DNA プローブを用いた電子輸送計測による DNA 単分子検出

(東工大院・理工*,阪府大院・工**)○西野智昭*, Bui Tan Phuc**,木口学*

Single-molecule Detection of DNA through Electron Transport Measured by DNA Tips (Tokyo Tech.*, Osaka Pref. Univ.**) OTomoaki Nishino*, Phuc Tan Bui**, Manabu Kiguchi*

【序】近年の分子エレクトロニクスへの期待を主な背景として、単分子の電気伝導特性の評価が多大な興味を集めている. ブレイクジャンクション法など様々な計測手法が開発され、単分子の伝導特性についてめざましい進展が見られている. しかし、従来の手法では、微小な電極間に単一、または少数の分子をサンドイッチ状に挟みこんで測定しており、2 つの分子の空間的配置を制御して配列することはできない. そのため、単分子とこれに近接した他の単分子間に生起する電子移動を計測することはできなかった. 多くの機能性材料では、複数種の分子が相互作用することによってその機能が発現されるため、単分子間電子移動の計測は機能性分子集合体の精緻な機能評価に極めて有用である. そこで、我々は、走査型トンネル顕微鏡(STM)の分子探針をもとに、単分子間における電子移動の計測法を開発した. すなわち、STM の探針に分子を固定化し(分子探針)、金属基板の表面に他の分子を吸着させ、両者の空間配置をサブ Å オーダーで制御しながら電子移動に起因する電流を直接計測する. 本手法に基づき、単一の水素結合を介した電子移動を初めて定量し、共有結合を介した場合よりも抵抗が低く、有利な電子移動が生じることを見出すなど、興味深い知見が得られ

ている.本研究では,DNA 探針を用い,金属基 板上に吸着した検体 DNA との二本鎖形成時の電 子伝導変化を計測した(図1).DNA 二本鎖の形 成に伴う電子伝導変化を単一分子レベルで測定 することにより,新規 DNA 単分子検出法を開発 することを目的とした.

【実験】Au ワイヤ(直径 0.25 mm)を電解研磨



図 1. DNA 探針を用いた単分子検出の模式図.

することにより下地 Au 探針を作製した. 8 mer の一本鎖 DNA (ssDNA) の 3'末端にメルカ プトプロピル基 (HS(CH₂)₃-) を導入し,下地 Au 探針にこれを修飾し,DNA 探針を作製し た.天然雲母の表面に真空蒸着にて成膜した Au(111)を基板として用いた.探針の修飾と同 様に,DNA 探針と相補的な 8mer ssDNA を Au(111)基板に吸着させ,試料として用いた. 電流計測は,アジレント社製 STM システム (SPM5100) を用い,0.1 M NaClO₄水溶液中 にて行った. 【結果と考察】DNA 探針を, 検体 DNA を吸着させた Au(111)基板のごく近傍まで近接させた後, 電流を計測 しながら基板の垂直方向に引き上げることによって, 電流-距離(*I-z*)曲線を得た. *I-z*曲線には距離が変 化しても電流値が一定となる plateau が観察された. これらの *I-z*曲線から電流ヒストグラムを作成すると plateau が生じる電流値に対応したピークが見られた

(図 2a). この, *I-z* 曲線における plateau 電流値,ま たは電流ヒストグラムにおけるピーク電流値が DNA 探針と検体 DNA から形成された電子輸送によるもの であることを確認するために,DNA 探針,および検体 DNA として用いた互いに相補的な ssDNA からあらか

じめ二本鎖 DNA(dsDNA)を形成させ,その電子輸送を,未 修飾の金属探針を用いて,STM ブレイクジャンクション法に より計測した(図 2b).DNA 探針を用いた測定から得られた ヒストグラム(図 2a)に見られたピーク電流値は,図 2bにお けるピーク電流値と極めてよく一致することが分かった.これ により,DNA 探針を用いることによって,基板上に吸着した 検体 DNA との dsDNA 形成が生じ,これを介した電子輸送が 測定できることを明らかにした.また,探針,および試料とし て用いた DNA を共に 10 mer, 12 mer と変え,同様の測定を行 い,それぞれの DNA の長さにおける伝導度を求めた(図 3). その結果,伝導度は DNA の長さに対し指数関数的依存性を示 した.また,電流の流れやすさを示す減衰定数は,図 3 の直線 の傾きから 2.6 nm⁻¹と算出され,従来法による DNA について の報告値と良く一致した.

次いで、上記の計測法をさらにミスマッチ検出へと展開した. すなわち、DNA 探針に対してミスマッチ塩基を含む検体 DNA



図 2. (a) DNA 探針を用いて計測した電 流ヒストグラム. (b) 従来の STM ブレ イクジャンクション法により計測した dsDNA の電流ヒストグラム.



図3. 広等度の距離低行住. 比較としてアルカンジチオールの報告値も示した.



図 4. 相補, およびミスマッチ DNA の伝導度の比較.

を用いて,伝導度を計測した(図4).その結果,ミスマッチを含む場合には相補的な場合に 比べ伝導度が減少することが明らかとなった.さらに、メチル化塩基を含む場合においても 同様に伝導度が減少することを見出した.これらの結果は、ミスマッチ塩基による DNA 二 本鎖の局所構造の乱れ、および塩基のメチル化に伴う電子構造の変化によるものと考えられ る.以上により、DNA 単分子のミスマッチ、メチル化塩基の検出が可能であることが分かっ た.

【参考文献】(1) T. Nishino, N. Hayashi, P. T. Bui, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 4592. (2) P. T. Bui, T. Nishino, Y. Yamamoto, H. Shiigi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 5238. (3) T. Nishino, P. T. Bui, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3439. (4) B. Q. Xu, P. M. Zhang, X. L. Li and N. J. Tao, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 1105. (5) J. Hihath, B. Q. Xu, P. M. Zhang and N. J. Tao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 16979. (6) P. T. Bui, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, *Chem. Commun.*, **51**, 1666–1669 (2015).

誘導適合分子ドッキング法による基質-タンパク質の結合構造予測 (金沢大学理工研究域)○齋藤大明,川ロ一朋,長尾秀実

Prediction of a ligand-receptor binding pose: an induced-fit molecular docking study (Institute of Science and Engineering, Kanazawa University) OHiroaki Saito, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao

【序】新規薬剤の開発のためには、タンパク質の機能を阻害/活性化する基質(薬剤)分子や 結合サイトの同定,複合体構造の詳細が必須であり、これらを高速・高精度に予測・解析す るための理論的手法の開発が切望されている。

コンピュータを用いた薬剤スクリーニングや複合体構造の予測法にドッキングシミュレー ションがある。ドッキングシミュレーションは、創薬開発コストを効率化・迅速化させるた めの基盤技術として用いられて久しいが、未だこれら技術による新規薬剤の開発・実用化に は至っていない現状にある。これは、タンパク質-基質間の親和性評価のためのスコア関数が、 計算速度の制限から単純化されていることや、タンパク質の構造を剛体として取り扱ってい ることが原因の一つである[1]。タンパク質の結合サイトの動的構造は、基質との形状補償(「鍵 と鍵穴」)や分子親和性(分子間相互作用)、誘導適合(induced fit)を決定する重要特性であ ることから、タンパク質の構造フレキシビリティを考慮した分子ドッキング法の開発は至要 課題である.本研究では(1)分子動力学(MD)計算を用いて結合ポケットの形状変化を含め たレセプターのアンサンブル構造作成し、これら構造に対して(2)分子ドッキング計算を 行い、(3)結合構造の最適化(induced fit)を行う.これら手法の開発・洗練により、より 相互作用や構造補償が良い基質の結合構造を見いだす.

【方法・計算モデル】

本研究では基質-リガンドモデルとして Estrogen receptor (ER, PDB ID: 1WGR)を用いた(図 1)[2]。ER は基質の結合構造が X 線構造解析によりすでに解かれているモデルである。こ の PDB ファイルからリガンド分子(Estrogen)を取り除き、レセプターの周りに水分子を配置さ せて初期構造を作成した。始めに定温・定圧 MD 計算(*T* = 300K, *P* = 1atm)を実行し、タンパ ク質の溶媒和された平衡構造を作成する。MD の力場は Amber03 を用い,水分子のモデルは TIP3P を用いた。MD 計算には Amber14 を用いた。

分子ドッキング計算は MD 計算によって生成されたレセプターのアンサンブル構造に対し て行う。本研究ではレセプターの分子誘導適合をモデルするために、ドッキングにより示さ れた結合ポーズの構造最適化を行う。その後、最適化された結合構造に対し MM-GBSA 法[3] を用いてリガンド-レセプターの結合自由エネルギー(スコア値)を評価する。最後に、作成 したリガンド分子配座に対して、結晶の基質座標を reference にした根平均自乗変位(RMSD) 計算を行い、結果の正当性を評価する。誘導適合分子ドッキング計算は系が平衡化した 50ns 以降のデータを用いて行いた。本研究では 1500 個のレセプター構造に対して誘導適合分子ド ッキング計算を行い、それらの結合ポーズに対するスコア値と RMSD 計算を行った。ドッキ



☑ 1. Structure of the Estrogen receptor (left) and estrogen (right).

ングに用いたプログラムは Dock6.6 を用い、リガンドの力場パラメータは Generalized Amber Force Field (GAFF) [4], 原子の部分電荷は AM1 法を用いて RESP 電荷を適用した。構造最適 化と結合自由エネルギー計算には Amber14 を用いた。

【結果】ドッキングによって予測された全ての基質配座のスコア値(結合自由エネルギー) を RMSD 値に対してプロットした結果を図 2 に示す。図 2 に示される様に RMSD の値が小さ くなるに従って結合エネルギーが低くなる結果が得られ、用いた手法の有効性が示された。 図 3 に最も結合エネルギーが低かった時のリガンド分子の結合構造を示す。この時の RMSD 値は ~0.9 Å 程度であり、結晶で解かれた基質配座とほぼ一致する結果を示した。

【参考文献】

- Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J., & Corbeil, C. R. (2008), British journal of pharmacology, 153 Suppl 1, S7–26.
- [2] Warnmark, A., Treuter, E., Gustafsson, J.-A., Hubbard, R.E., Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W. J.Biol.Chem., 277:21862-, 2002.
- [3] Samuel Genheden & Ulf Ryde, Expert Opin. Drug Discov. (2015) 10(5):449-461.
- [4] Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004), J. Comp. Chem., 25(9), 1157–1174.



図2:RMSD 値に対する結合エネルギー



図3: ドッキング計算によるリガンド配座構造

光応答性 DNA の二重鎖形成および解離反応の時間分解検出

(京大院理¹、名大院工²)<u>中曽根祐介¹</u>、大威英晃²、神谷由紀子²、 浅沼浩之²、寺嶋正秀¹

Time-resolved study on duplex formation and dissociation of photoresponsive DNA

(Kyoto Univ.¹, Nagoya Univ.²) <u>Yusuke Nakasone¹</u>, Hideaki Ooi², Yukiko Kamiya², Hiroyuki Asanuma², Masahide Terazima¹

【序】近年、アゾベンゼンを利用した光応答性 DNA が開発され、遺伝子発現の光制御や光駆動型 DNA ナノマシンの開発など様々な面で応用が期待されている[1]。アゾベンゼンは二つのベン ゼン環がアゾ基で繋がった構造を持ち、光照射によって *cis-trans* 異性化反応を示す。*trans* 体 は紫外光領域に、*cis* 体は可視光領域に吸収を持つため、励起波長を選ぶことで *trans* 体・*cis* 体 を選択的に異性化することができる。このアゾベンゼンを DNA の側鎖にリンカーを介して導入 すると、*trans* 体は隣接する塩基対間にインターカレートし、スタッキング相互作用により二重鎖 を安定化する一方、*cis* 体は非平面構造を持つため立体反発を生じ二重鎖を不安定化する (Tm が

下がって一本鎖に解離する)。したがってアゾベンゼンの構造 trans-form 異性化を利用することで可逆的に二重鎖の形成および解離を 光制御でき、応用性の高い技術として注目を集めている(図 1)。アゾベンゼンの異性化反応は光励起後数ピコ秒程度で完 了する超高速反応であり、反応収率や異性化のメカニズムもよ く調べられている。しかし、異性化後に DNA 二重鎖が形成・ 解離する過程を時間分解で捉えた研究例はない。そこで本研究 ではその分子機構を明らかにすべく、過渡回折格子(TG)法 OnA二重鎖 により会合・解離ダイナミクスを調べた。



【実験】アゾベンゼンを一つ組み込んだ 12 塩基からなる合成 DNA (*Azo* DNA) と、*Azo* DNA と相補的な配列を持つノーマルな DNA を用意した。これらを混合した試料と、比較用として *Azo* DNA のみを溶かした試料を用いて測定を行い、アゾベンゼンの異性化反応および二重鎖の形成・解離過程を検出した。TG 測定では *trans* 体あるいは *cis* 体を適切な光照射によって蓄積した後、 *trans* 体から *cis* 体への異性化反応は YAG レーザーの 3 倍波(355 nm)で、*cis* 体から *trans* 体 への異性化反応は色素レーザー(462 nm)でトリガーした。プローブ光にはダイオードレーザー(840 nm)を使用し、測定温度は T_m付近である 55 度に設定した。

【結果】 trans 体から cis 体への異性化による解離反応ダイナミクス

図2に相補鎖を含む試料について紫外光励起(*trans* 体→*cis* 体)により得られた TG 信号を示 す。40 µs 付近に熱拡散信号、2~40 ms 付近に立ち上がりと減衰からなる分子拡散信号が観測さ れた。屈折率変化の符号関係より立ち上がりが生成物、減衰が反応物の拡散信号と同定され、*trans* 体から cis 体への異性化によって拡散係数の増加を伴 う反応が誘起されることがわかった。この拡散係数変 化は相補鎖を含まない試料では観測されなかったこと から、異性化によって不安定化した二重鎖が解離する 過程を捉えたものと同定した ($D_{reactant} = 2.8 \times 10^{-10}$ $m^{2}/s \rightarrow D_{product} = 3.5 \times 10^{-10} m^{2}/s$)。さらに格子波数を 変えて測定した結果、分子拡散信号の強度が時間とと もに増大する様子が観測され、拡散係数の時間変化を 捉えることに成功した。詳細な解析の結果、拡散係数



変化(解離反応)の速度は 670 μs と見積もられた。また相補鎖を含まない試料との比較により、 アゾベンゼンの異性化反応の収率が二重鎖に組み込まれることによって大きく減少することがわ かった。これは二重鎖内では異性化に必要な空間が確保できないためと考えられる。

cis 体から trans 体への異性化による会合反応ダイナミクス

図3に相補鎖を含む試料を可視光励起(cis 体→trans 体)することで得られた TG 信号を示す。

図 2 と同様、熱拡散信号および分子拡散信号が観測されたが、屈折率変化の符号関係より分子拡散信号の立ち上がり成分が反応物、減衰成分が生成物の拡散であると同定された。つまり拡散係数の減少が光誘起されており、アゾベンゼンの異性化によって引き起こされた会合反応を捉えたものと解釈できる ($D_{reactant} = 3.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s} \rightarrow D_{product} = 2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)。解離反応と同様、分子拡散信号の時間発展を解析することで会合反応速度を見積もることを行い、DNA 濃度が400



µMの条件では光励起後 3.8 msの時定数で会合することがわかった。さらに DNA 濃度を変えて



測定した結果、図4に示すように反応速度と濃度に線 形関係があることがわかった。これは観測した反応が 二分子反応であることを示しており、二重鎖の形成過 程を捉えたことを確認する結果となった。図4の傾き および切片はそれぞれ平衡における会合・解離の速度 定数に対応しており、これらを個別に見積もることに 成功した(会合速度定数:5.5×10⁵ M⁻¹s⁻¹、解離速度定 数:34 s⁻¹)。会合反応速度は拡散律速反応より遅く、 DNA 相補鎖との適切な配向での衝突が会合反応に必

要なことを示している。本討論会ではこれらの結果を基に DNA 二重鎖の形成・解離機構につい て議論する。

参考文献

1. Kamiya et al. Acc Chem Res. 2014; 47(6):1663-72.

光応答性 DNA 結合タンパク質 EL222 の反応ダイナミクス研究

〇高門 輝,中曽根 祐介,寺嶋 正秀 (京大院 理)

Reaction dynamics of light-regulated DNA-binding protein EL222

OAkira Takakado, Yusuke Nakasone, Masahide Terazima

(Kyoto Univ. Sci.)

【序】

生物は様々な光センサータンパク質を持っており、光励起によるタンパク質の構造変化および 下流分子との相互作用変化によって光情報を伝達し、種々の生理機能を制御している。これら光 応答反応を時間分解検出することは分子レベルでのシグナル伝達機構を明らかにするために不可 欠である。

海洋性バクテリア Erythrobacter litoralis 由来のタンパク質 EL222 は光受容ドメイン(LOV ドメイン)と DNA 結合ドメイン(HTH ドメイン)からなる青色光センサータンパク質である[1]。暗状態で モノマー構造を持つ EL222 は、青色光励起によりタンパク質構造が変化し、ダイマー構造で DNA と結合する(図1)[1,2]。EL222 の生理機能として、青色光下では EL222 の特異的 DNA 認識配列 の下流に位置する DNA 修復酵素の発現を促すことにより、紫外光で損傷を受けた DNA を修復す

るなどの役割が予想されている[2]。また光によ り転写活性を制御できる特性を生かして、人工 的に転写活性を制御する光遺伝学への応用も 行われており[3]、今後の展開が期待されるタン パク質である。本研究では過渡回折格子(TG)法 を主に用いて、光励起された EL222 の高次構造 変化を捉え、さらに DNA との結合過程を時間 分解検出することを目的として測定を行った。



図 1. EL222 の反応モデル

【実験】

EL222 タンパク質は大腸菌を用いて発現させ、クロマトグラフィーによる精製を行った。TG 測 定では励起光として 462nm のパルスレーザーを、プローブ光として 840nm の連続光レーザーを用 いた。まず DNA を含まない EL222 全長タンパク質溶液での測定を行い、光励起によって引き起 こされる会合反応を検出した。また比較用に HTH ドメインを含まない LOV ドメインのみからな るサンプル(1-144 aa)の測定を行い、各ドメインの反応を詳細に検討した。さらに EL222 と DNA との混合溶液での測定を行い、タンパク質の反応に加えて DNA との結合ダイナミクスの検出を行 った。EL222 と結合する DNA 配列は文献[2]を参考に決定し、認識配列を含む 20 塩基対の DNA をタンパク質と等量混合した条件で測定を行った。 【結果と考察】

図2にDNA を含まない場合の EL222 全長タ ンパク質のTG測定の結果を示す。格子波数を 変えて測定した結果、分子拡散信号の現れる時 間スケールが変化するとともに、数百ミリ秒程 度の反応速度で分子拡散係数の減少を伴う反 応が観測された。反応物および生成物の分子拡 散係数はそれぞれ D_{反応物}=10x10⁻¹¹ m²/s、D_{生成物} =5.6x10⁻¹¹ m²/s であると見積もられた。反応物 の拡散係数はモノマー構造の拡散係数として 妥当なものである。またこの反応速度はサンプ ルの濃度に依存することが分かった(図 3)。 これは拡散係数変化を伴う反応が多分子反応 であることを示しており、これらの結果から EL222は DNA 非存在下でも光依存的なダイマ ー形成反応を起こすことがわかった。また LOV ドメインのみからなるサンプルについて も同程度の反応速度で拡散係数の減少(会合反 応)が観測されたため、LOV ドメインが光依 存的なダイマー化サイトとして機能している ことがわかった。

次に EL222 全長タンパク質と DNA との混合 系で TG 測定を行った (図 4)。 DNA を加える ことにより、EL222 で観測されたダイマー化反 応が起こる前の時間スケールにおいても拡散 係数の減少が観測された。これは DNA 存在下 では EL222 のモノマーと DNA が早い時間で結 合する、あるいは EL222 のダイマー化反応の 速度が加速することを示しており、現在、様々 なモデルを用いて DNA との相互作用ダイナミ クスを解析している。討論会ではこれらの結果 を基に反応ダイナミクスという観点から EL222 が機能する仕組みを議論する。



図 2. 全長 EL222 の TG 信号



図 3. 全長 EL222 反応速度の濃度依存性





【参考文献】

[1]A. Nash et al. PNAS 2011, 108, 9449-9454

[2]G. Rivera-Cancel et al. Biochemistry 2012, 51, 10024-10034

[3]L. Motta-Mena et al. Nature chemical biology 2014, 10, 196-202

X線非弾性散乱による水和ポリペプチドの集団ダイナミクス測定

(福岡大理¹,熊本大院自然²,理研³)○吉田 亨次¹,山口 敏男¹,細川 伸也²,Baron Alfred Q.R.³ Collective dynamics of hydrated polypeptides

by inelastic X-ray scattering

(Fukuoka University¹, Kumamoto University², RIKEN³)

Koji Yoshida¹, Toshio Yamaguchi¹, Shinya Hosokawa², Alfred Q. R. Baron³

【はじめに】 タンパク質の運動は階層性を持つことが知られており、タンパク質の機能と直接関係があるドメイン運動(ナノ秒からマイクロ秒の時間スケール)から分子間相互作用に基づ くタンパク質の側鎖および水和水分子の振動、回転運動(ピコ、フェムト秒の時間スケール)ま で幅広い。これら両者のダイナミクスを結び付けるモデルが提唱されており[1]、タンパク質の機 能発現を分子科学的に説明するためには後者のダイナミクスの観測が重要であると考えられる。

近年、中性子散乱[2,3]、NMR[4]、テラヘルツ分光[5]などにより、水和タンパク質のダイナミ クスが測定され、タンパク質のガラス転移に代表される動的転移が見出されている。中性子散乱 では単一粒子運動の情報が得られ、そこには直接的な構造情報を含んでいない。水和タンパク質 の構造と運動に関するより詳細な議論のためには、干渉性散乱を測定して分子の集団ダイナミク スを明らかにすることが望まれる。

本研究では水和ポリペプチドの高分解能X線非弾性散乱測定を300K~180Kの範囲で行った。

これまでに、リゾチームなど水和タンパク質の 集団ダイナミクスが測定[6-8]されており、本研 究の結果と比較を行い、水和ポリペプチドの集 団ダイナミクスの動的転移について議論した。

【実験】試料はポリグリシンならびにポリリ シン粉末を用いた。ポリリシンは水溶液中でラ ンダム構造(中性溶液)、あるいはヘリックス構 造(塩基性溶液)をとる。ポリリシン粉末を純 水に溶解し、pH=12 に調整したのちに、凍結 乾燥させた試料をヘリックス状態のポリリシ ン粉末とした。一方、pH=7 で調製したポリリ シン粉末をランダム状態の試料とした。

水の飽和蒸気圧下で乾燥ポリペプチド粉末 を放置することにより水和ポリペプチドを得 た。水和率(乾燥ポリペプチド1gに対する水 のグラム量)は0.4である。

高分解能X線非弾性散乱測定は BL35XU(SPring-8)で実施した。測定した波数



Fig. 1. IXS spectra of wet and dry helical poly-L-lysine at Q = 24.1 nm⁻¹ and 300 K

ベクトル *Q*の範囲は 20 - 28 nm⁻¹である。エネルギーの範囲は±30 meV で 2 から 3 回の掃引を 繰り返した。測定温度は室温から 180 K までである。セルは単結晶サファイアを用いた。同一試 料では個々のスキャンにおけるスペクトルの有意の変化はなく、X線照射による試料の損傷の可 能性は少ないと考えられる。plexiglas の散乱も測定し、装置の分解能関数とした。

【結果および考察】吸収補正後の試料の散乱から空セルの散乱を差し引いた。Fig. 1 に乾燥なら びに水和状態のポリリシン(ヘリックス)粉末の IXS スペクトル *S*(*Q*, *ω*)を示した。一番下は分 解能関数である。*S*(*Q*, *ω*)の解析には以下の Damped Harmonic Oscillator (DHO)モデルを使用し た。

$$S(Q,\omega) = \frac{\hbar\omega/k_BT}{1 - \exp(-\hbar\omega/k_BT)} \left[\frac{A_0}{\pi} \frac{\Gamma_0}{\Gamma_0^2 + \omega^2} + \frac{A_Q}{\pi\hbar/k_BT} \frac{4\omega_Q\Gamma_Q}{(\omega^2 - \Omega_Q^2)^2 + 4\omega^2\Gamma_Q^2} \right]$$

ここで、 $\omega_{q} = \sqrt{\Omega_{q}^{2} - \Gamma_{q}^{2}}$ である。 $A_{0} \ge \Gamma_{0}$ は中心のローレンツ関数の強度と半値半幅で、 $A_{q}, \Omega_{q}, \Gamma_{q}$ はそれぞれ DHO 成分の強度、励起エネルギー、半値半幅である。

Fig. 2 に DHO エネルギーの分散関係を示した。180 K では、乾燥試料と水和試料の DHO エネ ルギーの差は小さいが、300 K では、ポリリシン(ランダム状態、ヘリックス状態とも)について、 水和試料のほうが乾燥試料よりも DHO エネルギーが小さい結果が得られた。これはリゾチーム などで見られる phonon energy softening(生理学的温度で水和タンパク質の柔軟性が増大するこ と)と同一の現象である[8]。一方、ポリグリシンでは、300 K において乾燥試料よりも水和試料の

ほうが DHO エネルギーが高くなった。このこ とから、phonon energy softening はタンパク 質の主鎖よりも側鎖が原因となっていること が示された。

また、DHO エネルギーに対する水和の効果 が180 Kよりも300 Kにおいて顕著になるこ とは、中性子準弾性散乱などで見られるタンパ ク質のガラス転移と同様に動的転移の一種で あると考えられる。

[1] H. Frauenfelder, et al., IUBMB Life **59**, 506-512
(2007). [2] W. Doster, et al., Nature **337**, 754-756
(1989). [3] H. Nakagawa et al., J. Phys. Soc. Jpn. **79** (8), 083801-1-4 (2010). [4] A. Mittermaier, et al., Sience, **312** 224-228 (2006). [5] S. Kawaguchi, et al., Phys. Chem. Chem. Phys. **12**, 10255-10262
(2010). [6] D. Liu, et al., Phys. Rev. Lett. **101**, 135501-1-4 (2008). [7] K. Yoshida, et al. J. Chem. Phys. **133**, 134501-1-7 (2010). [8] Z. Wang, et al., J. Phys. Chem. B **117**, 1186–1195 (2013).



Fig. 2. Q dependence of DHO energy for dry and hydrated polypeptides

タンパク質のフォールディング過程の動的多様性の理論的研究 (分子研¹、総研大²) ○森 俊文^{1,2}、斉藤 真司^{1,2}

Theoretical study of the dynamic heterogeneity in the protein folding/unfolding transitions (IMS¹,SOKENDAI²) oToshifumi Mori^{1,2}, Shinji Saito^{1,2}

近年の実験的・理論的手法の発展により、タンパク質のダイナミクスの理解は大き く進んでいる。特に、マイクロ秒領域でのダイナミクスは実験およびシミュレーショ ンから直接観測できるようになりつつあり、これらの情報を相補的に取り込むこと で、分子レベルでの理解が大きく進むことが期待される。一方で、シミュレーショ ンから得られる多自由度・長時間トラジェクトリの解析は容易ではなく、特に構造 変化の遷移過程をより詳しく調べるための方法が必要とされている。

本研究では、トラジェクトリの時間情報を有効に活用する、新たなアプローチを 提案するとともに、タンパク質のフォールディング過程の反応機構とダイナミクスを 分子レベルから明らかにすることを目指して、D. Shawらにより得られたVillin headpiece (HP35) (野生型 (WT) とその変異体 (NleNle)) タンパク質の~300µsのトラ ジェクトリ [1] の解析を行った。

従来、トラジェクトリから重要なモードを抜き出す際に は、分散共分散行列を用いて分散の大きい(="柔らか い")モードを調べる主成分解析法 (principal component analysis (PCA))が広く使われていたが、我々はそれらの モードの時間相関関数行列から、より寿命の長い(="遅 い")モードを求める方法 (dynamic component analysis (DCA))を開発した [2]。

(DCA))を開発した [2]。 HP35タンパク質は3つのαヘリックスからなるタンパク質 であり、最も速くフォールドするタンパク質の一つとして

よく知られている(図1)。本研究ではまず、DCAに よりトラジェクトリに含まれる一番遅いモード⁸ (DC1)を調べた。その結果、DC1はタンパク質の⁷ フォールディング/アンフォールディングを適切に⁷ 表わしていることが確認され、また、このモード⁴ に沿って大まかに2状態をとることが分かった。一³ 方で、自由エネルギー障壁付近では細かな起伏が³ 見られた(図2)。さらに、遷移過程のダイナミク⁰ スを調べるためにフォールディング/アンフォールディ⁻¹ ング遷移の遷移時間の分布を求めたところ、大きなば らつきが見られた。これらの結果は、中間状態や複



図1: HP35の構造。NleNle 変異体ではLys(黃色)が Nleに置き換えられる。



に沿った自由エネルギー曲線。

数の経路が存在することが示唆している。

次に、より詳細な反応過程を調べるために、WTについて、DC1および他のDCモードで表される二次元自由エネルギー面を調べた。その結果、DC1とDC4で表される自由エネルギー面において、反応経路が主に2つに分けられることが明らかになった(図3)。これらの経路に沿ったタンパク質の構造変化を調べたところ、上の経路(DC4>0)ではα3へリックスの端から壊れていくのに対して、下の経路(DC4<0)ではα1-α2の間のコンタクトが壊れていくことによってアンフォールディングが進むことがわかった。一方で、NleNle変異体では、α3へリックスから壊れる経路をほとんど通らず、またアンフォールド状態でもα3へリックスは比較的安定であることも明らかになった。この結果は、NleNle変異体ではタンパク質を部分的に安定化させ、また反応経路を絞り込むことで、より早いフォールディングを可能にしていることを示唆している。

本研究は、HP35のように単純に見える小さなタンパク質であっても、フォール ディング過程は複数のフォールディング/アンフォールディング遷移の経路を持ち、 複雑なダイナミクスをとることを示している。さらに、実際には、(局所的な)より 速い運動など異なるタイムスケールに渡るダイナミクスも同時に起きており、単分子 FRET法などの最新の実験からも複数の時間スケールを含む量が観測されている。こ れらの複雑なダイナミクスがどのようにカップルしているのか、またそれを(長時間) 分子動力学シミュレーションのトラジェクトリを用いてどのように解析すればいい のかについても当日議論する予定である。



図3: WTのDC1とDC4に関する二次元自由エネルギー面。 contact mapは天然状態と比べてcontactがどのように増減し ているかを示す。

- [1] S. Piana et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 17845 (2012)
- [2] T. Mori and S. Saito, J. Chem. Phys. 142, 135101 (2015)

ユビキチンの折り畳みダイナミクスの一分子蛍光分光測定

(東北大院・理¹, 東北大多元研², IBC Academia Sinica³)

○齊藤 雅嵩^{1,2}, Chen Eric H.-L.³, Chen Po-Ting³, Chen Rita P.-Y.³,

鎌形 清人 1,2, 小井川 浩之 1,2, 高橋 聡 1,2

Folding dynamics of ubiquitin detected by single molecule fluorescence spectroscopy

(Grad. Sch. Sci., Tohoku Univ.¹, IMRAM, Tohoku Univ.², IBC, Academia Sinica³)

○Saito Masataka^{1,2}, Chen Eric H.-L.³, Chen Po-Ting³, Chen Rita P.-Y.³, Kamagata Kiyoto^{1,2}, Oikawa Hiroyuki^{1,2}, Takahashi Satoshi^{1,2}

【序】 蛋白質は数十から数百のアミノ酸が連なった分子であり、多くの蛋白質が特 有の構造に折り畳まれる。蛋白質はその構造の自由度とは対照的に、素早く折り畳ま れることが知られている。そこで私たちは、折り畳みのモデル蛋白質であるユビキチ ンに注目して研究を行っている。Piana らによる全原子分子動力学シミュレーション によって、ユビキチンの折り畳み過程のミリ秒からサブミリ秒の時間領域における複 雑なダイナミクスの存在が推測されている[1]。しかし、推測された複雑な過程を、通 常の多分子測定で実験的に明らかにすることは困難である。そこで、私たちは一分子 蛍光分光測定によりユビキチンの折り畳みダイナミクスを明らかにすることを考え た。ユビキチンに二種類の異なる蛍光色素を修飾し、それら色素間のフェルスター共 鳴エネルギー移動(FRET)を観測することで、ユビキチンの構造変化を一分子レベルで 推定できる。本研究では、独自の一分子蛍光分光装置を用いることで、試料を高速で 流しながら 100 µsの高い時間分解能での測定を行った[2]。そのため、様々な変性剤 濃度の平衡条件での一分子測定を行うことで、複雑なダイナミクスを検出できる可能 性がある。

【実験】 ユビキチンの変異体に蛍光色素 ATT0532 と Alexa647 を一分子ずつ共有結合さ せ、色素間の FRET を観測した。

Fig.1 に一分子蛍光分光測定装置の概略図 を示す。励起光(532 nm)は、シリンドリカル レンズを透過したのちに対物レンズによって マイクロ流路内にライン状に集光される。試 料溶液を流路内に流しながら測定を行うこと



Longer observation time: $\sim 5~ms$ Higher time resolution: less than 100 μs

ら測定を行うこと Fig.1 一分子蛍光分光測定装置の略図

で、試料分子は蛍光を放出しながら集光領域を進む。試料分子からの蛍光を、同じ対

物レンズにより集光し、その波長によりそれぞれの色素に分離して検出した。得られ た蛍光強度の時系列データから、FRET 効率の時系列データを算出した。

【結果と考察】 蛍光色素標識されたユビキチンを用いて、一分子蛍光分光測定を 行い、異なる変性剤濃度で多数の時系列データを得た(Fig. 2)。変性剤濃度が低い時 には、得られたトレースは高い FRET 効率に分布しており、コンパクトな天然状態構 造をとっていると考えられる。変性剤濃度が高くなるにつれて低い FRET 効率を示す 分布が増え、高い変性剤濃度条件ではほとんどの分子が低い FRET 効率を示した。低

い FRET 効率の分布は、変性により広が った構造を持つ分子に対応すると考え られる。FRET 効率の分布の変化が、天然 状態構造から変性構造への転移を示す ことから、ユビキチンは二状態的に折り 畳まれることが結論できる。

次に、それぞれの蛍光色素の平均の蛍光強度から 予測される FRET 効率の分布幅を計算し、実験で得 られた分布幅との比較を行った[3]。Fig. 3の点線 は、予測された天然状態の分布幅であり、実験結果 とよく一致した。これは、天然状態の試料は均一で あり、構造揺らぎによる FRET 効率の変化を示さな いことを意味する。

一方で、変性剤濃度が高い条件では、実験で得ら れた分布幅が、予測された分布幅(実線)よりも明ら かに大きくなった。また、各トレースを調べると、 ほぼ一定の FRET 効率を示す分子がほとんどだっ た。これらの結果は、変性状態の蛋白質が不均一な 構造を持つ分子の集合体であることを意味する。







Fig. 3 FRET 効率のヒストグラム

変性した蛋白質はランダムコイルの性質を持ち、数十ナノ秒の時間スケールで素早 く運動すると報告されている。そのため、ユビキチンの変性状態が単純なランダムコ イルであるなら、我々の測定の時間分解能である 100 µsの間に構造が時間的に平均化 され、狭い分布を示すはずである。ところが、今回の結果はユビキチンの変性状態が 不均一であることを示した。これらのことから、ユビキチンの変性状態は部分的な構 造を保持しており、それらの遷移は観測時間数ミリ秒以上の長い時間スケールで起こ ると考えられる。ユビキチンの高度な安定性は、部分的な二次構造の壊れにくさによ るものかもしれない。

[1] Piana et al. Proc Natl Acad Sci USA 110, 5915 (2013). [2] H. Oikawa, et al. Scientific Reports 3, (2013). [3] H. Oikawa et al. J Phys Chem B 119, 6081 (2015).

H⁺、Na⁺、Cl⁻、三種の光駆動型イオンポンプの機能転換 (名古屋工業大学¹, JST さきがけ²) 〇井上圭一^{1,2}, 野村祐梨香¹、神取秀樹¹

Functional conversion among light-driven H⁺, Na⁺ and Cl⁻ pumps (Nagoya Inst. Tech.¹, JST PRESTO²) OKeiichi Inoue^{1,2}, Yurika Nomura¹, Hideki Kandori¹

【序】微生物型ロドプシンは真正細菌や古 細菌、真核生物など主に単細胞微生物の細 胞膜に存在する光受容型膜タンパク質であ る。全ての微生物型ロドプシンは共通の7 回膜貫通型構造を持つ。また発色団として all-trans 型のレチナールを分子内部に結合 しており、レチナールが光を吸収すると 13-cis 型へと異性化し、その光反応をトリガ ーとして様々な生理機能が発現される。中





でも最も早く発見され、詳細に研究されているのが高度好塩古細菌の持つ光駆動外向き H⁺ポ ンプであるバクテリオロドプシン (BR) と内向き CIポンプのハロロドプシン (HR) である。

ー方で近年これらとは別に、海洋に棲む真正細菌から BR とは全く異なる H⁺ポンプである プロテオロドプシン (PR) が発見された。またさらに HR と同様に真正細菌も独自の CI ポン プを持つことも明らかになっている[1]。そして 2013 年に我々は真正細菌が、古細菌には存在 しない外向きの Na⁺ポンプを持つことを報告した[2]。すなわち真正細菌は図 1 に示すような 三種類の光駆動イオンポンプを用いて、光のエネルギーで様々なイオンの輸送を行っている。 過去の研究により、これら光駆動型イオンポンプがそれぞれの機能に応じたイオンを輸送 する際に、三本目の膜貫通へリックス (ヘリックス C) 上の残基が重要であることが分かっ ている[1,3]。例えば BR や PR ではレチナールを挟んで細胞外側と内側にそれぞれ一残基ずつ H⁺移動に関わる酸性残基が存在する (BR では両方とも Asp、PR では前者が Asp で後者が Glu)。 またその間に存在する Thr も機能に重要であり、これら3つの残基は DTD(E)モチーフと呼ば れる。一方で真正細菌の CI ポンプは H⁺ポンプの酸性残基が Asn と Gln に変わった、NTQ モ チーフを持つ。そして Na⁺ポンプのモチーフは、さらに NTQ 型の Thr が Asp に置き換わった NDQ 型であり[3]、各イオンポンプにはその機能に応じて保存されたモチーフがある (図 1)。

ここから光駆動型イオンポンプにはモチーフの三残基が重要であるとされているが、本当 にモチーフのみで機能が決定されるのか、モチーフは必要条件でそれ以外の残基も機能決定 に関わるのかは不明である。これに対し、我々は特定の機能を持つタンパク質のアミノ酸を、 別の機能を持つ分子の相同な位置にある残基と入れ替え、その時の機能の変化を調べる「機 能転換実験」を行えば、三種類のポンプの機能を分ける鍵となるアミノ酸を同定し、機能決 定の必要十分条件を明らかにできると考えた。そこで本研究ではまず互いのポンプのモチー フ部分のみを入れ替え、それによる機能の変化を見た後、さらにそれ以外の残基を変異した 時の影響を見ることで、イオンポンプの機能を決定する要因を明らかにすることを目指した。

【実験】全てのロドプシンとその変異体は、大腸菌(C41(DE3)株)に遺伝子を導入し、タン パク質を発現させてイオン輸送活性測定に用いた。ロドプシンのイオン輸送活性は、pH 電極 を用いてイオン輸送に伴う大腸菌懸濁液の pH 変化を測定することで評価した。

【結果と考察】今回 H⁺、Na⁺、Cl⁻ポンプである GR、 KR2、FR の三種類のロドプシンを実験に用いた。 まず野生型のロドプシンについて、H⁺ポンプの場響 合は光照射により、細胞外の溶液の pH が低下し、 CIと Na⁺ポンプではイオンの輸送に伴い、二次的な H⁺の取り込みが起こり、pH が上昇する。これに対 し、各ポンプのモチーフを残りの二種類のものに置こ き換えたところ、大部分で活性が失われた(図2)。 その中で唯一活性を示しものは DTE モチーフを導 入した KR2 のみであり、弱い H⁺ポンプ活性がみら れた。これは野生型 KR2 は Na⁺がない環境下で H⁺ を輸送する機能を持っているため、モチーフの転換 だけで、容易に Na⁺中でも H⁺を輸送する H⁺ポンプ^も に機能転換されたと考えられる。ここからモチーフ のみでポンプの機能は決まらないことが分かった。

そしてモチーフに加え、さらなる変異を導入した。ロドプシンのイオン輸送活性 まず KR2 は細胞外側に Na⁺を結合するが、それに 関わる Asp102 を Asn に変異すると KR2 DTE の H⁺ ポンプ活性が増大し、また KR2 NTQ に D102N 変 異を加えると CIポンプ活性が現れた。これは Nat の結合がH⁺やCl⁻の輸送を阻害していることを意味 する。一方 FR DTE について CIポンプで保存性が 高い細胞質側の Ser255 を Phe に変異したところ、 H⁺ポンプ活性が見られた。また興味深いことに DTF でけなノーゲー DTE ではなく古細菌型の DTD モチーフを用いると KR2 も FR もより強い H⁺ポンプに機能転換された。

図3. モチーフに加え、さらなるアミノ酸の このように Na⁺ \rightarrow H⁺, Na⁺ \rightarrow Cl⁻, Cl⁻ \rightarrow H⁺の三種 の機能転換については「モチーフ+1残基」の変異 入れ替えを行った変異体のイオン輸送活性 により実現された。しかしそれらとは逆向きの三種の機能転換($H^+ \rightarrow Na^+, H^+ \rightarrow Cl^-, Cl^- \rightarrow Na^+$) についてはより多くの変異を加えても活性が現れなかった(図3)。すなわち今回検討したモ チーフ+数残基の変異では、常に一方向的にしか機能転換が成功しないという結果となった。 これは過去の BR と HR の機能転換の研究で、BR はわずか1残基の変異で CIポンプになるの に対し、HR は 10 残基変異しても H⁺ポンプにはならないものと共通の傾向である。講演では 微生物型ロドプシンの機能転換の一方向的な非対称性をもたらす要因についても議論する。 【参考文献】 1. K. Inoue, Y. Kato, H. Kandori (2015) Trends Microbiol. 23, 91-98.

2. K. Inoue, H. Ono, R. Abe-Yoshizumi, S. Yoshizawa, H. Ito, K. Kogure, H. Kandori. (2013) Nat. Commun. 4, 1678. 3. K. Inoue, M. Konno, R. Abe-Yoshizumi, H. Kandori. (2015) Angew. Chem. Int. Ed. published on the web.





タンパク質反応における揺らぎと動的分子間相互作用

(京大院理) 寺嶋正秀

Fluctuation and dynamical intermolecular interaction during protein reactions

(Kyoto Univ.) Masahide Terazima

【はじめに】生体の持つ生命機能の本質は、主にはタンパク質などの起こす効率的で選択的な、 タンパク質問相互作用を含めた「化学反応」と言える。このように生命にとって大切なタンパク 質であるが、その構造は「もろく」て、ちょっとした温度変化やpH変化で変わってしまい(変性)、 反応が起こらなくなる。なぜ大切な分子にもかかわらず自然はこのようにもろい分子を使ってい るのだろうか。また、タンパク質の化学反応は1つの分子で終わることなく、その情報がネット ワークのように次々と伝わり、多くの分子の反応を変えることで進行する。こうしたタンパク質 の化学反応やそれに続く信号伝達は、どのような要因でどのように起こっているのだろうか。こ うした本質的な疑問に答えることは、分子科学の役目であろう。これまでにも分子科学分野で開 発された多くの手法で生体分子反応機構の解明が続けられている。我々は、「隠された」ダイナミ クスを「大局的な」観点から明らかにするために、いくつかの新しい測定法を提出してきた。そ れは大きく分けて、時間分解熱力学法と、時間分解拡散係数測定法と呼べる。これらの方法を用 いると、従来の方法では検出できない中間体の存在やそのダイナミクスを解明でき、またこれま でにはわからなかった中間体の性質も明らかにができることがわかってきた。ここではそれらを 用いたタンパク質反応研究の成果の一端を紹介する。

【時間分解熱力学とその応用】 科学創世の基盤となった熱力学と時間分解分光学は長らくほぼ 分離された分野であったが、これを統合することで特に生体分子反応に対して多くの知見が得ら れることを示してきた。最近のその一つの例が、最初に示した疑問、「なぜ大切なタンパク質はも ろいのか」という問いに対しての答えであろう。我々は、機能に関係するタンパク質反応にはも ろさとほぼ同じ意味になる揺らぎが大切だと考え、それを実際の反応に対して証明することを試 みた。原理的に熱力学量は揺らぎと密接に関係している。例えば、等温圧縮率 kr は、体積 V が圧 力 P に対して変化する変化率 $\kappa_T = -(\partial V/\partial P)_T$ で定義され、体積揺らぎとは< $(V - (V))^2 >= RT\kappa_T$ (R は気体定数、T は絶対温度、 $\langle V \rangle$ は体積の平均量)の関係にある。つまり、圧縮率が大きいほ ど揺らぎが大きい。安定分子に対しては圧縮率(揺らぎ)が測定されてきたが、反応と揺らぎとの関 係を証明するために必要な、反応の最中に揺らぎがどうなっているのかを見ることはできなかっ た。安定分子に対して十分な時間をかけても測定が困難であったためである。これに対して、反応に伴う体積変化の圧力依存性を時間分解で測定するため、少量の希薄溶液で定量性のよい過渡 回折格子(TG)信号を圧力を変えて観測することのできる高圧セルの開発を行った。

ここで対象としたのは、生物の持つ青色光受容タンパク質のひとつである TePixD というタンパ ク質である。このタンパク質は単量体が5つつながって環状構造を作り、それが2つ重なり10量 体を形成して存在する。発色団の光励起によって、発色団周りの水素結合ネットワークが変わっ て、吸収スペクトルが赤色シフトする。その後は、吸収スペクトルに変化はないのだが、TG 法を 用いた研究により、40 マイクロ秒の時定数を持つ体積膨張過程(構造変化)と4 ミリ秒の時定数の 10 量体から5 量体への解離過程であることが明らかとなっていた。このような劇的な反応をする

TePixD であるが、円二色性スペクトルなどから観たその平均 構造は光励起によってもほとんど変化がなかった。構造変化 が見えないのに、なぜこんな大きな変化を示すのだろうか。そ こに揺らぎが隠されていると考えたのである。

体積変化を表す信号強度から反応分子と中間体の体積差を 求め、この量を種々の圧力(0.1~200 MPa)で測定した。その 結果、圧力増加とともに基底状態と比べた中間体の体積がよ り負になることがわかった。圧力をかけると基底状態に比べ て中間体の体積がより減少するということは、基底状態の圧 縮率より中間体の圧縮率のほうが大きいことを示している。



また次の中間体ではさらに大きくなっていた。これは反応中間体で揺らぎが大きくなっている初 めての証拠であろう。

さて、中間体の圧縮率が増加することがわかったが、この増大は実際に反応の駆動力になって いるのだろうか。このことを確かめるため光強度依存性の測定を行った。以前の研究により、10 量体のうちの2つの分子を励起すると、この解離反応が起こらなくなることがわかっていたので、 光強度を変えて圧力依存的な体積変化を調べた結果、光強度を増加して反応効率が減るとともに、 圧力に対する体積変化が減ってくることがわかった。この光強度依存性から、反応しない場合の 圧縮率変化を求めると、第1中間体においては基底状態よりも圧縮率が減っていることが分かっ た。すなわち、この結果は揺らぎが減るほど反応が起こらなくなることを示しており、中間体で 発生する「揺らぎ」がまさに反応を引き起こす駆動力であることを示している。この解明に伴い、 圧力で揺らぎをコントロールすることにより反応効率を変化させられることを示すこともできた。 鍵と鍵穴の関係から脱却した薬剤探求の指針にもなるかもしれない新しい方向性と考えている。

【時間分解拡散係数法】どうすればタンパク質の反応ネットワークのダイナミクスである分子間 相互作用の時間変化を検出することができるであろうか。その一つの提案が、分子拡散を時間分 解観測するということである。分子運動としての動きやすさは並進拡散係数で表される。拡散係 数は分子の大きさや粘度といった情報以外に、分子間相互作用についての情報を含み、非常に有 用である。この値を測定するには、分子の空間上での動きを測定しなければならないが、拡散の 動きは遅く、測定できるだけの距離を動くためにはかなり時間がかかる。よって、従来の方法で は、測定に数 10 分から数時間のオーダーで時間がかかるため、反応に伴う変化という概念はなか った。これに対して、TG 法を用いることで、マイクロ秒からミリ秒の時間スケールで拡散を観測 することができる。この手法により、拡散係数が圧倒的に速く測定できるというメリット以上に、 時間分解で刻々と変わる拡散係数が始めて測定可能となった。つまり、分子間相互作用の時間分 解検出法が可能となった。この手法をタンパク質反応に適用したいくつかの例を示す。

【謝辞】これらの研究は、研究室の中曽根助教や多くの学生、そして多くの共同研究者との成果 である。また、新学術領域研究「揺らぎと生体機能」、「動的秩序と機能」の補助を受けました。こ こに深く感謝いたします。