および錯体 3 の k_q 値を in vitro で決定した。細胞中での錯体 2 および錯体 3 のりん光寿命、DMPC 膜中で求めた k_q 値を用いて細胞内酸素濃度を算出した結果、21 % O₂ 条件下における MCF-7 細胞内の酸素濃度は、500~600 μ M となった。

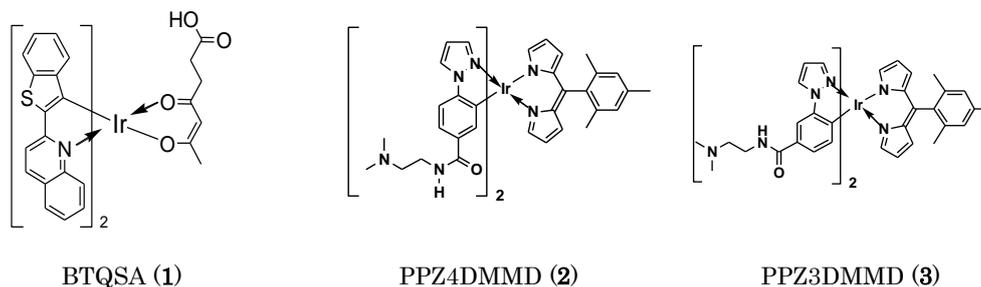


Fig. 2 各 Ir 錯体の構造式

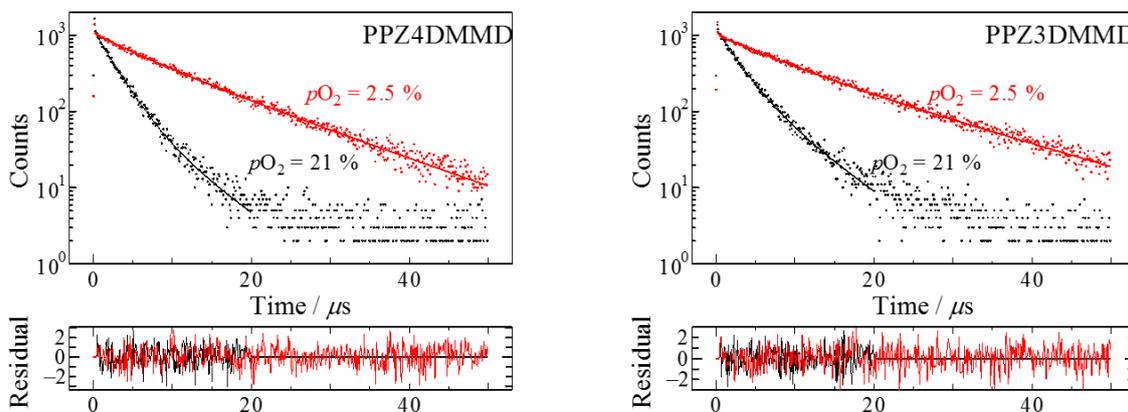


Fig. 3 MCF-7 細胞中におけるりん光減衰

4P084

レプリカ交換アンブレラサンプリングシミュレーションで調べるアミロイド前駆体 C99 のコレステロール分子との相互作用による構造変化の誘起

(名古屋大学*, ボストン大学**) ○浦野諒*, John E. Straub**, 岡本祐幸*

Inducing structural changes by interactions of Amyloid-Precursor-Protein-C99 (C99) with cholesterol studied by replica-exchange umbrella sampling (REUS) simulations

(Nagoya Univ. *, Boston Univ. **) ○Ryo URANO*, John E. Straub**, Yuko

OKAMOTO*

【Introduction】

The amyloid beta (A β) peptide associated with Alzheimer's Disease (AD) is produced by stepwise processing of Amyloid-Precursor-Protein (APP) (see Fig. 1). Given the importance to AD research, this step in this process has been intensely studied[1-3]. Of particular interest is the cleavage of C99 peptide by γ -secretase to

produce A β , which may result in enhanced production of a more amyloidogenic form of A β and the early onset of AD. Understanding the role of membrane conditions (including cholesterol) and C99 sequence (including familial mutations) in the cleavage of C99 and production of A β is a critical goal for AD research. It is known that increased levels of cholesterol lead to enhanced production of more amyloidogenic lengths of A β . Moreover, it has been shown that C99 binds cholesterol leading to structural changes in the transmembrane region of the peptide which is recognized by γ -secretase (see Fig. 2)[4-7].

A goal of our research is to understand how C99-cholesterol interactions affect the recognition and cleavage of C99 by γ -secretase and to explore the design of cholesterol analogs that may serve as AD therapeutics by modulating the production of A β .

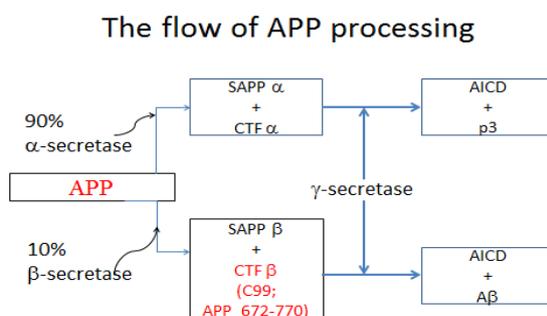


Fig. 1: The process of APP cleavage by enzymes into amyloid beta (A β).

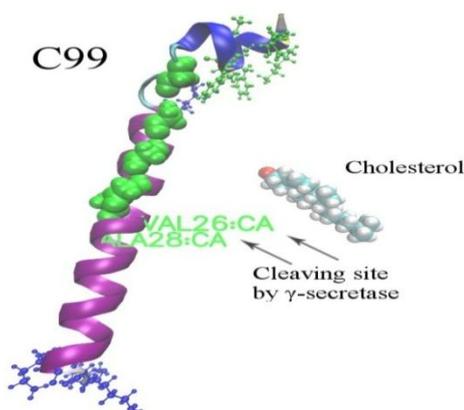


Fig. 2: The initial states of complex molecule and the cleaving site of C99 structure.

【Method】

This research investigated structures of the C99-cholesterol complex, including the structural change of C99 (15-55 fragment, APP 686-726) monomer by interactions with one cholesterol molecule using all-atom replica-exchange umbrella sampling (REUS) simulations. The umbrella potential imposes a systematic sampling of conformations between C99 and cholesterol as a function of their relative separation. The heterogeneous dielectric generalized Born (HDGB) model is used as the treatment of the membrane environment, which models the membrane through a continuously varying dielectric constant and surface area based “cavity” contribution. [8]

【Results and discussions】

To validate our model, we compared the spatial distribution of cholesterol across the membrane normal axis for a single cholesterol molecule, comparing our results with those of all-atom simulations of cholesterol in a POPC lipid bilayer. We further explored the interaction of cholesterol with C99 molecules to determine the nature of interaction and binding as well as the impact on the structure of C99.

Results of REUS simulations were compared with those of NMR experiments by the Sanders laboratory, with a particular emphasis on the specific interactions between cholesterol and the GXXGXXG motif in the transmembrane region of C99 molecule. REUS calculations allow for an evaluation of contact information as a function of the separation of C99 and cholesterol as well as the strength of binding (that can be compared with experimental binding constants). In the simulation model significant interaction of cholesterol with the GXXGXXG motif of the transmembrane region of C99 was observed, in agreement with experimental results. Further insight into the nature of the C99-cholesterol interactions was also derived, and should serve in the development of structure-activity correlations characterizing the nature of C99-cholesterol interactions. Future work involving the evaluation of C99 interactions with cholesterol analogs, in the context of developing therapeutics for the treatment of AD, is discussed.

References

- [1] N. Miyashita, J. E. Straub, and D. Thirumalai, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 49, 17843–17852, 2009.
- [2] N. Miyashita, J. E. Straub, D. Thirumalai, and Y. Sugita, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 10, 3438–3439, 2009.
- [3] L. Dominguez, S. C. Meredith, J. E. Straub, and D. Thirumalai, *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 3, 854–857, 2014.
- [4] Y. Song, A. K. Kenworthy, and C. R. Sanders, *Protein Science*, 23, 1, 1–22, 2014.
- [5] A. J. Beel, P. Barrett, P. D. Schnier, S. A. Hitchcock, D. Bagal, C. R. Sanders, and J. B. Jordan, *Biochemistry*, 48, 50, 11837–11839, 2009.
- [6] P. J. Barrett, Y. Song, W. D. V. Horn, E. J. Hustedt, J. M. Schafer, A. Hadziselimovic, A. J. Beel, and C. R. Sanders, *Science*, 336, 6085, 1168–1171, 2012.
- [7] F. R. Maxfield and I. Tabas, *Nature*, 438, 7068, 612–62, 2005
- [8] S. Tanizaki and M. Feig, *J. Phys. Chem. B*, 110, 1, 548–556, 2005

生体分子の 1 分子 FRET 計測：分子構造の分布とダイナミクス

(理研¹, 理研・生命システム研究センター²) ○岡本 憲二¹, 日比野 佳代², 佐甲 靖志¹

Single-molecule FRET measurement for biomolecules: distribution and dynamics of the molecular structure

(RIKEN¹, RIKEN QBiC²) ○Kenji Okamoto¹, Kayo Hibino², Yasushi Sako¹

1 分子 FRET (smFRET) 計測は、生体分子の構造に関する情報を得るために有効な手法の 1 つである。特に、非同期的に進行するダイナミクスを個別分子で観察でき、実時間のダイナミクスを計測でき、生細胞中の分子も計測が可能、等の点において優位性がある。その反面、信号の弱さに起因して S/N 比が低く時系列データの解釈が困難であったり、生細胞中での観察においては計測対象が表面（細胞膜）上の分子に限られる等、特有の制限もある。そこで、これらの制限を超えるためにわれわれが取り組んできた試みについて紹介する。

時系列データからの状態遷移ダイナミクス解析

smFRET 計測では、信号が微弱なため S/N 比が低く揺らぎが大きい (図 1 (a) 赤線) が、1 分子信号の特徴として、ステップ的な変化を示す場合が多い。これは通常、有限個の状態の間を遷移するダイナミクス (図 1 (a) 青線) であると解釈される。そこで、隠れマルコフモデル (hidden Markov model: HMM) を用いた解析をおこなう。HMM では、時系列データの各点 (x_n) がいずれかの分子状態に対応 (z_n が状態を表す) すると仮定 (図 1 (b)) する。状態遷移については、直前のデータ点の状態 (z_{n-1}) のみによって決まり、一定確率 (状態遷移確率行列 A で与えられる) で遷移が起きる単純マルコフ過程を仮定する。 z_n と x_n とはパラメータ (各状態の蛍光強度や FRET 効率; まとめて ϕ で表す) を使った確率関数で関連付けられる。このモデルについて変分ベイズ (variational

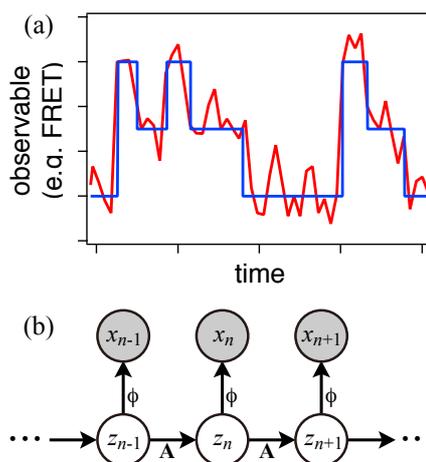


図 1: (a) 1 分子実験データと解析の模式図。(b) HMM のグラフィカル・モデル。

Bayes: VB) 法により状態分布とパラメータの最適解を得る。われわれは、フォトン 1 個 1 個の検出時刻をすべて記録するタイムスタンプ smFRET データに対して、実験データのみから最尤な状態数と状態遷移軌跡を推定する VB-HMM 解析法を開発した[1]。

DNA は 2 重らせんの直鎖構造をとるのが一般的だが、4 本の DNA が十字構造を形成する場合があります、ホリデージャンクション (Holliday junction: HJ) と呼ばれる (図 2 (a))。HJ は減数分裂における相同組み替え過程などに関与する。十字の 4 本の腕はそれぞれ 2 重らせんで構成され、交差点近傍での塩基の組み替えによって交差点移動 (branch migration: BM)

現象が起きるが、これは腕の伸縮運動と考えることもできる。そこで、HJ の相対する腕に FRET ラベルを施し、溶液中の自発的な BM ダイナミクスについてタイムスタンプ smFRET 計測をおこなった。

実験データの例を図 2 (b) に示す。蛍光信号 (赤・緑) から総蛍光強度 (黄) と FRET (水色) を計算により求めた。VB-HMM 解析によって時系列データから状態数を推定し、この場合 3 状態の間の状態遷移軌跡を復元することに成功した (青)。

生細胞内部分子の smFRET 計測

smFRET 計測は生細胞での計測にも応用されているが、細胞膜上の分子が観察対象とされる場合が多い。その主な理由としては、細胞では分子を固定できないため主にカメラを用いたイメージング計測がおこなわれるが、その場合、1) 全反射照明系を用いるためガラス基板近傍の分子しか検出できない、2) 細胞質中の分子は拡散係数が大きくカメラの時間分解能では捉えられない、といった点がある。しかし、細胞深部にも興味深い分子や現象はあり、smFRET 計測を実現することで新たな知見が得られる期待も大きい。

そこで、溶液系の実験でおこなわれることの多い、バースト smFRET 計測を生細胞に応用することを考えた。溶液中を自由拡散する分子は、顕微鏡焦点を 1-2 ミリ秒程度で通り過ぎ、その間だけ蛍光を発する (図 3 (a))。そのため時系列ではスパイク状のバースト蛍光信号が得られる。各バーストは 1 分子に対応するので、バースト毎に蛍光強度比を求めて FRET 分布を得ることで、溶液中での分子構造分布に関する情報を得ることができる。

HeLa 細胞中の Raf 分子を対象としてバースト smFRET 計測した実験データの例を図 3 (b) に示す。細胞中のためバックグラウンドノイズの影響が大きいが、バースト信号が断続的に検出されている様子が見て取れる。FRET 分布を再構成した例を図 3 (c) に示す。時系列データの S/N 比が低いこともありピークが広がっているが、少なくとも 2 つの構造が存在すると思われる。Raf には開構造と閉構造の少なくとも 2 つの構造状態があると考えられており [2]、それらに対応した分布が検出できていると考えられる。

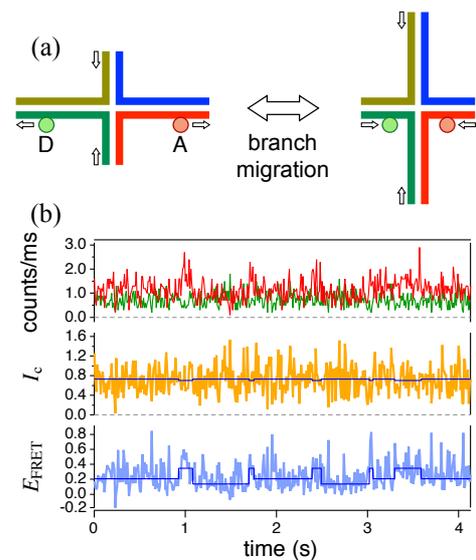


図 2: (a)HJ の BM の模式図。D/A はドナー/アクセプタ。(b)HJ-BM の smFRET 実験結果の例。中・下段の青実線は VB-HMM 解析結果。

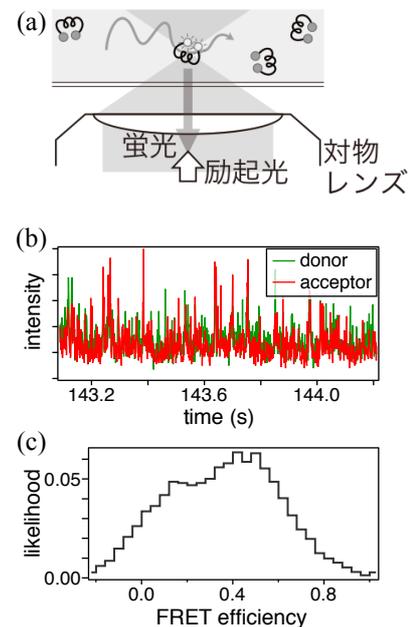


図 3: (a)バースト smFRET 計測の模式図。(b)Raf 分子の細胞内バースト smFRET 実験データの例と(c)得られた FRET 分布。

[1] K. Okamoto and Y. Sako: *Biophys. J.* **103**, 1315–1324 (2012).

[2] K. Hibino, T. Shibata, T. Yanagida, and Y. Sako: *Biophys. J.* **97**, 1277–1287 (2009).

熱力学量測定によるハイブリッドリポソームの揺らぎ検出

(京大院理¹、崇城大生物生命²) 中曽根祐介¹、古水雄志²、松本陽子²、松下琢²、
上岡龍一²、寺嶋正秀¹

Thermodynamic measurement of the fluctuation of Hybrid Liposome

(Kyoto Univ.¹, Sojo Univ.²) Yusuke Nakasone¹, Yuji Komizu², Yoko Matsumoto², Taku
Matsumoto², Ryuichi Ueoka², Masahide Terazima¹

【序】ハイブリッドリポソーム (Hybrid liposome(HL)) はリン脂質などのベシクル分子とミセル界面活性剤をバッファー中で混合し超音波照射することで容易に得られる。そのサイズや物性は素材や組成比によってコントロールでき、発見当初はドラッグデリバリーシステムへの応用が期待されていた。その後、HL 自身に癌細胞の死滅をもたらす効果が発見され、副作用のない抗がん剤として現在多くの注目を集めている。たとえばリン脂質 DMPC と PEG 系界面活性剤を用いて作製した HL が *in vitro* および *in vivo* で癌細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかにされている。アポトーシスを引き起こすメカニズムの全貌は明らかになっていないが、まず HL が癌細胞膜に融合し蓄積することがデスレセプターの活性化をもたらしてアポトーシスを誘導すると考えられている。この効果は正常細胞では観測されないため、HL は癌細胞を何らかの方法で見分けている点が非常に興味深い。一般に癌細胞は膜の流動性が正常細胞に比べて高い。また蛍光偏光解消を用いた先行研究によると HL の組成を変えてその揺らぎを大きくするほど膜融合効率が高くなることが示されている。したがって、HL は揺らぎを利用して癌細胞膜に融合するという機構が提唱される。こうした細胞膜の揺らぎをターゲットとした創薬は過去に例のないものであり、その分子機構解明が求められている。本研究では HL 特有の揺らぎや物性を熱力学的観点から捉えることを目指した。

【実験】 熱力学量は様々な揺らぎを反映する有用な物理量である。右に示すように圧縮率は体積

揺らぎと関係づけられ、熱容量はエントロピーの揺らぎを表す。また熱膨張係数は体積揺らぎとエントロピー揺らぎの掛け合わせで表され、構造揺らぎの指標となる物理量である。したがってこれら熱力学量を HL について測定することで、揺らぎの実測が可能となる。本研究では熱容量測定には示差走査型熱量計(DSC)を、熱膨張係数測定には圧力摂動熱量計(PPC)を用いた。これら測定により相転移温度や転移に伴うエンタルピー変化や体積変化、疎水基・親水基の表面への露出度に関する情報も同時に得られる。並行して X 線小角散乱(SAXS)測定を行い、リポソームのサイズや形状の評価も行った。試料として癌細胞のアポトーシスを引き起こす DMPC-HL と細胞死に関与しない DPPC-HL を用いた (図 1)。同様の測定を単一成分リポソームについてもを行い、HL 特有の性質を検討した。

$$\begin{aligned} \langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle &= k_B T V \beta_T & \beta_T: \text{等温圧縮率} \\ \langle (S - \langle S \rangle)^2 \rangle &= k_B C_P & C_P: \text{定圧熱容量} \\ \langle (SV - \langle S \rangle \langle V \rangle) \rangle &= k_B T V \alpha_{th} & \alpha_{th}: \text{熱膨張係数} \end{aligned}$$

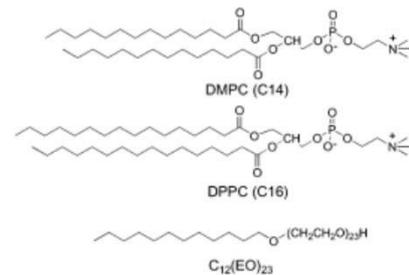


図1: 用いたベシクル分子とミセル界面活性剤

【結果】各 HL および単一成分リポソームを DSC 測定した結果を図 2 に示す。全ての試料でゲル相から液晶相へ相転移を起こす様子が熱容量の増大ピークとして観測された。相転移温度が組成によって大きく異なり、癌細胞のアポトーシス観測が行われた 37 度では、DMPC 系は液晶相である一方、DPPC 系はゲル相で存在する。DMPC は単一成分系でもわずかにアポトーシス誘導を引き起こすことが報告されているため、液晶相であることが膜融合に重要だと考えられる。

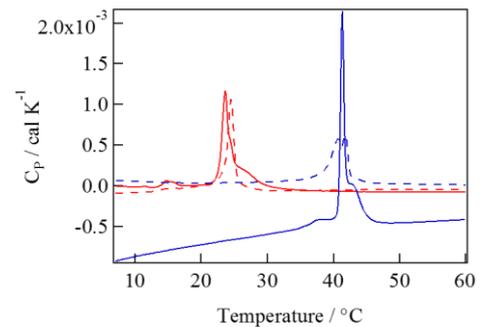


図2: 熱容量の温度依存性 (DMPC: 赤点線, DMPC-HL: 赤実線, DPPC: 青点線, DPPC-HL: 青実線)

一方、単一成分系とハイブリッド系の間では相転移温度の差は小さかった。しかしアポトーシス効果を有する DMPC 系を見ると、単一成分系の方がシャープな転移曲線が観測されており (赤点線)、転移の協奏性が高いことがわかった。また転移に伴うエンタルピー変化は HL の方が単一成分系より大きいことも見出した (DMPC : 6.1, DMPC-HL : 8.3, DPPC : 5.0, DPPC-HL : 12.8 単位 : kcal/mol)。これらは HL が単一成分リポソームに比べて不均一性が高いこと、また構造が緩んでいるためにアシル鎖の trans-gauche 転移が促進されたことを示している。また熱容量は表面における疎水性の露出度を表すパラメータであり、露出が増すほど大きくなる。したがって小さい熱容量を持つ DPPC-HL は表面に親水基が並んでいる一方、DMPC-HL は少し崩れた表面構造を持ち疎水基が露出していると考えられる。こうした表面構造の乱雑さやそれに伴う溶媒分子の揺らぎが膜融合に重要なかもしれない。

次に PPC 測定を行った結果を図 3 に示す。DSC 測定と同様の相転移が観測され、相転移に伴う体積変化量 ($\Delta V/V$) は DMPC : 2.9 %、DMPC-HL : 3.9 %、DPPC : 1.6 %、DPPC-HL : 5.0 % と見積もられた。単一成分系に比べ HL の方が大きい体積変化を示したことから、相転移する際の構造の緩みがより顕著だと考えられる。熱膨張係数の大きさは構造揺らぎの大きさと相関があるが、本測定ではアポトーシスを誘導しない DPPC-HL が最も大きいという結果になった。また DMPC-HL と DMPC 単一成分系ではほとんど揺らぎの大きさに差が観測されず、揺らぎを利用した膜融合システムの実証には至っていない。しかし表面構造や構造の柔らかさに違いが観測されたので、こうした観点から膜融合システムを議論したい。

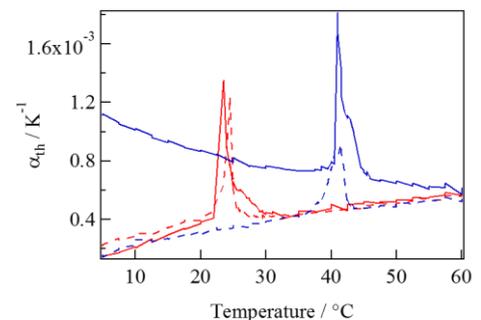


図3: 熱膨張係数の温度依存性 (DMPC: 赤点線, DMPC-HL: 赤実線, DPPC: 青点線, DPPC-HL: 青実線)

最後に SAXS を用いて相転移に伴う DMPC-HL の形状やサイズの変化を調べたところ、液晶相になることで形状の変化は観測されなかったが、慣性半径や D_{max} の増加 (3%程度) が観測された。

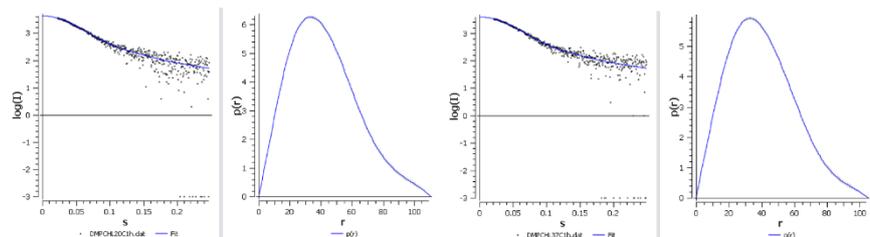


図4: 20度(左)および37度(右)でのDMPC-HLのSAXS測定結果(散乱プロファイルと動径分布関数)

この結果も液晶相での構造の緩みによるものと考えられ、現在他のリポソームでも同様の測定を行っている。これらの結果も含め、HL 特有の性質および癌細胞への融合システムを考察する。

CARS 分光イメージング法による iPS 細胞の非染色・非標識イメージング

(筑波大・数理¹ 東大院・理² 筑波大・医³)

○米山弘亮¹, 瀬川尋貴², 西村健³, 福田綾³, 久武幸司³, 加納英明¹

Label-free imaging of iPS cells using CARS spectral imaging

(University of Tsukuba¹, The University of Tokyo², University of Tsukuba³)

○Hiroaki Yoneyama¹, Hiroki Segawa², Hisatake Koji³, Fukuda Aya³, Nishimura Ken³, and Hideaki Kano¹
hiro1028.bass@gmail.com

【序】現在、iPS 細胞を再生医療へ応用する研究が盛んに進められている。しかしながら、十分な多能性の有る良質な iPS 細胞を選別する方法が未だに確立されていない。iPS 細胞は、培養時に多能性の無い細胞が発生することがあり、この多能性の無い細胞が移植の際に混入すると、生体組織内に腫瘍を形成する可能性があるため、再生医療への大きな妨げとなっている。そこで本研究では、非線形ラマン分光イメージング法を用いて、非破壊・非侵襲・非染色・非標識にて iPS 細胞の分子イメージングを行い、多能性を有する良質な iPS 細胞を識別・スクリーニングする方法の開発を試みた。

【実験】測定には、研究室で開発したマルチプレックス CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) 分光システムを用いた。本研究では、図 1 に示す二種類の iPS 細胞を用いた。一つは通常通り準備した多能性を有する iPS 細胞、もう一つは、体細胞に導入する Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの転写因子のうち、Klf4 の導入量を減らすことでできる、多能性の無い細胞である[1]。両者は共に高い増殖能を持ち、同様な細胞塊を形成する。これら二種類の細胞の違いは、多能性発現の識別マーカーの一つである Nanog 遺伝子の発現の有無で確認できる。この遺伝子発現を図 2 のように緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) による蛍光イメージングで確認しながら、CARS 測定を行った。

【結果】

通常通り培養した iPS 細胞の実験結果を図 3、図 4 に示す。図 3 のスペクトルは、測定で得られた CARS スペクトルから最大エントロピー法 (Maximum Entropy Method: MEM) を用いて抽出した $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルを特異値分解 (Singular Value Decomposition: SVD) 解析して得られたものである。

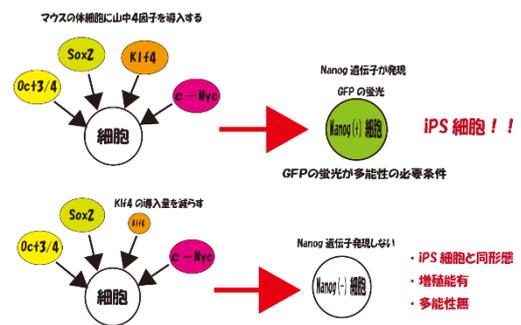


図 1 測定した二種類の細胞の概略

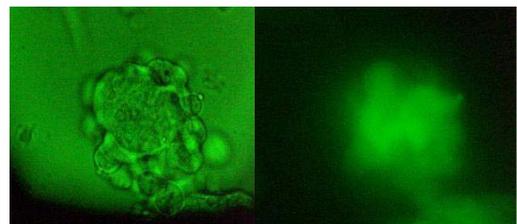


図 2 iPS 細胞塊の光学像(左)と GFP 蛍光像(右)

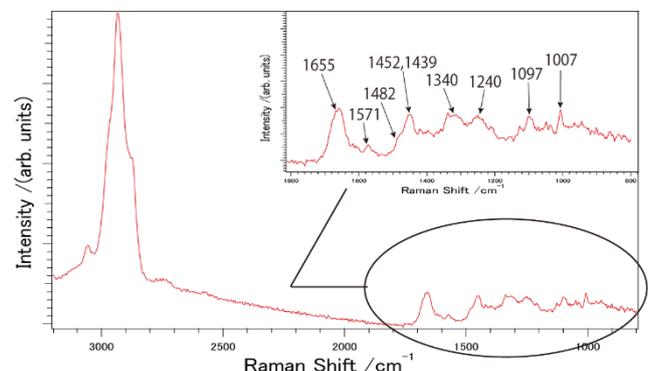


図 3 iPS 細胞の核小体の位置 (図 2 矢印) における $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル

図3のスペクトルは、図4の矢印で示した領域に対応しており、主にたんぱく質、核酸に由来するラマンバンドが観測された。

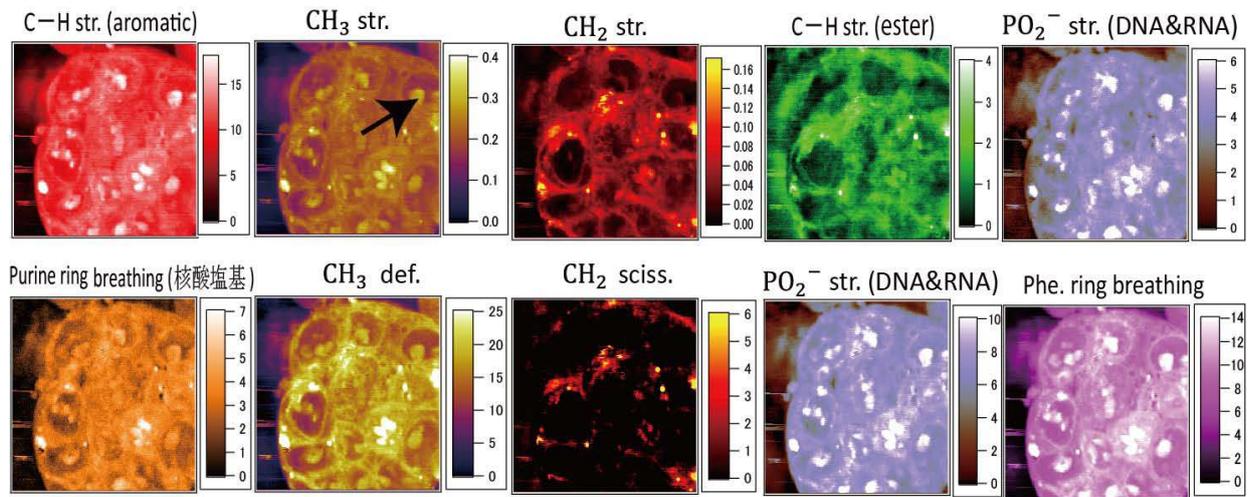


図4 各ラマンバンドから再構成したイメージ

図4に各ラマンバンドを用いて再構成したイメージを示す。複数の細胞がコロニーを形成している様子が可視化されている。特に、細胞の大部分の領域を細胞核が占めており、CH₂伸縮振動など脂質のバンドによるイメージでは、信号強度の弱い丸い領域が多数可視化されている。この中に複数の顆粒状のオルガネラがあるが、これらは核小体と考えられる（図4の領域）。

[1] K. Nishimura et al., J. Biol. Chem. 286, 4760 (2011)

石油を生むオーランチオキトリウムの コヒーレント・ラマン・イメージング

(筑波大・数理¹, 東大院・理², 筑波大・生命環境³) ○石塚 圭¹, 瀬川 尋貴², 小出 昌弘³,
吉田 昌樹³, 渡邊 信³, 加納 英明¹

CARS spectral imaging of living algae, *Aurantiochytrium* ~Toward *in-vivo* visualization of hydrocarbon accumulation ~

(Institute of Applied Physics, University of Tsukuba¹, Graduate School of Science, The University of Tokyo², Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba³) ○Kei Ishitsuka¹, Hiroki Segawa², Masahiro Koide³, Masaki Yoshida³, Makoto Watanabe³, and Hideaki Kano¹
s1420321@u.tsukuba.ac.jp

[序] 世界中でエネルギー資源の問題が注目されている。これまで、石油や天然ガスなどの天然資源はあと数十年で枯渇すると言われ、代替エネルギー資源の研究と開発が世界中で進められてきた。その中でも、藻類バイオ燃料の実用化に向けた研究が近年特に注目が集まっている。特に、微細藻類の持つ潜在能力への関心が高まっており、これらの藻類が持つ性質を活用して将来のエネルギー資源への応用が期待されている。

微細藻類の一種であるオーランチオキトリウムは、高い増殖速度、脂質蓄積能を持ち、細胞内においてトリアシルグリセロール(TAG)とスクアレンの、主に2種類の脂質を合成する。このうちスクアレンは、化石燃料に替わるエネルギー資源として、近年実用化に向けた研究が進められているが、生細胞内でのTAGとの識別が課題となっている。

そこで本研究では、coherent anti-Stokes Raman scattering(CARS)顕微鏡を用いて、オーランチオキトリウム生細胞の分子振動イメージングを行った。

[実験] 実験には、研究室で立ち上げた CARS 分光イメージングシステムを用いた。光源には、マイクロチップ Nd:YAG レーザー (中心波長 1064 nm) を用いた。基本波である 1064 nm のパルス光を二つに分け、一方を ω_1 光として、もう一方をフォトニック結晶ファイバー (photonic crystal fiber) に導入して、広帯域スーパーコンティニューム光を発生させ、それを ω_2 光として用いた。 ω_1 、 ω_2 の光学距離を適切に調整し、2つの光が同軸になるように最適化した。

測定サンプルには、培養時間が 24 時間、48 時間、72 時間、96 時間の 4 種類の藻類細胞を用いた。細胞の懸濁液をスライドガラス及びカバーガラスで挟み、試料とした。これを顕微鏡上のピエゾステージに置きサンプルをスキャンして分光イメージを取得した。

[結果と考察] 図 1 に、オーランチオキトリウム生細胞の結果 ($\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル) を示す。細胞は 72 時間培養後のものである。細胞内に、脂質成分として少なくとも異なる 2 種類の成分 (a) 及び (b) が存在することがわかった。それぞれのラマンスペクトルを標品のスクアレン及び TAG のラマンスペクトルと比較することにより、図 1(a) 及び (b) は各々スクアレン、TAG であると同定した。図 1(a) 及び (b) のスペクトルは、図 2(a) の光学像中のそれぞれ A 点及び B 点から得られたものである。図 2(b) には CH_2 伸縮振動にて得られた CARS イメージ

を示す。図 2(b)ではスクアレンと TAG の両者が可視化されている。

図 1 で示したスペクトルの C=C のバンドに着目すると、スクアレンは 1662 cm^{-1} 、TAG は 1652 cm^{-1} であった。この波数差に注目し、スクアレンと TAG の細胞内での分布を示す C=C の波数シフトによる空間イメージを構成した(図 2(c))。図 2(d)及び(e)には、C=C のバンドを二つのガウス関数でフィットした結果を示す。スクアレンと TAG が、生細胞内で明瞭に識別されている。

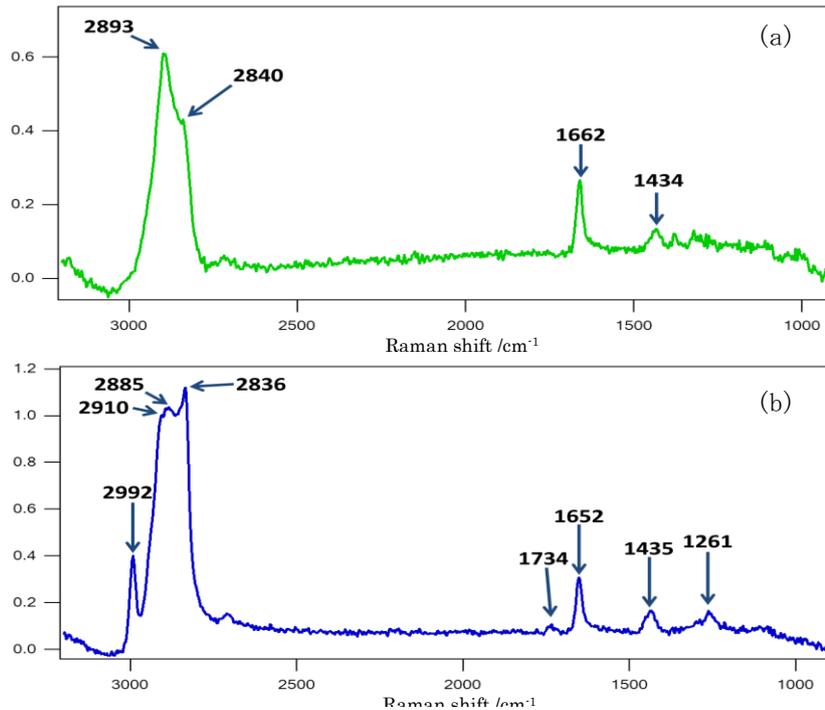


図 1. 生細胞内の(a)スクアレン及び(b)TAG の $\text{Im}[X^{(3)}]$ ラマンスペクトル。

図 2(a). 光学像

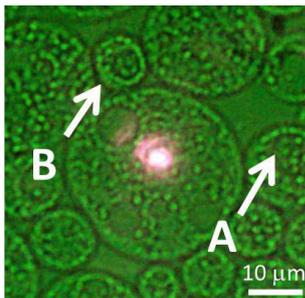


図 2(b). CH_2 伸縮イメージ

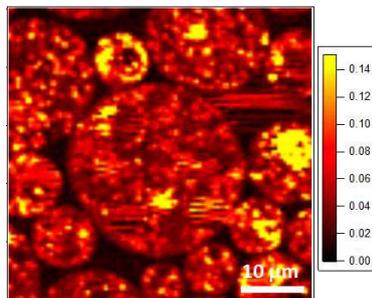


図 2(c). C=C 波数シフトイメージ

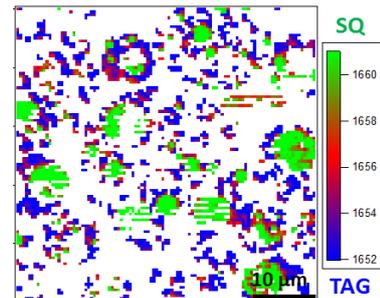


図 2(d). C=C イメージ(1662 cm^{-1})

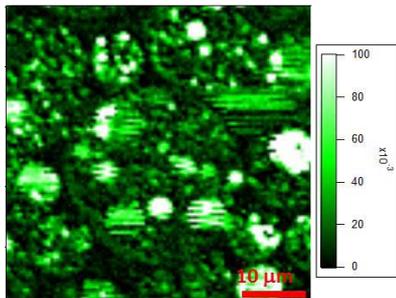
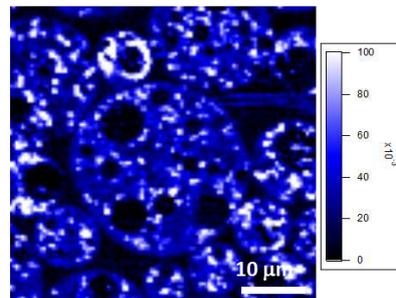


図 2(e). C=C イメージ(1652 cm^{-1})



テラヘルツ時間領域分光法によるトレハロースにコートされた
リゾチームの低振動ダイナミクス
(神戸大院・理¹、神戸大・分子フォト²)

○岡田 梨沙¹、山本 直樹¹、田村 厚夫¹、富永 圭介^{1,2}

Low-Frequency Dynamics of Trehalose-coated Lysozyme Studied
by Terahertz Time-Domain Spectroscopy

(¹ Graduate School of Science, Kobe Univ. , ² Molecular Photoscience Research Center, Kobe Univ.)

○Risa Okada¹, Naoki Yamamoto², Atsuo Tamura¹, Keisuke Tominaga^{1,2}

【序】極度な温度変化や乾燥状態では細胞破壊やタンパク質の変性が起こるため、生体が生息することは困難である。しかし、このような条件下においても生き延びることのできる生物(クマムシ、ネムリユスリカなど)の存在が知られている。これらの生物は、生体の保護物質として水の代わりに大量の糖、特にトレハロース(2分子のグルコースが1,1-グリコシド結合してできた2糖類)を蓄積することが知られている。このことから、極度な温度変化や乾燥など外的ストレスからタンパク質・生体膜を保護するトレハロースの働きが注目を浴びている。トレハロースはガラス化しやすく、このトレハロースの高い粘度がタンパク質の変性や構造破壊を引き起こす運動を抑制すると考えられている。このような極度な温度変化や乾燥ストレスによって影響を受けるタンパク質の運動は、多くの原子が集団的に運動することによって起こる。この集団的な運動は数十 cm^{-1} 程度の低振動運動に相当し、中性子散乱¹や分子動力学計算²などの手法を用いて観測されている。また、近年のフェムト秒レーザーの発展により開発されたテラヘルツ時間領域分光法(THz-TDS)も、タンパク質の低振動領域の運動を研究する手段として用いられている。本研究では、トレハロースによるタンパク質の低振動運動の熱活性を理解することを目的とし、THz-TDSを用いて温度を変化させて測定を行った。

【実験】試料としてトレハロース、リゾチーム、トレハロースとリゾチームの混合物の3種類を作製した。またトレハロース以外に、同じ二糖類であるマルトース(2分子のグルコースが1,4-グリコシド結合してできた2糖類)、スクロース(グルコースとフルクトースが結合してできた2糖類)の測定も行った。それぞれの試料は凍結乾燥させ、ペレット状にした。

テラヘルツ電磁波の発生、検出にはフェムト秒レーザーパルス(中心波長 800 nm)と光伝導アンテナを用いた。THz-TDSでは、試料を透過したテラヘルツ波と参照となる電磁波の電場の時間依存性(図1)を測定し、フーリエ変換することによってスペクトルを得る。この電場の振幅の変化と位相の変化から試料の吸光係数や屈折率などの物理量を求めることができる。得られた吸光係数・誘電率の温度依存性、温度因子を除いた双極子のダイナミクスを表す量として定義した換算吸収断面積(Reduced Absorption Cross Section: RACS)³の傾きをあらゆる振動数の指数依存性について議論した。温度変化はクライオス

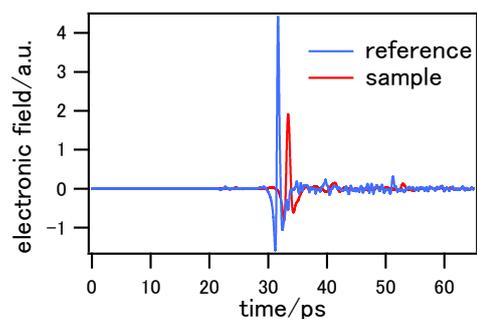


図1 電場の時間変化

タットを用いて 83 ~353 K の範囲で行った。また、常温の 0.2 ~20 GHz における複素誘電率の測定をネットワークアナライザー(アジレントテクノロジー、E5071C)を用いて行った。

【結果と考察】THz-TDS によって得られたトレハロースにコートされたリゾチームの吸光係数の温度依存性の結果を図 2 に示す。吸光係数のスペクトルは波数とともに単調に増加した。温度上昇に対する吸光係数の増加について詳しく検討するため、リゾチームと糖(トレハロース、マルトース、スクロース)にコートされたリゾチームの 25 cm^{-1} での吸光係数、その吸光係数を温度で微分した吸光係数の傾きを温度に対してプロットした(図 3)。リゾチームの吸光係数は温度上昇に伴って単調に増加するのに対し、糖を加えた試料では 300 K 付近から吸光係数の傾きが大きくなっていることがわかる。この吸光係数の傾きが大きくなる温度は、示差走査熱量測定(DSC)⁴によって観測されたトレハロースとリゾチームの混合試料のガラス転移温度に近い。このことは、THz 帯のスペクトル成分はピコ秒オーダーのダイナミクスに相当するため、ガラス転移によってピコ秒オーダーの運動が活性化されたことを示唆する。また、糖の種類の違いによる吸光係数の傾きの変化は観測されなかった。

ネットワークアナライザーと THz-TDS によって得た GHz ~THz 領域の複素誘電率のスペクトルを Cole-Cole 型の緩和モードと減衰振動モードの和⁵で再現を試みた(図 4)。THz 領域では、緩和モードはほとんど含まれず、減衰振動モードであらわされることから、各温度における THz-TDS による複素誘電率のスペクトルを一つの減衰振動モードであらわした。これらの解析結果から、THz-TDS によって得られた低振動運動の変化がどのような運動と関係しているのか議論する。

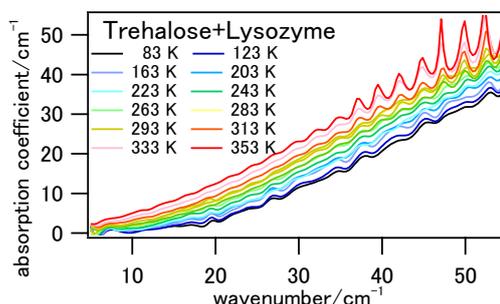


図 2 トレハロースにコートされたリゾチームの吸光係数の温度依存性

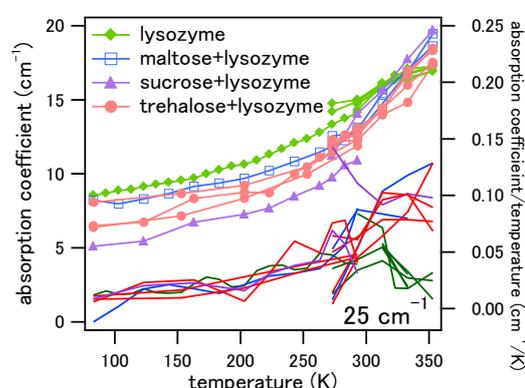


図 3 25 cm^{-1} での吸光係数の温度依存性

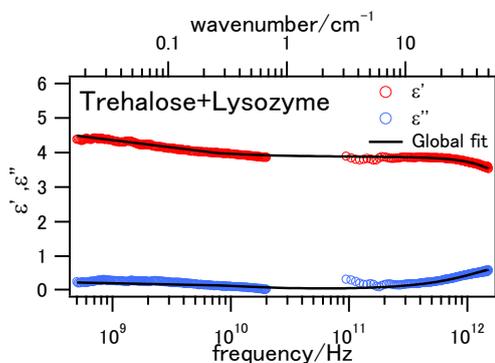


図 4 トレハロースにコートされたリゾチームの複素誘電率のスペクトル(293 K)とその線形解析

¹ L. Cordone, M. Ferrand, E. Vitrano and G. Zaccai, *Biophys. J.*, 1999, **76**, 1043.

² A. Lerbret, F. Affouard, A. Hédoux, S. Krenslin, J. Siepmann, M.C. Bellissent-Funel and M. Descamps, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**(36), 11103.

³ K. Yamamoto, K. Tominaga, H. Sasakawa, A. Tamura, H. Murakami, H. Ohtake and N. Sarukura, *Biophys. Lett.*, 2005, **53**, L22.

⁴ Y. H. Liao, M. B. Brown, T. Nazir, A. Quader and G. P. Martin, *Pharm. Res.*, 2002, **19**(12), 1847.

⁵ H. Yada, M. Nagai, K. Tanaka, *Chem. Phys. Lett.*, 2008, **464**, 166.