

ラマン分光法を用いたマウス受精卵発生過程モニタリングと卵質評価

関西学院大学 ○石垣 美歌, 橋本 剛佑, 尾崎 幸洋, 佐藤 英俊

In vivo monitoring of development of mouse embryo and its quality evaluation by Raman spectroscopy

Kwansei Gakuin University, ○Mika Ishigaki, Kosuke Hashimoto, Yukihiro Ozaki, Hidetoshi Sato

受精卵は分化全能性を持っているが、全てが生存可能なわけではなく、その生存可能性は受精卵の質に依ると言われている。そして養殖業や不妊治療など、受精卵が主体となる分野において、しばしばこの“受精卵の質”が重要な鍵となり、近年卵質に関する研究や受精卵の分子発生メカニズムに関する研究が盛んに行われている。

例えば現在、卵質は卵割の速度と形態によって卵質が評価されている。受精卵培養液から受精卵の代謝活性を間接的に評価する試みも多くなされているが、より直接的に受精卵の代謝活性を評価することができれば、より確実な情報を基に卵質を評価できると考えられる。

そこで、生体分析に適した分析技術であるラマン分光法を応用し、分子レベルでの構造の違いに基づいた分化発生メカニズムの分析や卵質評価の新たな判別手法構築に向けた基礎研究を行っている。マウス初期胚からラマンスペクトルを取得し、発生過程に伴う分子組成の変化や、受精卵の形態学的特徴と分子組成的特徴の関係について分析を行った。

まず受精卵発生過程のモニタリングでは、ICR 系統マウスの未受精卵・前核期・2細胞期・4細胞期・8細胞期の卵からラマンスペクトルを取得した。測定にはCO₂イ

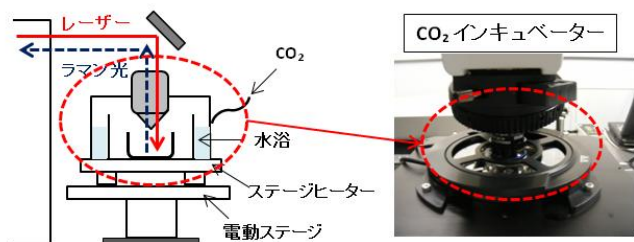


図1：顕微ラマンシステム

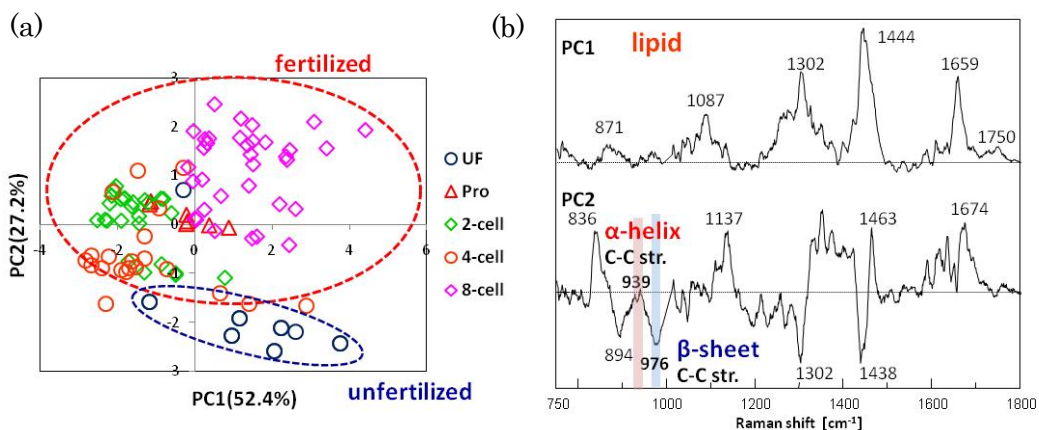


図2：主成分分析 (PCA) の解析結果。(a) スコアプロット, (b) ローディングプロット。

ンキュベータ搭載の顕微ラマンシステム(Nanofinder, 東京インスツルメンツ)を用い、温度 37°C, CO₂ 5% に設定してラマン測定を行った (図 1)。主成分分析(PCA) の結果、発生に伴ってタンパク質に対する脂質成分の相対濃度が周期的に変化し、受精の前後でタンパク質の 2 次構造に変化があることが示唆された(図 2)。

タンパク質の構造変化について詳細な解析を行うため、920-990 cm⁻¹ のスペクトルの 2 次微分を計算し、 α ヘリックスと β シートからくるラマンバンドへの分解とピーク位置の特定を行った (図 3 a)。その結果、受精後 β シートのバンド強度が小さくなり、一方 α ヘリックスのバンド強度が強くなっていることが分かった。つまり、受精卵の発生に伴って α ヘリックス 2 次構造の割合が多くなっていることが示唆された (図 3b)。

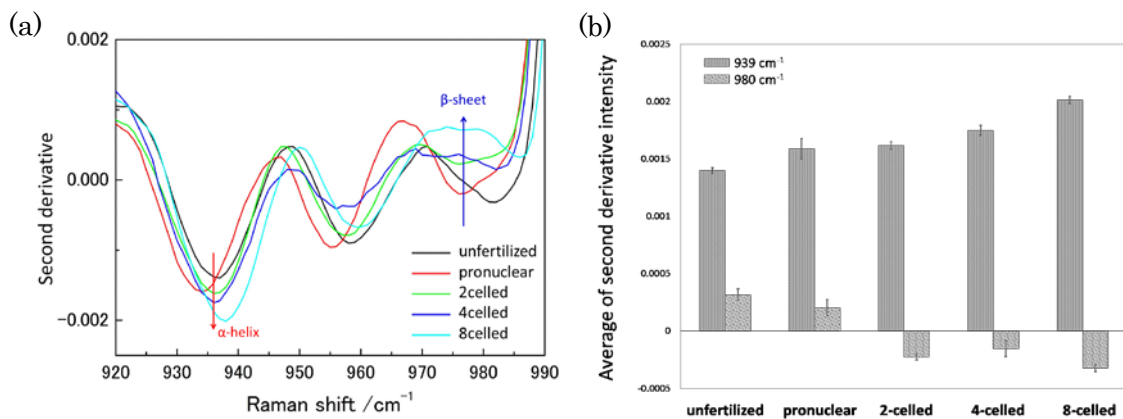


図 3 : (a) 2 次微分スペクトル, (b) 939, 980 cm⁻¹ の 2 次微分バンド強度の絶対値。

さらに、チロシンダブレットの強度比 (855/830 cm⁻¹) を各卵割段階で計算したところ、OH 基が初め強い水素結合をしていたものが、受精後一旦イオン状態を経由し、再び強い水素結合をしていることを示唆する結果が得られた。タンパク質の 2 次構造変化の結果と総合的に判断すると、受精後に開始された生命活動によりタンパク質が生成され、 α ヘリックス構造を持つタンパク質の割合が増加していったと考えられる。

また、形態学的に良質胚・不良胚と判断される卵の成分の違いを分析するため、主成分分析(PCA)を行った。その結果、両者は脂質のバンドをからなる主成分 1(PC 1)によって分けられることが分かり、不良胚で脂質の成分が、良質胚に比べて多くなっていることを示す結果も得られた(図 4, 図 5)。ラマン分光法の卵質評価への応用が期待される。

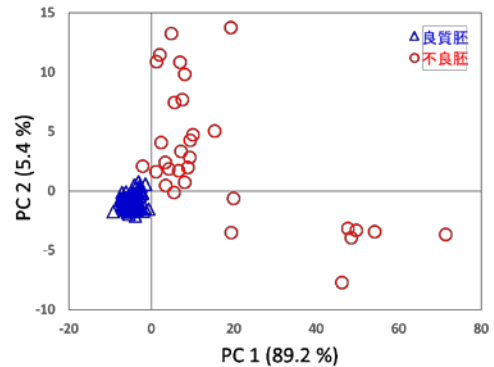


図 4: 良質胚・不良胚に対する PCA スコアプロットの結果。

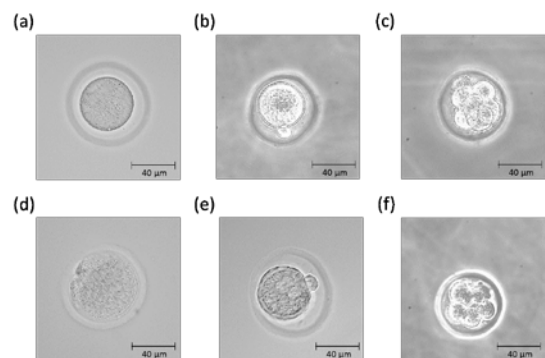


図 5 (a-c) 未受精卵・前核期・8 細胞期の良質胚と (d-f) 不良胚の一例。

赤色光センサータンパク質 Cph1 の pH 依存的な光反応

(京大院理*) ○武田公利*, 寺嶋正秀*

Study on pH-dependent photoreaction of red light sensor protein Cph1

(Kyoto Univ*) ○Kimitoshi Takeda*, Masahide Terazima*

【序】 Cyanobacterial Phytochrome (Cph1)は、シアノバクテリア(PCC6803)由来の赤色光センサータンパク質であり、走光性などの制御を行っていると考えられている。Cph1 は N 末端側に光受容ドメイン、C 末端側にキナーゼドメインを持つ。Cph1 は 2 つの安定な光状態(Pr 型、Pfr 型)を持ち、これらは赤色光と近赤外光によって可逆的に切り替わる(図 1)。この Pr⇌Pfr 反応における発色団の反応速度は pH に依存して変化することが報告されており[1]、Cph1 は pH センサーとしても機能することが示唆されている。しかし、タンパク質部分の構造変化に対する pH 効果は不明であるため、本研究では、Pr→Pfr 反応への pH 依存性を様々な分光法により詳細に調べ、Cph1 の pH センシング機構の解明を目指した。

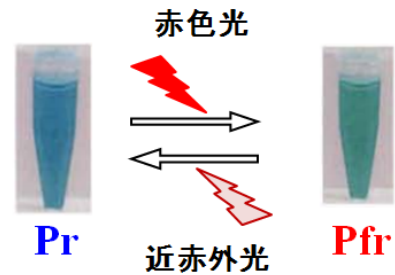


図1. Cph1の光反応

【実験】 本研究では Cph1 のキナーゼドメインを取り去った変異体(Cph1Δ)の光反応の pH 依存性の測定を行った。Cph1 は Pr 型、Pfr 型ともに二状態存在し、それらの酸解離定数はそれぞれ $pK_a(\text{Pr})=7.5$ 、 $pK_a(\text{Pfr})=9.2$ である。本研究では Pr 型に関して、どちらか一方の光反応を選択的に検出するために、pH6.5 と pH8.8 のバッファー条件で測定を行った。Cph1 の光反応には多くの中間体が存在する。そこで光反応ダイナミクスの測定には過渡吸収法(TrA 法)、過渡レンズ法(TrL 法)、過渡回折格子法(TG 法)を用いた。TrA 法ではサンプルの吸収スペクトル変化が検出でき、TrL 法ではサンプルの屈折率変化の検出ができる。屈折率変化は吸収変化に加え、励起分子の体積変化にも依存する。したがって、TrA 法と TrL 法の結果を比較することによって、吸収スペクトル変化と体積変化の判別が可能になる。さらに TG 法では屈折率変化に加え、拡散係数変化(D 変化)の測定ができるため、タンパク質全体の構造変化のダイナミクスを明らかにできる。

【結果】 TrA 法、TrL 法の測定結果**pH6.5 における光反応ダイナミクス**

図 2、3 に TrA 法、TrL 法で得られた信号を示す。解析の結果、3 成分の反応が観測され、その時定数は両手法で同じであった。このことから、これらの反応は発色団(PCB)周辺で起こっているとわかった。反応の時定数は $370\mu\text{s}$ 、

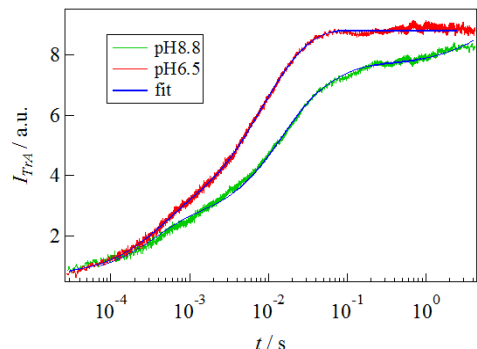


図2.TrA法で得られた信号

5.0ms、15.8ms であった。

pH8.8における光反応ダイナミクス

pH8.8についても同様の測定を行った(図2、3)。解析の結果、pH8.8においては4成分の反応が観測されたが、それぞれの時定数はTrA法、TrL法を用いた測定で一致したことから、PCB周辺の変化であることが分かった。その値は340 μ s、12.8ms、56ms、7.0sであった。

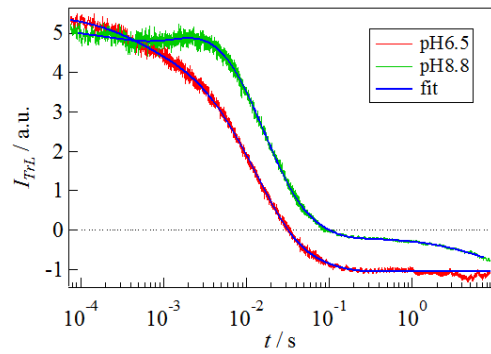


図3.TrL法で得られた信号

TG 測定の結果

図4にpH6.5、pH8.8のTG信号を示す。それぞれの測定で拡散係数が変化する様子が観測された。pH6.5について、格子波数を変えて測定を行い、拡散信号の時間発展を三状態モデルにより解析した結果、*D*変化の時定数は5.3msと43.4msであった。また、さらに早い時間でも*D*変化が起きていることが分かった。これらの時定数は、PCB周辺で起こる反応の速度と近い値であることから、PCB周辺の変化によって引き起こされる構造変化であると考えている。

pH8.8に関しても同様に測定を行った結果、複雑なTG信号が得られた(図4右)。こちらに関しては現在解析中である。

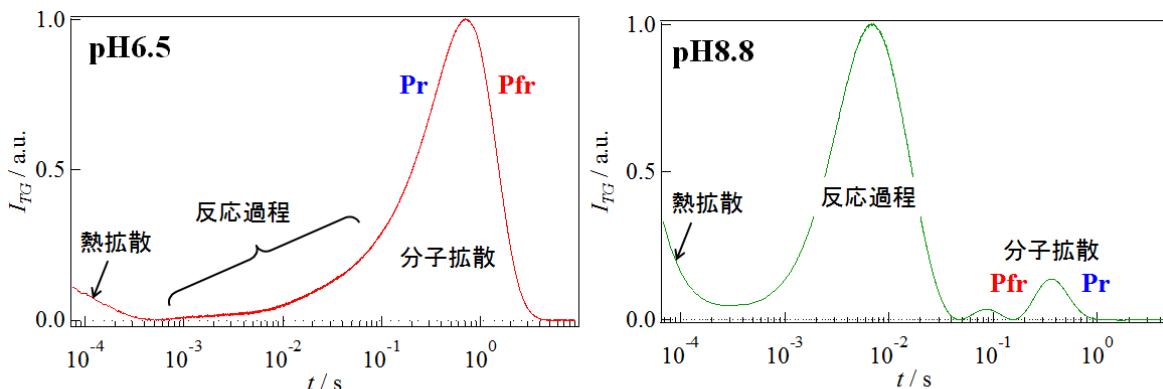


図4.TG法で得られた信号(左:pH6.5、右:pH8.8)

【考察】 本研究から Cph1 では、pH 依存的に異なる光反応ダイナミクスをとることが分かった(図5)。pH6.5に関しては、PCB周辺の変化が起き、それにより、タンパク質の構造変化が起きていることが分かった。pH8.8に関しては、

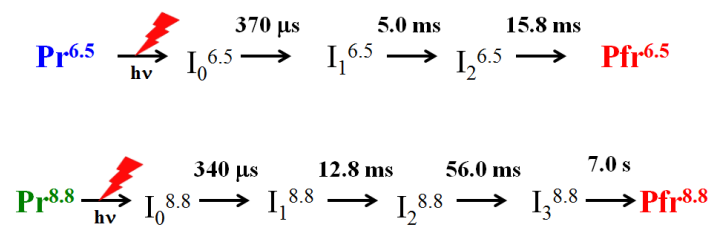


図5. Cph1の発色団周辺のpH依存的な光反応

PCB周辺の変化のダイナミクスは分かったが、それによるタンパク質の構造変化のダイナミクスに関しては現在解析中である。本討論会では、*D*変化のダイナミクスを明らかにし、タンパク質の全体構造におけるダイナミクスの違いについても議論する。

[1] van Thor JJ et al. Biochemistry 2001, 40(38): 11460-11471

青色光センサー全長フォトトロピンの光反応

(京大院理¹、慶應義塾大院工²、大阪府立大院理³) 中曽根祐介¹、岡島公司²、
相原悠介¹、長谷あきら¹、徳富哲³、寺嶋正秀¹

Time-resolved detection of conformational changes of full-length phototropin

(Kyoto Univ.¹, Keio Univ.², Osaka Prefecture Univ.³) Yusuke Nakasone¹, Koji Okajima²,
Yusuke Aihara¹, Akira Nagatani¹, Satoru Tokutomi³, Masahide Terazima¹

【序】フォトトロピンは植物や緑藻由来の青色光センサー蛋白質であり、植物では光屈性や葉緑体の運動を制御し、緑藻においては有性生殖の促進や遺伝子の転写制御を光依存的に行う。その一次構造として N 末端に二つの光受容ドメイン (LOV1, LOV2) を、C 末端に kinase ドメインを持つ (図 1a)。LOV1, LOV2 は構造の類似性が高いが (図 1b, c)、その生理学的役割は大きく異なり、LOV2 ドメインが kinase の活性

制御を主に担う一方、LOV1 は光感度の調節を担うと考えられている。

我々はこれまで、その分子機構を明らかにすべく、単離した LOV ドメインの光反応検出を行ってきた [1]。植物由来のフォトトロピンでは LOV2 ドメインの C 末端に位置

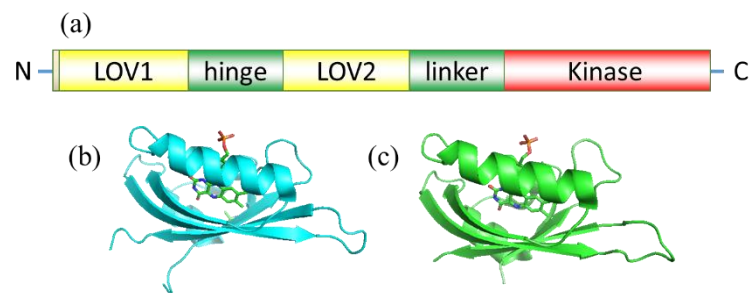


図1 フォトトロピンの一次構造(a)とLOV1(b), LOV2(c)の立体構造

するヘリックスの崩壊過程が光励起後 1 ms で起こり、LOV1 ドメインはその会合状態が光依存的に変化することを明らかにした。これらはそれぞれ kinase ドメインの活性化、光感度の調節に重要な反応と考えられる。一方、緑藻クラミドモナス由来のフォトトロピンでは LOV2 ドメイン周りの構造変化は誘起されず、LOV1 ドメインの C 末端ヘリックスが崩壊するという結果が得られており、生物種間で光受容ドメインの反応に多様性があることを見出してきた。これらの結果を基に kinase の活性化モデルを提唱しているが、全長タンパク質の回収・測定が困難であったため、直接 kinase の活性化反応を時間分解検出できていない。しかし近年、我々は緑藻クラミドモナスおよび緑藻オストレオコッカス由来の全長フォトトロピンの回収に成功したため、本研究ではその反応検出に取り組み、全長タンパク質の光反応を解明することを目指した。

【実験】大腸菌系でクラミドモナス、オストレオコッカス由来の全長フォトトロピンの回収を行った。その際、LOV1 あるいは LOV2 の反応を阻害した変異体 (反応初期過程に必須なシステイン残基をアラニンに置換した C/A ミュータント) や kinase ドメインを切り取った試料の作製も行い、野生型フォトトロピンとの比較を行った。反応検出には主に過渡回折格子 (Transient Grating = TG) 法を用い (励起波長: 465 nm、プローブ波長: 840 nm)、体積変化や拡散係数変化という観

点から分子全体の光反応検出を行った。

【結果】クラミドモナス由来の全長フォトトロピンを光励起して得られた TG 信号を図 2 に示す。発色団近傍の構造変化に起因する信号 (~ 800 ns) と、励起分子から放出された熱の拡散信号が、比較的早い時間スケールで観測された。その後の立ち上がり信号と減衰信号はそれぞれ反応物、生成物の分子拡散信号と同定された (光反応において拡散係数が減少する)。格子波数を変え、拡散信号の時間発展を解析することで、蛋白質全体の構造変化が約 200 ms で起こることがわかった。

また濃度を変えた測定や CD 測定により、タンパク質間のダイマー化反応およびヘリックスの崩壊反応が拡散係数変化の主な要因であることを明らかにした。さらに、LOV1 あるいは LOV2 ドメインの反応を阻害したミュータントで同様の測定を行ったところ、LOV1 の反応を阻害したときのみ、タンパク質全体の反応が抑制されることがわかった。この結果

は、LOV1 が全長タンパク質で観測された拡散係数変化に重要であり、LOV1 の C 末端ヘリックスの崩壊反応が保存されていることを示唆している。さらに kinase ドメインを除いた試料を測定したところ、全長タンパク質に比べて拡散係数の変化量が減少したことから、kinase ドメインも構造変化を起こすことがわかった。

次にオストレオコッカス由来のフォトトロピンの TG 信号を図 3 に示す。共有結合形成、熱拡散、分子拡散信号が観測され、拡散係数変化を伴う反応が光誘起されることが分かった。しかし、LOV1 の反応を阻害しても (C66A ミュータント)、反応への影響は限定的であったことから、オストレオコッカス由来のフォトトロピンでは、LOV2 がその反応を支配的に制御していることがわかった。また linker および kinase を取り除くと、拡散係数変化が観測されなくなることから、linker および kinase 領域で大きな構造変化が光誘起されることも明らかにした。

討論会ではこれらの結果を基に、発色団近傍のわずかな動きがタンパク質全体の構造変化を引き起こし、kinase の活性化に至る過程を議論する。その際、生物種間で光反応に多様性が生じる要因についてもタンパク質構造などを基に考察する。

[1] M. Terazima. *Biochim Biophys Acta*, 1814: 1093, 2011.

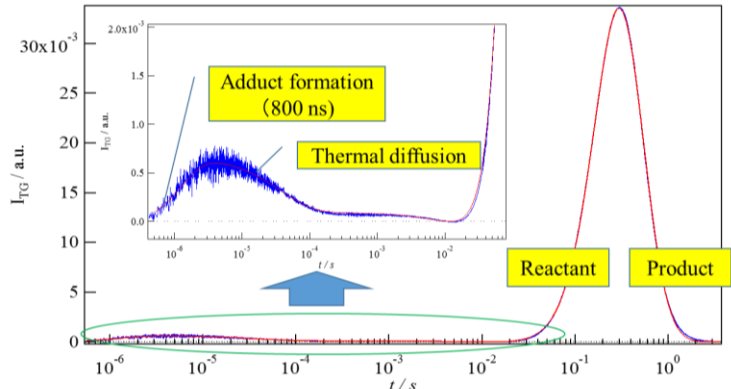


図2 クラミドモナス由来のフォトトロピンのTG信号

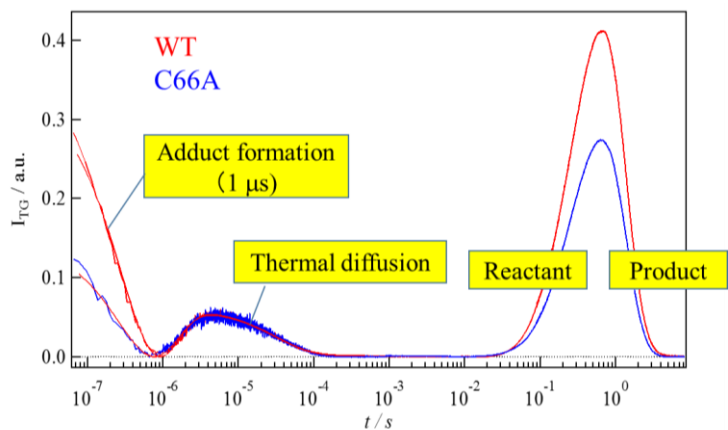


図3 オストレオコッカス由来のフォトトロピンのTG信号

光駆動ナトリウムポンプロドプシンの イオン輸送メカニズムの解明と新規機能性分子創成

(名古屋工業大学, JST・さきがけ) ○井上 圭一

The Study on the Ion-transport Mechanism of Light-driven Sodium Pump Rhodopsin and the Creation of New Functional Molecules

(Nagoya Inst. Tech., JST・PRESTO) ○Keiichi Inoue

【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ち、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いる。そして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(図1)。中でも最も早くに発見され、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) や内向き Cl⁻ポンプのハロロドプシン (HR) である。これに加え近年では、電気化学勾配に従って、双方向にイオンの輸送が可能な光開閉式のカチオンチャネルやアニオンチャネルなどが報告されている。

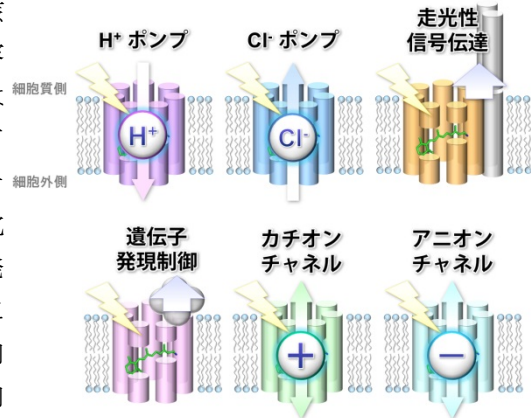


図1. 様々な微生物型ロドプシン

【光駆動 Na⁺ポンプロドプシン】その中で我々は東京湾に棲む海洋性細菌の一種である、*Krokinobacter eikastus* の持つロドプシン (KR2) が、それまでに報告されたものと大きく異なるアミノ酸配列を持つことに注目した。特に H⁺ポンプ型ロドプシンの持つ、レチナール Schiff 塩基への H⁺アクセプターおよび H⁺ドナーとして働く二つの酸性アミノ酸残基が Asn と Gln に置換され (KR2 Asn112, Gln123)、H⁺の解離が起これなくなっている一方で、その間のレチナールに近い位置に新たなアスパラギン酸 (Asp116) を持つという他には無い特徴を有していた。そこでこの KR2 の機能を調べるため、タンパク質を大腸菌に発現させ、光を照射したところ、細胞外の pH が大きく上昇した。ここへ細胞膜の膜透過性を上昇させる CCCP を加えたところ、その変化が大きくなり、一方で細胞内膜電位を TPP⁺で消失させると光依存的な pH 変化が見られなくなった(図2)。この結果は光依存的な pH の上昇が、KR2 による H⁺以外のイオンを輸送することによって引き起こされる膜電位変化を打ち消すための、二次的な H⁺移動によるものであることを示唆している。またさらに溶液中のアニオンを変化させても、得られる信号に変化は見られなかったが、Na⁺を K⁺以上のサイズを持つカチオンに置き換えたところ、光照射とともに pH の低下が見られ、さらに CCCP でその変化が消失するという結果になった。従ってこの活性のカチオンのサイズ依存性から、KR2 は生理学的条件下では光で Na⁺を細胞外側へ輸送する、光駆動型の Na⁺ポンプであり、Na⁺が存在しない場合代わりに H⁺を輸送する興味深い性質を持つ分子であることが明らかとなった [1]。

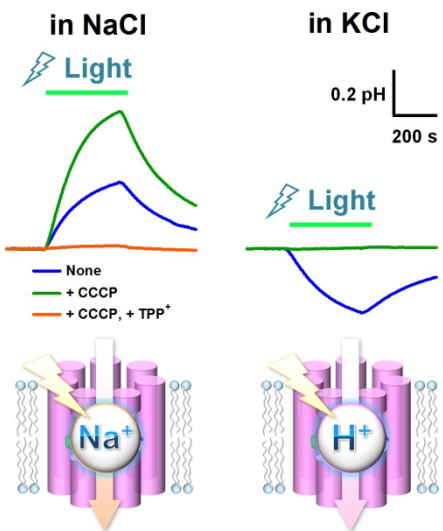


図2. KR2 のイオン輸送機能

【Na⁺ポンプロドプシンのイオン輸送メカニズム】大腸菌を用いた実験により、KR2がNa⁺ポンプであることが示されたが、その輸送機構については発見当初から大きな問題があった。即ち微生物型ロドプシンのレチナールはタンパク質部分とH⁺化 Schiff 塩基を介して結合するが、その正電荷をどのようにしてNa⁺が乗り越えて、タンパク質中を輸送されるのか上記の実験では説明することができない。そこで過渡吸収測定を行い、KR2の光反応を調べたところ、まずレチナールが13-cis型へと光異性化し[2]、それに続いてSchiff塩基のプロトンがAsp116へと移動することが示された[1, 3, 4]。さらにより詳細な構造情報を得るため、東京大学・濡木グループとの共同研究を通じてX線結晶構造解析を行ったところ、H⁺化したAsp116はその側鎖の配向をSchiff塩基側から変化させ、Ser70やAsn112と水素結合を形成し、細胞質側からのNa⁺の取込み経路を開くことが示唆された[5]。実際にアミノ酸変異によってSer70やAsn112の水素結合を阻害すると、Na⁺輸送活性が消失することから、レチナールからのH⁺移動とAsp116の配向の変化がNa⁺輸送に重要であることが分かり、これによって当初から問題となっていたH⁺化Schiff塩基をどのように乗り越えNa⁺が輸送されるのか、その主要なメカニズムが明らかとなった(図3)。

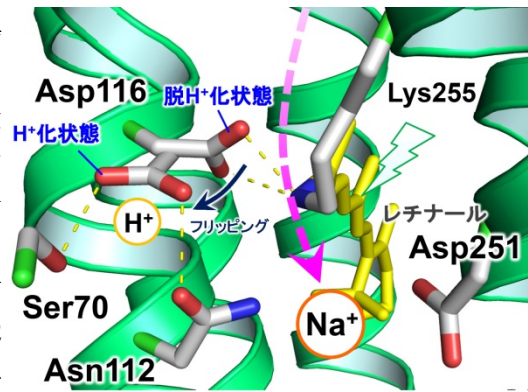


図3. Na⁺ポンプロドプシンのイオン輸送メカニズム

【Na⁺ポンプロドプシンを用いた新規機能性分子デザイン】我々はさらに結晶構造を詳しく解析したところ、細胞質側にNa⁺取入口と思われる空隙構造が存在することが明らかとなった(図4)。この空隙にはAsn61とGly263から形作るボトルネック構造があり、この二つの残基に変異を導入したところ、野生型のKR2では見られなかったK⁺やCs⁺といった大きなカチオンの輸送が可能な変異体の作製に成功した(図4)[5, 6]。これらについては今後オプトジェネティクスなどでの幅広い応用が期待される。

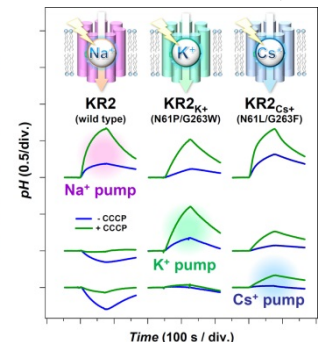
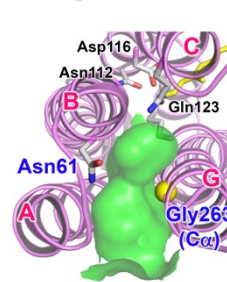


図4. 細胞質側イオン取入口(左)とK⁺およびCs⁺ポンプの作製(右)

現在ゲノム研究の進歩により多様な生物から新奇なロドプシンが次々と発見されているが、今回の結果はその理解に分子科学的なアプローチが重要であることを示すものであり、さらにその知見をもとに分子改変を行うことで、より多様な分子ツールの開発が実現すると期待される。

【謝辞】本研究は大変多くの共同研究者のご協力のもと実現することができました。とりわけ、名古屋工業大学・神取秀樹教授、吉住玲博士、今野雅恵博士、加藤善隆博士、大野光さん、東京大学・濡木理教授、石谷隆一郎准教授、加藤英明博士(現スタンフォード大)、木暮一啓教授、吉澤晋博士、飯野雄一教授、東北大学・八尾寛教授、細島頌子博士(現名工大)の皆様には実験や解析、議論など様々な面で多大なご尽力をさせていただき、この場を借りて、深く御礼申し上げます。

【参考文献】

- [1] K. Inoue, H. Ono, R. Abe-Yoshizumi, S. Yoshizawa, H. Ito, K. Kogure, H. Kandori* *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1678.
- [2] H. Ono, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, H. Kandori* *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4784-4792.
- [3] K. Inoue, M. Konno, R. Abe-Yoshizumi, H. Kandori* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11536-11539.
- [4] Y. Kato, K. Inoue, H. Kandori* *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 5111-5115.
- [5] H. E. Kato, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, Y. Kato, H. Ono, M. Konno, T. Ishizuka, M. Razuanul Hoque, S. Hososhima, H. Kunitomo, J. Ito, S. Yoshizawa, K. Yamashita, M. Takemoto, T. Nishizawa, R. Taniguchi, K. Kogure, A. D. Maturana, Y. Iino, H. Yawo, R. Ishitani, H. Kandori*, O. Nureki* *Nature* **2015**, *521*, 48-53.
- [6] M. Konno, Y. Kato, H. Kato, K. Inoue, O. Nureki, H. Kandori* *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 51-55.

3F08

広帯域誘電分光を用いた紫膜ダイナミクスの観測；サブ GHz-THz 領域における水和および温度依存性の評価

(¹神大・理、²名工大・工、³神大・分子フォト) ○山本直樹¹、伊藤奨太²、茶谷絵理¹、神取秀樹²、富永圭介^{1, 3}

Broadband Dielectric Spectroscopy on Purple Membrane; Temperature and Hydration dependence from Sub-GHz to THz region

(¹Grad. School of Sci., Kobe Univ, ²Grad. School of Engin., Nagoya Institute of Tech., ³Molecular Photoscience Research Center, Kobe Univ.) ○Naoki Yamamoto¹, Shota Ito², Eri Chatani¹, Hideki Kandori², Keisuke Tominaga^{1,3}

【序】 紫膜は高度好塩菌より抽出される、膜タンパク質バクテリオロドプシンと脂質の複合体である。バクテリオロドプシンは分子内にレチナールを保持し、光照射によるレチナール異性化に伴ってプロトンポンプを行う機能を持つ。プロトンポンプ能は紫膜の水和および温度依存的に発現されることが知られており [1]、水和によるバクテリオロドプシンのダイナミクスの熱的活性化、および機能発現との関連性について興味を持たれてきた。水和水はタンパク質表面と水素結合等の相互作用を介して結合し、熱エネルギーによって絶えず揺らいでいるが、そのようなダイナミクスはギガヘルツ (GHz) -テラヘルツ (THz) 領域の回転緩和や分子間振動に反映される。これらのダイナミクスと水和量および熱エネルギーの関係性を理解することは、水和と機能の関係性を明らかにする上で重要である。そこで本研究では、広帯域誘電緩和分光を用いてサブ GHz-THz 領域の複素誘電率スペクトルについて、水和量および温度依存性を評価した。

【実験】 高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の培養液より水溶液に溶解した紫膜を得た。この水溶液を真空状態で乾燥させたものを粉末状にすりつぶし、錠剤成形器によりペレット状にしたものを分光測定に用いた。0.5-20 GHz 領域の測定には、ベクトルネットワークアナライザを用い、0.3-2.0 THz 領域の測定には THz-TDS を用いた。0.5-20 GHz 領域は 293 K、0.3-1.8 THz 領域は 83-293 K の範囲で温度を変化させた。試料の水和量は、各種塩の飽和水溶液、あるいは純水により蒸気圧を制御した空間に、固体ペレットを任意時間静置することにより調節した。乾燥紫膜に対する水の質量比を水和量、 h として評価した。

【結果と考察】 図 1 に室温 (293 K) における 0.5 GHz-1.8 THz 領域の複素誘電率スペクトルを示す。脱水和状態 ($h = 0.05$) では THz 領域のみに吸収成分が見られる一方、水和すると ($h = 0.30$) GHz 領域に顕著な吸収成分が出現する。球状タンパク質リゾチームを用いた先行研究 [2] からの類推より、脱水和状態における THz 領域の吸収成分は紫膜の低振動運動であり、水和する事で出現する GHz 領域の吸収成分は水和水とタンパク質の動きがカップルした緩和であると考えられる。スペクトル成分の定量的評価を行うために、以下のモデル

関数を用いて、スペクトル解析をおこなった。

$$\varepsilon^*(\nu) = \frac{\sigma_0}{i2\pi\nu\varepsilon_0} + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + (i2\pi\nu\tau)^\beta} + \sum_{k=1}^2 \frac{A_k}{\nu_k^2 - \nu^2 + i\nu\gamma_k} + \varepsilon_{\text{inf}}$$

ここで、右辺の第1項は電気伝導の効果(σ は定数)、第2項は緩和成分($\Delta\varepsilon$, τ , β はそれぞれ強度、緩和時間、およびブロードニング因子を表す)、第3項はテラヘルツ領域の振動成分(A_k , ν_k , γ_k はそれぞれ強度、中心周波数、および摩擦項を表す)、第4項は周波数無限大での定数項をそれぞれ表す。図1に示すように、脱水和状態は

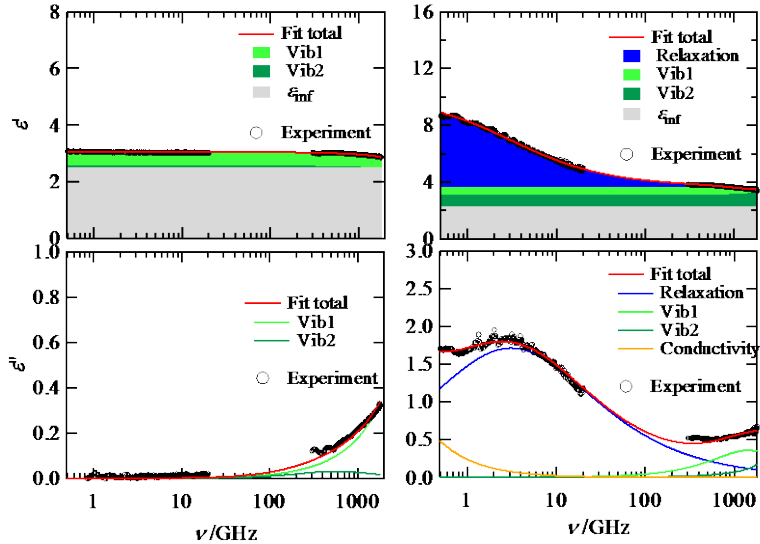


図1. 脱水和状態 ($h=0.05$, 左)、および水合状態 ($h=0.30$, 右)の広帯域複素誘電率スペクトル

2個の振動成分のみで再現できたが、水合状態では顕著な緩和成分が存在し、かつ THz 領域に大きく侵入していることがわかった。293 Kでの解析結果をふまえて THz 領域での温度依存性複素誘電率スペクトルを評価したところ、緩和成分の時定数がアレニウスの振る舞いを示しながら短くなり、約 233 Kより THz 領域へ顕著に侵入し始めることがわかった (図2)。この結果より、GHz-THz 領域でのスペクトル温度依存性変化は、緩和成分による寄与が支配的であることが、リゾチームの場合と同様に示唆された。また、 h の値が大きい場合において、THz 帯のスペクトルに“温度ヒステリシス”が観測されたので、その分子論的解釈についても議論する予定である。

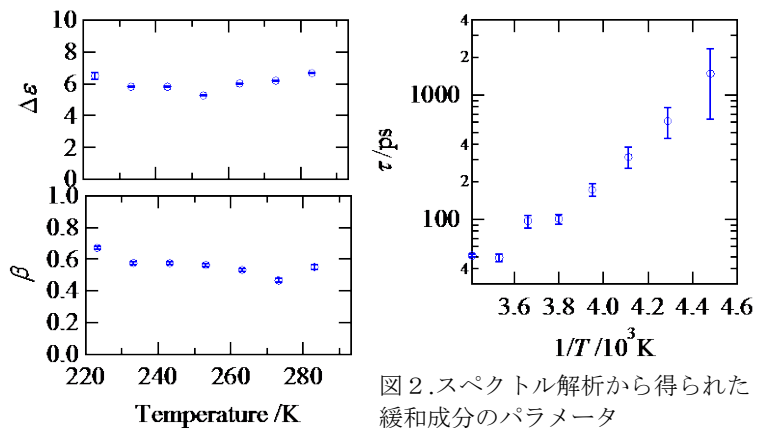


図2. スペクトル解析から得られた緩和成分のパラメータ

[参考文献]

1. Varo, G., et al., *Biophys. J.*, **43**, 47-51 (1983).
2. Yamamoto, N. et al., *J. Phys. Chem. B*, 120(21), 4743-4755 (2016)
3. 山本直樹ら, 第43回生体分子科学討論会要旨集

3F09

新規蛍光相関分光法に基づく生体膜中分子の拡散計測に向けた 観測サイズ補正法の開発

(埼玉大院理工) ○乙須拓洋, 山口祥一

Calibration of the observation area for the accurate diffusion analysis on lipid membranes by novel fluorescence correlation spectroscopy

(Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.) ○Takuhiro Otsu and Shoichi Yamaguchi

【序】生体膜はリン脂質からなる脂質二重膜中に膜蛋白質やコレステロールといった様々な分子が埋め込まれた非常に複雑な二次元膜である。さらに生体膜は蛋白質繊維によって形成された網目構造(細胞骨格)によって下支えされているため、溶液中とは異なり空間的に非常に不均一な場となっている。そのように不均一な生体膜中を拡散する分子の見かけの拡散係数は、計測を行う空間分解能に依存することが過去の報告により示唆されている¹。拡散係数の空間分解能依存性は、生体膜の構造特性(網目構造の大きさ等)を理解するための重要な情報を提供することから、異なる空間分解能での拡散係数の計測が強く求められている。その点に関して我々は最近、生体膜中分子の拡散係数を計測するための新たな手法として、エバネッセント波の干渉により発生する定在エバネッセント波を励起光として用いる蛍光相関分光法(SEW-FCS)の開発を行った。本手法の利点は定在エバネッセント波励起を行うことで干渉縞一本の幅(w_{fringe})と観測領域全体の幅(w_{whole})に対応する二つの空間分解能で拡散係数の同時計測が可能となる点にある。しかしながら、 w_{fringe} は励起光の入射角より容易に決定できる一方で w_{whole} は様々な要因に影響を受けるため、正確な拡散係数の算出には w_{whole} に対する補正が必要となる。そこで本研究では測定で得られる自己相関関数を参照することによる観測サイズ補正法の開発を行った。

【実験】試料にはガラス基板上に作製した平面脂質二重膜である支持脂質二重膜を用いた。本研究では拡散係数が空間分解能に依存しないと報告されている DOPC 支持脂質二重膜を用い、蛍光脂質を少量加えることで拡散係数の計測を行った²。装置の概略図を図 1 に示す。532 nm の励起光をビームスプリッターで均等に二つに分けたのち、対物レンズの辺縁部にそれぞれ入射した。対物レンズから出た二つの励起光はカバーガラス表面の同位置で全反射するため、エバネッセント波は干渉し定在エバネッセント波が発生する。試料から発せられる蛍光は同対物レンズで収集したのちアバランシェフォトダイオード (SPAD) で検出し、検出された各蛍光光子の到着時間をもとに自己相関関数を算出した。

定在波励起により得られる自己相関関数の理論式は既に報告されている³。本研究では理論式を改良した以下の式を用いてフィッティングを行った。

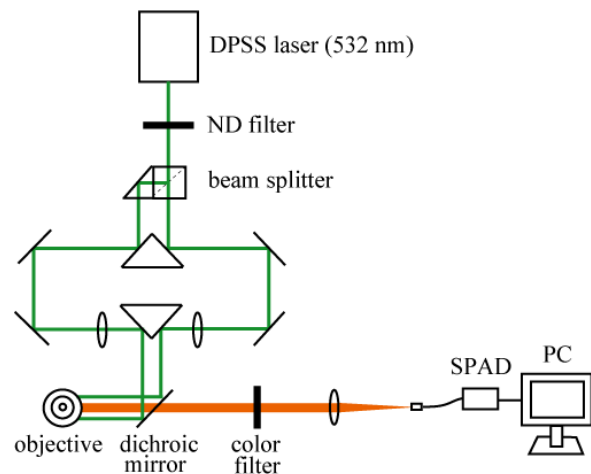


図 1 : SEW-FCS 装置の概略図

$$G(\Delta T) = A + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \Delta T / \tau_{D1}} \right) \left\{ 0.5\alpha \exp\left(-\Delta T / \tau_{D2}\right) + 1 \right\}, \quad \tau_{D1} = w_{\text{whole}}^2 / 4D_1, \quad \tau_{D2} = w_{\text{fringe}}^2 / 4D_2.$$

式中 N は観測領域内の平均分子数, τ_{D1}, τ_{D2} はそれぞれ観測領域または干渉縞一本を通過するためにかかる時間(拡散時間)であり, それぞれの空間分解能から見かけの拡散係数(D_1, D_2)を算出することができる. α は干渉縞のコントラストによって決定される係数であり, 測定点における両エバネッセント波の強度が等しければコントラスト最大で $\alpha = 1$ となり, 強度差があれば $\alpha < 1$ となる.

【結果と考察】測定対象である脂質二重膜は厚さが ~ 5 nm の平面膜であるため, w_{whole} は深さ方向のずれに非常に敏感であることが予想される. そこで, 深さ方向(z 方向)のずれが測定結果に与える影響について検討すべく, z を変えながら自己相関関数の測定を行った. 図 2 には異なる z で得られた自己相関関数を示している. 相関振幅が最大(N が最小)となった点を $z = 0$ とした. 焦点面と試料面が一致しているとき($z = 0$)は τ_{D1}, τ_{D2} に対応する二つの相関減衰がはっきりと確認できる一方で, 試料面からのずれに従って α に対応する干渉縞由来 (τ_{D2} 成分)の相関振幅が減少していく様子が確認された. 図 3 には自己相関関数のフィッティングにより得られた結果を示している. 予想された通り z が試料面からずれるに従い (w_{whole} が大きくなるに従い) τ_{D1}, N は大きくなった. また, 図 2 に見られたように α は z に依存することが確認された. この α の z 依存性は, 試料面(\approx ガラス表面)からのずれに応じて二つのエバネッセント波の重なりがずれることにより, 干渉縞のコントラストが低下したことに起因していると考えられる.

本測定に用いた試料には先述のように拡散係数の空間分解能依存性はない($D_1 = D_2$)ので, w_{fringe} と τ_{D2} から算出される D_2 と τ_{D1} をもとにして w_{whole} (の z 依存性)を見積もることが可能となる. しかしながら, 拡散係数の空間分解能依存性が期待される別の試料に対して, すでに見積もられた w_{whole} を用いて解析を行うためには, 再び図 3 に対応するデータを取得して z の原点を決定するという冗長な作業が必要となる. そこで本研究では α の z 依存性に着目し, α を参照することによる迅速で簡便な観測サイズ補正法について報告を行う.

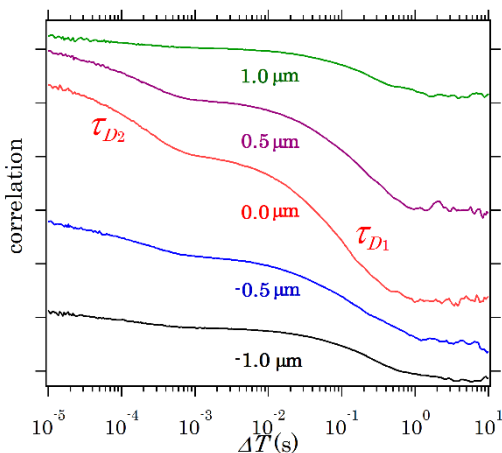


図 2 : 異なる z での自己相関関数

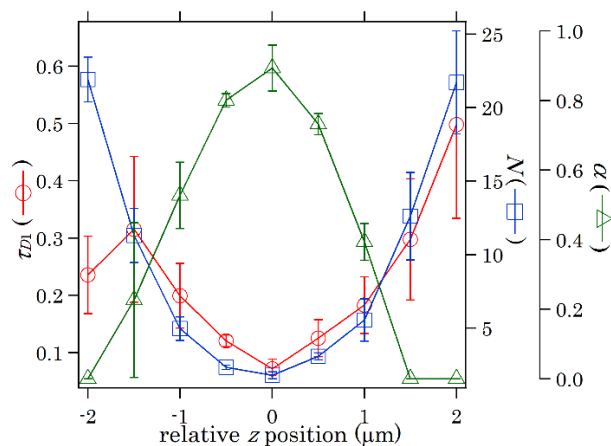


図 3 : τ_{D1}, N, α の z 依存性

【参考文献】

1. Wawrezynieck et al., (2005) *Biophys. J.*, **89**, 4029-4042.
2. Vicidomini et al., (2015) *Nano Lett.*, **15**, 5912-5918.
3. H. Asai, and T. Ando (1976) *J. Phys. Soc. Japan*, **40**, 1527.

3F10

肝臓細胞膜を模した脂質二重層膜の全原子分子動力学計算

(名大院工計算科学連携教育研究センター¹, 名大院工²) ○安藤嘉倫¹, 青木則之², 岡崎進^{1,2}

Molecular dynamics study of lipid bilayers modeling the plasma membranes of mouse hepatocytes and hepatomas

(CCS, Nagoya Univ.¹, Nagoya Univ.²) ○Yoshimichi Andoh, Noriyuki Aoki, and Susumu Okazaki

【序】細胞膜は両親媒性のリン脂質分子が水相中で自発的に形成する脂質二重層膜を基としている。本研究では細胞膜の物性を分子レベルから理解することを目的に、実際のマウス正常肝臓細胞および癌化細胞についてその細胞膜脂質組成を忠実に再現した混成脂質二重層膜を構築し、静水圧 P 温度 T 一定条件下で 300 ns の MD 計算を行った^[1]。以前に行ったマウス胸腺細胞およびその癌化細胞の細胞膜を模したモデル二重層膜についての MD 計算結果^[2]との比較についても行い、癌化による膜物性変化およびその細胞種依存性について考察した。

【計算方法】モデル二重層膜はコレステロール(CH)とリン脂質(PL)とのモル比の実験値^[3]を満たし、ホスファチジルコリン(PC), ホスファチジルエタノールアミン(PE), ホスファチジルセリン(PS), ホスファチジルイノシトール(PI), スフィンゴミエリン (SM), リゾ PC およびリゾ PS の組成比を実験値と同じとした。ここで PS および PI は一価のアニオン脂質である。その上でさらにアシル鎖脂肪酸の不飽和度および割合についても実験値を再現できるものとした(表 1 参照)。脂質組成を単層膜間で対称として、正常および癌化のモデル膜について二重層膜内での各脂質種の位置をランダムにとることで 3 通りの初期配置を用意した。原子数 N , $P = 1 \text{ atm}$, $T = 310.15 \text{ K}$ の条件下で 300 ns の MD 計算を行った。分子間相互作用を記述するポテンシャルモデルとして脂質分子には CHARMM36 を水分子には TIP3P を選んだ。Lennard-Jones 相互作用を 12 \AA でカットオフ ($8\text{-}12\text{ \AA}$ に switching 関数を適用) する一方、長距離 Coulomb 相互作用は PME 法により計算した。数値積分に RESPA 法、水素原子を含む化学結合長に拘束条件を取り入れることで時間刻み Δt を 2 fs とした

表 1：正常および癌化肝臓細胞膜を模擬した二重層膜の脂質組成。脂質分子数は単層あたり 64 個。計算系は水分子 6400 個、およびカウンターイオン Na^+ を含む (系の総電荷は 0)。丸括弧内は実験値^[3]。

System	CH/PL molar ratio	Mol% of fatty acid chain of PL		
		Saturated	Mono unsaturated	Poly unsaturated
Hepatocyte (正常)	0.78 (0.80)	57.6 (62.1)	11.9 (11.3)	30.5 (26.6)
Hepatoma (癌化)	1.0 (1.0)	52.7 (58.7)	12.7 (11.8)	34.6 (29.5)

表 2 : 250 ns 間の膜面積 S , 膜厚 h_l , 膜体積 V_l の平均値. χ_T^S は等温面積圧縮率.

System	$S / 10^3 \text{ \AA}^2$	$h_l / \text{ \AA}$	$V_l / 10^5 \text{ \AA}^3$	$\chi_T^S / \text{ m}^2\text{J}^{-1}$
Hepatocyte (正常)	2.73±0.01	41.6±0.1	1.14±0.01	1.7±0.3
Hepatoma (癌化)	2.68±0.01	40.6±0.1	1.09±0.01	1.2±0.1

【結果と考察】NPTアンサンブルでの50 nsの計算ののち膜面積および膜厚が平衡値に収束したことを確認し、つづく250 nsのトラジェクトリーを解析対象とした. 表2にあるように膜面積 S の平均値は癌化膜において2%減少し, S の揺らぎから計算される等温面積圧縮率 χ_T^S についても30%低下した. すなわち肝臓癌細胞膜モデルは側方向に収縮したより固い膜であるといえる. これら結果は先行研究^[2]での胸腺細胞癌化モデル膜の側方向への膨張および軟化と対照的であった. 図1に示す膜垂直方向(z 軸)に沿ったアシル鎖尾部C-Hボンドのオーダーパラメータプロファイル $S_{\text{CH}}(z)$ から, 単層膜の中央 ($5 \text{ \AA} \leq z \leq 15 \text{ \AA}$) において最も秩序が高く, 原子密度の低下する二重層膜の中央 ($z = 0 \text{ \AA}$) で秩序が低い様子がわかる. 図中点線の癌化モデル膜

では水相側界面で若干の秩序低下が見られた. コレステロール濃度の増加は液晶相にある脂質膜の脂質尾部秩序度を増加させる傾向にあるが, 正常肝細胞モデル膜の時点でコレステロール濃度が十分高い(43.8mol%)ことでこの効果が飽和したためと考えられる. 図2は脂質種の区別無く計算した脂質分子重心間の側方動径分布関数 $g(r)$ である. 癌化モデル膜において $g(r)$ のピークはより高く側方向により秩序だった配置をしているとわかる. 同膜での S および χ_T^S の低下はこの側方向配置の秩序化が原因の一つである. 一方, モデル二重層膜の膜流動性を側方自己拡散係数 D_L と回転およびwobbleによる配向緩和の緩和時間 τ_{rot} , τ_{wob} から評価した. D_L は正常, 癌化モデル膜それぞれについて $2.8, 2.3 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ であり, 後者はより側方向に流動性の低い膜とわかる. 剛直なステロイド骨格を持つコレステロール分子を対象に測定した τ_{rot} は 3.5 ns (正常) および 3.7 ns (癌化) であった. τ_{rot} については脂質種によって傾向は若干異なるものの, 膜の主成分たるリン脂質について8.1 ns (正常), 8.2 ns (癌化) であり, 配向緩和の観点からも肝臓細胞の癌化モデル膜はより膜流動性が低いことを明らかにした.

参考文献 [1] Y. Andoh, N. Aoki, and S. Okazaki, *J. Chem. Phys.*, **144**, 085104 (2016). [2] Y. Andoh, S. Okazaki, and R. Ueoka, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, **1828**, 1259 (2013). [3] R.P. van Hoeven, P. Emmelot, *J. Membrane Biol.*, **9**, 105 (1972); *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 1 (1975).

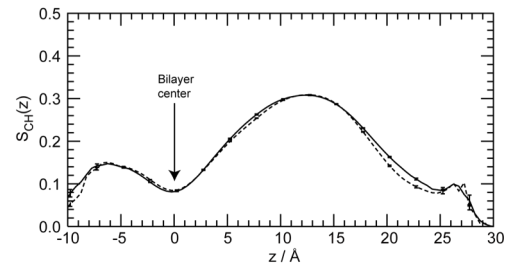


図 1 リン脂質尾部 C-H ベクトルのオーダーパラメータプロファイル. 同じ単層膜に属する脂質分子の平均. 実線: 正常, 破線: 癌化モデル膜 (図 2 に同じ).

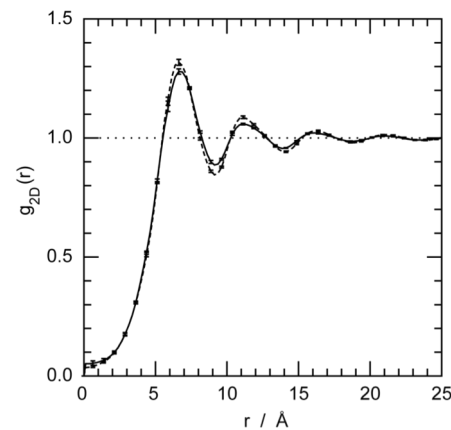


図 2 脂質重心間の側方動径分布関数.