

タンパク質構造変化の遷移経路追跡を目指した 一分子蛍光測定装置の開発

¹東北大・多元研, ²東北大院・生命科学, ³東大院・総合文化
○小井川 浩之¹, 高橋 巧^{1,2}, 須河 光弘³, 高橋 聡¹

Towards the tracking of transition path of protein conformational changes by using single-molecule fluorescence spectroscopy

○Hiroyuki Oikawa¹, Takumi Takahashi^{1,2}, Mitsuhiro Sugawa³, Satoshi Takahashi¹

¹*Institute of multidisciplinary research for advanced materials, Tohoku University, Japan*

²*Department of Biomolecular Sciences, Tohoku University, Japan*

³*Department of Life Sciences, The University of Tokyo, Japan*

【Abstract】 Single-molecule fluorescence spectroscopy is a powerful method for the investigation of biopolymer dynamics. However, the time resolution of previous single-molecule methods is usually limited to a few milliseconds. We developed the line-confocal microscope combined with a microfluidic chip and hybrid photo detectors, which enabled us to trace the time evolution of FRET efficiency from single molecules with the time resolution of 10 μ s and with the observation time of more than 10 ms. One of the targets for the single molecule investigation is the transition event across the energy barriers. As the target for the microsecond tracking of the transition path, we observed the conformational changes of F₁-ATPase induced by the ATP hydrolysis. We tried the several pairs of donor and acceptor dyes for the labeling of F₁-ATPase. Only the sample labeled with the pair of Cy3 and Cy5 exhibited the fluctuation of FRET efficiency triggered by the ATP hydrolysis.

【序】 一分子蛍光測定は生体高分子のダイナミクスを追跡することができる強力な手法であるが、通常の一分子蛍光測定の時間分解能は、数 ms に制限されていた。私達はマイクロ流路チップとライン共焦点顕微鏡を組み合わせることで、100 μ s の時間分解能で 5 ms の間、一分子の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効率の時間変化を追跡できる装置を開発した。¹ この装置を用いることで、二重蛍光標識されたプロテイン A の B ドメインとユビキチンの平衡変性条件下での構造変化を追跡し、これらのタンパク質の変性状態が比較的不均一な構造集団であることを明らかにした。^{1,2,3}

生体高分子がエネルギー障壁を超えて構造変化する際の構造遷移の瞬間をとらえることは、一分子測定の重要な目的の一つである。既存の研究において、タンパク質の構造遷移にかかる時間(transition path time)は 100 μ s より短いことが報告されている。加えて、構造転移は非常に稀なイベントであるため、構造遷移の瞬間を追跡するためには、時間分解能の改善と、一分子を観測する時間の延長の両方が必須である。

【方法 (実験・理論)】 観測時間を犠牲にせずに時間分解能を改善するため、これまでの装置で用いてきた EM-CCD カメラの代わりにハイブリッド光検出器(HPD)を導入した。HPD をライン共焦点顕微鏡に導入することで、一分子の FRET 効率時間変化を 10 μ s の時間分解能で 10 ms 以上の間追跡することができるようになった。

私達はこの 10 μ s の時間分解能をもつ新しい装置を用いて、F₁-ATPase の ATP 加水分解にともなう構造変化の遷移経路を追跡することを目指している。F₁-ATPase の α と β サブユニットは ATP の結合と加水分解にともなって、closed 型と open 型の間を構造変化する。新しい装置にとって都合が良いことに、ATP 高濃度条件下で F₁-ATPase は、ATP を数ミリ秒の時定数で加水分解する。 β サブユニットに L398C の変異が導入された thermophilic *Bacillus* 由来の F₁-ATPase の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体⁴ にドナーとアクセプターの蛍光色素を二重標識し、1 mM ATP 存在下で蛍光色素間の FRET 効率変化を追跡した。

【結果・考察】 一分子当たりの観測時間を延長するためには、マイクロ流路チップへのサンプル導入流速を低く抑えなければならない。しかし、低流速はチップ表面へのタンパク質の吸着の原因になり、背景光を上昇させる。EM-CCD を用いた旧装置では、背景光は多数のピクセルに分散するため、大きな問題になることはなかったが、HPD は一つの大きな検出部で構成されるため、背景光が全て積算され、背景光のわずかな上昇に影響されやすい。そこで、マイクロ流路チップの表面を MPC コポリマーでコートした。³ 幸運にも、F₁-ATPase はコートされた表面にほとんど吸着しないため、低い背景光で多くの一分子 F₁-ATPase を観測することができた。

F₁-ATPase の一分子 FRET 測定をするに当たり、最初の試みとしてドナーとアクセプター色素として、Alexa488 と Alexa594 で標識した試料を用いた。しかし、観測されたほとんどの F₁-ATPase 分子において、ドナーとアクセプターの蛍光強度変化に負の相関が見られず、顕著な FRET 効率時間変化をとらえることができなかった (Fig. 1)。そこで更に数種類のドナー、アクセプターの組み合わせを試したところ、Cy3, Cy5 の組み合わせだけが、ATP 加水分解にともなった FRET 効率変化を示すことが明らかになった。発表ではこの Cy3-Cy5 で標識された試料の結果について詳細に議論する予定である。

【参考文献】

- [1] Oikawa, H., Suzuki, Y., Saito, M., Kamagata, K., Arai, M., Takahashi, S., *Sci. Rep.* **3**, 2151, (2013).
- [2] Oikawa, H., Kamagata, K., Arai, M., Takahashi, S., *J. Phys. Chem. B*, **119**, 6081-6091, (2015).
- [3] Saito, M., Kamonprasertsuk, S., Suzuki, S., Nanatani, K., Oikawa, H., Kushiro, K., Takai, M., Chen, P.-T., Chen, E. H.-L. Chen, R. P.-Y., Takahashi, S., *J. Phys. Chem. B*, **120**, 8818-8829, (2016).
- [4] Sugawa, M., Okazaki, K., Kobayashi, M., Matsui, T., Hummer, G., Masaike, T., Nishizaka, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E2916-E2924 (2016).

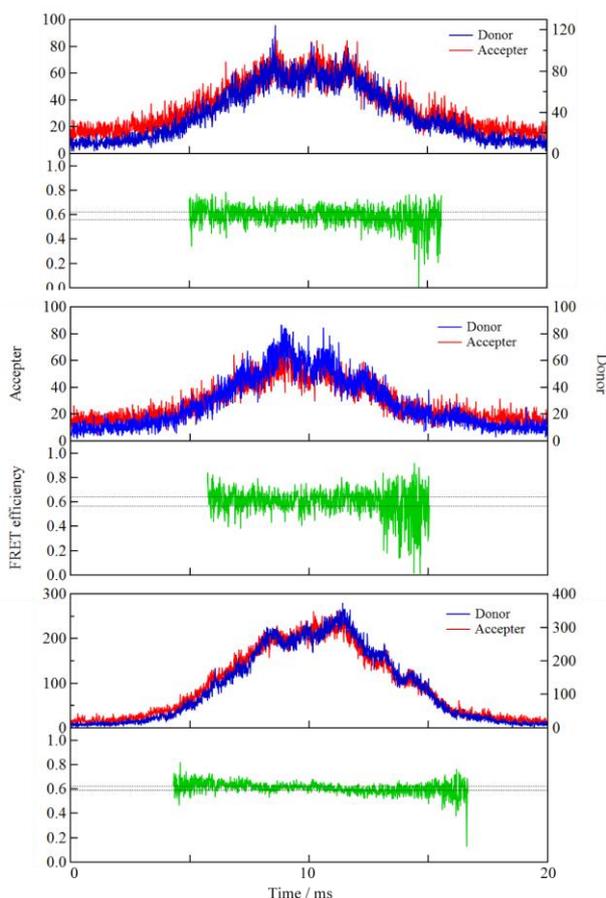


Fig. 1. Examples of the single-molecule FRET traces from F₁-ATPase labelled with Alexa 488 and Alexa 594.

クライオ超解像蛍光顕微鏡の制作

東工大 物理

資延 啓, 田邊大明, 石井啓暉, 松田 剛, 古林 琢, 松下道雄, ○藤芳 暁

Superresolution fluorescence microscope of individual molecules in aqueous matrix at cryogenic temperatures

Kei Sukenobe, Hiroaki Tabe, Hiroki Ishii, Tsuyoshi Matsuda, Taku Furubayashi,
Michio Matsushita, ○Satoru Fujiyoshi

Department of Physics, Tokyo Institute of Technology, Japan.

【Abstract】 Fluorescence microscopy is unique in its ability to individually image biomolecules in whole cells. However, the resolution of the fluorescence microscopy is one-order-of-magnitude worse than a molecular level. In the presentation, we show a construction of a superresolution fluorescence microscope for single-molecule imaging in an aqueous matrix under cryogenic conditions. To realize the high resolution imaging, we have constructed the cryogenic fluorescence microscope with a numerical aperture of 0.99 and an imaging stability of 0.05 nm at 1.8 K. As the result, the three dimensional position of an individual fluorescent molecule (ATTO647N) at 1.8 K was determined with a standard error of less than 1 nm. In addition to the construction of the high precision microscope, we are testing several fluorescent molecules that have been used as a label of biomolecules toward superresolution cellular imaging of biomolecules under cryogenic conditions.

【序】 蛍光顕微鏡は細胞内部を1分子の感度で三次元イメージングできる唯一の方法である。蛍光測定における励起と検出は可視光で行うことができるため、切片にすることなく、細胞全体の三次元空間を画像化できる[1]。また、可視域では量子収率が1に近い光検出器があるため、1分子の感度が実現している。生細胞中での蛍光標識技術は進歩しており、ねらった分子種をその機能を損なわないように標識することが可能である。このように、蛍光顕微鏡には生体試料の測定のための多くの優位点を持つ。しかし、欠点は低い解像度である。現在、最も解像度の高い蛍光顕微鏡である超解像顕微鏡を用いても、固定化細胞における三次元解像度が約30~50 nmである[2]。さらに生細胞では1桁解像度が低下する[3]。生体分子の大きさ(1~10 nm)と比べると分かるように、蛍光顕微鏡では分子レベルのイメージングが不可能であると考えられている。

超解像顕微鏡の解像度の限界を決めているのは分子の動きである。そこで、我々は試料を凍結し、分子の動きを完全に止めて観察するクライオ蛍光顕微鏡を開発している。極低温では分子の動きが止まるだけでなく、色素分子の光退色を抑えることができるので、任意の解像度が達成できるはずである。しかし、実際には顕微鏡の性能不足のために、このような測定は実現していなかった。そこで、我々は極限の光学性能と、0.05 nmという高いイメージ安定性を持ったクライオ蛍光顕微鏡を独自開発した。この顕微鏡を用いて、ごく最近、色素1分子の三次元位置を<1 nmの精度で決定することに成功した[4]。これは、目標である分子レベルに達している。講演では、次ページに示すクライオ顕微鏡の制作と、超解像イメージングに必要な分子の探索についても紹介する。

【結果】 図1に制作したクライオ蛍光顕微鏡のヘリウム槽をしめす。冷媒である超流動ヘリウムは槽全体に充填した。対物レンズもヘリウム槽内に配置し、一体成形の試料ホルダーに固定した。試料の位置は、微調整用の xyz-Scanner と粗調整用の Positioners によって動かすことができる。また、その位置を xyz 3方向に配置した静電容量センサーによって観察、制御することができるようになっている。但し、本講演では静的な安定性についてのみ議論する。

我々が以前制作した試料ホルダー[文献4, 図 S1d 参照]は、真鍮、チタン、セラミック、テフロンと熱膨張係数が違う材料で出来ていたため、ヘリウム槽内温度変化による機械的ドリフトが顕著であった。そこで、新しい試料ホルダーでは、熱膨張係数がほとんど同じであるチタン、セラミックだけを使うことにした。図2はヘリウム槽内の温度とステージの位置の関係である。温度は図1に示したセルノックスセンサーを用いて測定した。温度が 0.2 K 変わると、ステージの位置が約 25 nm 移動した。温度計とヒーターを使ってアクティブに制御すると、ヘリウム槽の温度変化を標準偏差 0.2 mK (図 3a) に抑えることができるので、温度変化に由来するドリフトは標準偏差 0.03 nm と極めて極めて小さくなる。次に、温度を制御した状態でステージの位置を測定した。その結果を図3にしめす。図 3a はヘリウム槽内の温度であり、データ間隔 6 秒、標準偏差 0.11 mK であった。この条件で、測定したステージの位置が図 3b であり、各軸の標準偏差 (データ間隔 3 秒間) は 0.28 nm (x), 0.42 nm (y), 0.33 nm (z) であり、目標の分子イメージングに十分な安定性であった。

【参考文献】

- [1] Huang, B., Jones, S. A., Brandenburg, B. & Zhuang, X. W. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat. Methods* **5**, 1047-1052, (2008).
- [2] Jia, S., Vaughan, J. C. & Zhuang, X. W. Isotropic three-dimensional super-resolution imaging with a self-bending point spread function. *Nat. Photonics* **8**, 302-306, (2014).
- [3] Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A. & Betzig, E. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat. Methods* **5**, 417-423, (2008).
- [4] Furubayashi, T., Motohashi, K., Wakao, K., Matsuda, T., Kii, I., Hosoya, T., Hayashi, N., Sadaie, M., Ishikawa, F., Matsushita, M. & Fujiyoshi, S. Three-dimensional localization of an individual fluorescent molecule with angstrom precision. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 8990 - 8994, (2017).

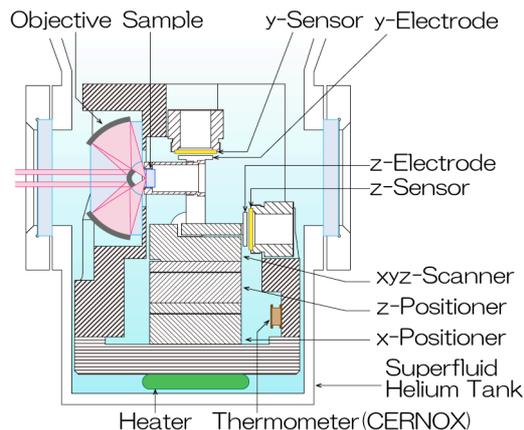


Figure 1. Design of superfluid helium tank.

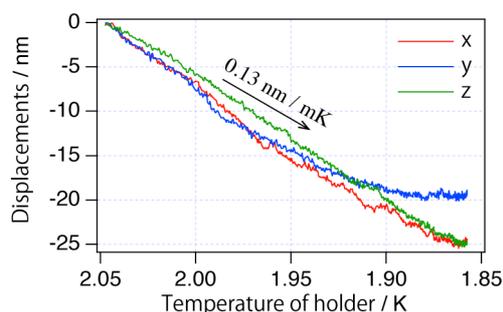


Figure 2. Mechanical drift of the cryo-stage caused by cooling of the holder.

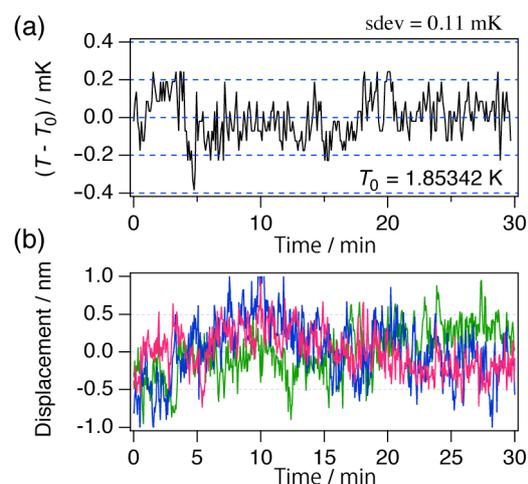


Figure 3. Mechanical stability at a constant temperature. (a) Temperature of superfluid helium tank and (b) 3D position of cryo-stage: x-axis (red), y-axis (blue) and z-axis (green). The standard deviation of σ_x , σ_y and σ_z are 0.28 nm, 0.42 nm and 0.33 nm, respectively.

軟X線顕微分光による生きたシアノバクテリア中の 細胞内元素分布の可視化

¹立命館大理工, ²立命館大生命科学, ³立命館大SRセンター
○寺本高啓¹, 浅井智広², 吉村真史³, 寺内一姫², 太田俊明³

In vivo visualization of intracellular elemental distribution in cyanobacteria by soft X-ray microspectroscopy

○Takahiro Teramoto¹, Chihiro Azai², Kazuki Terauchi²,
Masashi Yoshimura³, Toshiaki Ohta³

¹ College of Science&Engineering, Ritumeikan Univ.

² College of Life Science, Ritumeikan Univ.

³ SR center, Ritsumeikan Univ.

【Abstract】 By using a soft X-ray with wavelengths from 2.3 to 4.4nm (called “water window region”), cells could be microscopically observed *in vivo* without preparations such as staining and slicing. Filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is a photosynthetic prokaryote assimilating nitrogen. Most of cells in the filament are “vegetative” and responsible for oxygenic photosynthesis, while atypical cells named “heterocysts” are specialized for nitrogen fixation. It is believed that the intracellular carbon-nitrogen ratio (C / N ratio) is deeply related to the heterocyst differentiation from vegetative cell when nitrogen deprivation, but the quantitative information is unknown so far. In this study, we developed a method to determine the C / N ratio of a cell *in vivo* by using a soft X-ray microscopy and applied it to the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. We successfully demonstrated that the C/N ratio of heterocyst is significantly lower than that of vegetative cell.

【序】

照明光源として「水の窓」と呼ばれる軟 X 線(波長: 2.3~4.4 nm)を用いた軟 X 線顕微鏡は、1). 波長が短いため高い空間分解能(<100nm)が達成可能、2). 厚み 15 μm 程度までの試料は断片化を行わずに観察可能、3). C や N など軽元素の内殻 1s 軌道に由来する吸収があるためタンパク質など生体関連分子を元素選択的に観察できる、といった特徴を持つ。これらにより軟 X 線顕微鏡では、生きたままの細胞を色素標識や断片化などの前処理を行わずに高分解能で顕微観察することができる。

糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 は窒素固定を行う原核光合成生物である。その形態は細胞が 1 次元に連なった糸状体であり、多くは光合成を担う栄養細胞であるが、10 個に 1 個程度の割合で窒素固定に特化した異型細胞(ヘテロシスト)を持つ。ヘテロシストと栄養細胞は、どちらも単独では窒素欠乏環境下で生育できず、ヘテロシストが固定した窒素をアミノ酸として栄養細胞に供給し、栄養細胞はヘテロシストに糖や有機酸などの光合成産物を供給している。栄養細胞からヘテロシストへの分化は、栄養細胞中の特定の有機酸の蓄積が引き金となると考えられており、同時に細胞内の炭素窒素比(C/N 比)も大きく変化していると考えられている。しかし、これまでに C/N 比を単一細胞レベルで実測した例はなく、ヘテロシスト形成に必要な

C/N 比の閾値など、細胞内の C/N 比と細胞分化の定量的な関係は不明である。

本研究では、窒素 K 吸収端前後における軟 X 線を用いた軟 X 線顕微分光法により、生きた細胞における C/N 比を直接決定することを目指した。

【方法 (実験・理論)】

実験は立命館大学 SR センターの軟 X 線顕微鏡ビームライン BL12 にて行った。本研究で使用した軟 X 線顕微鏡は、使用波長を 2.3~4.4nm の間で選択可能($E/\Delta E=300$)、空間分解能 72nm、倍率 600 倍のスペックを持つ明視野顕微鏡である。

試料(糸状性シアノバクテリア)は厚さ 100 nm、 $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ の 2 枚の Si_3N_4 膜に封入し、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いてヘテロシストおよび栄養細胞の位置を確認した。その後、窒素 K 吸収端付近より短波長(2.98 nm)ならびに長波長(3.11 nm)の軟 X 線を用いた軟 X 線顕微鏡で細胞を透過観察した。細胞の有無の顕微画像を撮影し、それらの画像から入射軟 X 線に対する各細胞の吸光度を求めた。

窒素 K 吸収端近傍の軟 X 線に対し、吸光度に寄与する細胞の構成元素は C と N に限定できる。そのため吸光度 $A(\lambda)$ は $A(\lambda) = (\varepsilon_c(\lambda)c_c + \varepsilon_N(\lambda)c_N)\ell$ と記述できる。ここで $\varepsilon_i(\lambda)$ 、 c_i はそれぞれ元素 i (i は C または N) の吸収断面積と濃度、 ℓ は光路長である。2 つの異なる波長での吸光度の比から以下のような関係式が得られる。ここで R は C/N 比である。

$$\frac{A(\lambda_1)}{A(\lambda_2)} = \frac{\varepsilon_c(\lambda_1)R + \varepsilon_N(\lambda_1)}{\varepsilon_c(\lambda_2)R + \varepsilon_N(\lambda_2)} \quad (1)$$

$$R = \frac{c_c}{c_N} \quad (2)$$

【結果・考察】

図 1 に軟 X 線顕微鏡で観察したシアノバクテリアの顕微画像を示す。これらの軟 X 線顕微画像から 1 細胞あたりの吸光度を求め、式(1)を用いて C/N 比を求めた。図 2 は栄養細胞(131 個)とヘテロシスト(54 個)それぞれの C/N 比をヒストグラムで表示したものである。それぞれの細胞におけるヒストグラムの中心値と分散は、栄養細胞で 4.56、10.7 となり、ヘテロシストでは 2.42、1.38 であった。ヘテロシストでは栄養細胞より C/N 比が低い、すなわち N の相対比が高いことが示された。

講演では、上記詳細を説明するとともに 2 次元顕微画像および 3 次元トモグラフィ画像から細胞内の C/N 比を直接可視化することに成功したので合わせて報告する。

【参考文献】

- [1] T.Teramoto, M.Yoshimura, C.Azai, K.Terauchi, &T.Ohta, *J.Phys. Conf.* **849**, 012005 (2017).

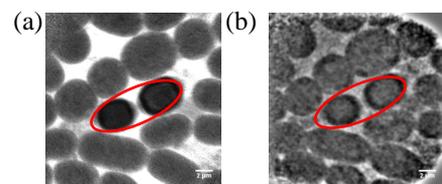


図 1. *Anabaena* sp. PCC 7120 の (a)軟 X 線 ($\lambda=3.11\text{nm}$) (b)軟 X 線($\lambda=2.98\text{nm}$)顕微画像。赤丸：ヘテロシスト、他：栄養細胞

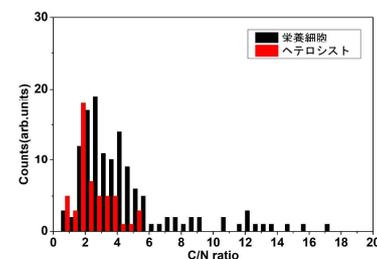


図 2. *Anabaena* sp. PCC 7120 の栄養細胞およびヘテロシストの C/N 比

フェムト秒時間分解深紫外誘導ラマン分光法による バクテリオロドプシンの超高速タンパク質応答の観測

¹理研・田原分子分光研究室, ²理研・光量子工学研究領域

○田原進也¹, 倉持光^{1,2}, 竹内佐年^{1,2}, 田原太平^{1,2}

Ultrafast protein response of Bacteriorhodopsin investigated by deep UV femtosecond time-resolved stimulated Raman spectroscopy

○Shinya Tahara¹, Hikaru Kuramochi^{1,2}, Satoshi Takeuchi^{1,2}, Tahei Tahara^{1,2}

¹Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN

²RIKEN Center for Advanced Photonics, RIKEN

【Abstract】 Bacteriorhodopsin is a prototypical membrane protein that functions as a light-driven proton pump. Photoexcitation induces ultrafast isomerization of the retinal chromophore, which is followed by protein conformational changes essential for the proton pump function. To understand how this protein function is realized, it is important to elucidate the initial response of the protein moiety which is associated with the chromophore dynamics. In this study, we employed newly-developed femtosecond stimulated Raman spectroscopy in the deep-ultraviolet region, and investigated the protein response of Bacteriorhodopsin by observing the Raman signal change reflecting the change induced in the aromatic amino acids surrounding the chromophore. The obtained data showed an instantaneous decrease in the amplitude of the stimulated Raman signals of the tryptophan and tyrosine residues. These signals exhibited a change with 0.5 ps, and then largely recovered on the 30-ps time scale. On the basis of the obtained data, we discuss how the protein moiety responds to the chromophore dynamics on the ultrafast time scale.

【序】 バクテリオロドプシン(BR, 図 1)は光駆動によるプロトン輸送機能を示す代表的な膜タンパク質である。内包されたレチナル発色団が光を吸収するとフェムト秒の時間スケールでC₁₃=C₁₄結合周りの *trans* - *cis* 異性化を起こし、これが周辺のタンパク質の構造変化を誘起し、機能発現につながると考えられている。このため、プロトン輸送機構を解明するためには、発色団だけでなくタンパク質部分の構造変化の観測が欠かせない。この観点から、これまでにピコ秒紫外共鳴自発ラマン分光を用いた研究が行われ、発色団近傍の芳香族アミノ酸残基に由来するラマン信号の時間変化を観測することにより、K 中間体から KL 中間体への遷移に伴うタンパク質構造変化が報告されている[1]。一方、この手法の時間分解能は数ピコ秒に限られているため、フェムト秒領域で進む異性化をはじめとする発色団ダイナミクスに対して

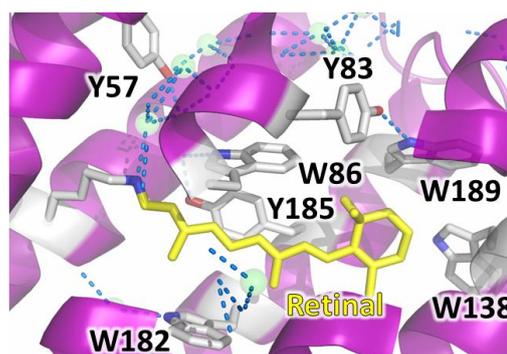


Figure 1. Structure of Bacteriorhodopsin. Retinal chromophore is shown as yellow stick. Tryptophan and tyrosine residues are depicted as stick with colored elements. Waters are shown as green spheres. Blue broken lines show hydrogen bonds.

この観点から、これまでにピコ秒紫外共鳴自発ラマン分光を用いた研究が行われ、発色団近傍の芳香族アミノ酸残基に由来するラマン信号の時間変化を観測することにより、K 中間体から KL 中間体への遷移に伴うタンパク質構造変化が報告されている[1]。一方、この手法の時間分解能は数ピコ秒に限られているため、フェムト秒領域で進む異性化をはじめとする発色団ダイナミクスに対して

タンパク質部分がどう応答するか等の問題は、いまだ明らかにされていない。そこで我々はフェムト秒領域のタンパク質応答を解明し、発色団励起に伴ったタンパク質構造変化の全体像を明らかにしたいと考え、研究を進めてきた。本発表では、近年我々が実現した深紫外誘導ラマン分光[2]をフェムト秒時間分解測定へと新たに発展させ、それを用いて BR タンパク質の超高速応答を追跡した結果について報告する。

【方法】 試料として *Halobacterium salinarum* 由来の紫膜懸濁液を用いた。励起光 (580 nm, 100 fs) で発色団を光励起した後の様々な遅延時刻に、深紫外領域のラマン励起光 (292 nm, 1.8 ps) とフェムト秒プローブ光 (301 nm 中心) を同時に照射し、ストークス領域で時間分解誘導ラマン信号を取得した。

【結果・考察】 遅延時刻 0.2 ~ 200 ps における誘導ラマン差スペクトル、すなわち負時刻(-100 ps)での信号からの変化分を図 2a に示す。この差スペクトルには、トリプトファンおよびチロシンに由来する複数の誘導ラマンバンドの強度減少が観測されている。観測されたバンドごとの強度変化率を求め、その時間変化を図 2b, c に示す。光励起から 0.2 ps 以内に誘導ラマン信号の強度が減少しており、これは光励起で生じた発色団の電子分極がタンパク質に引き起こした変化を反映していると考えられる。その後、発色団の光異性化が起こる 0.5 ps の時間スケールで誘導ラマン信号の強度が変化した。このことは、発色団異性化に伴い、タンパク質構造変化が起こることを示唆する。その後、誘導ラマン信号の強度は 30 ps の時定数で大幅に回復しているが、これはピコ秒ラマン分光の報告[1]に一致している。また図から分かるように、遅い時刻 (200 ps) においても誘導ラマン信号の僅かな強度減少が観測されている。これは、超高速タンパク質構造変化の一部がその後起こる光サイクル反応に引き継がれ、プロトン輸送機能の発現に関与している可能性を示唆している。

講演では、得られたフェムト秒深紫外共鳴誘導ラマン信号に基づき、超高速タンパク質構造変化と発色団ダイナミクスとの連関について議論する。

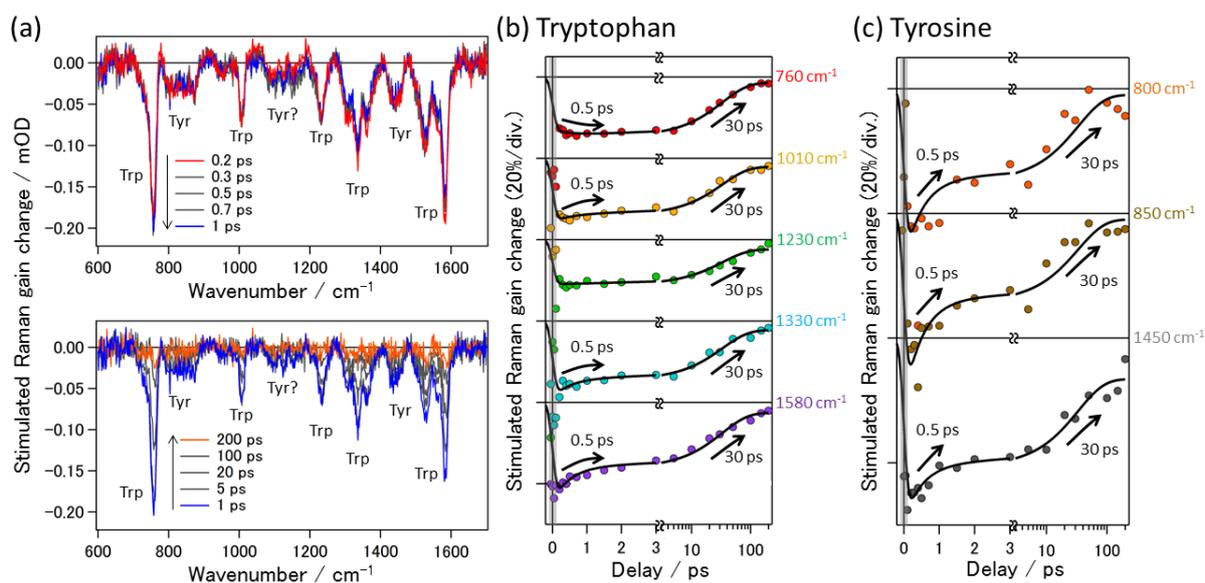


Figure 2. Femtosecond stimulated Raman signals of Bacteriorhodopsin obtained with 292-nm Raman pump. (a) Time-resolved stimulated Raman spectra on the 0.2-1 ps and 1-200 ps time scales. (b, c) Temporal traces and multiexponential fitting results of the Raman signals due to tryptophan and tyrosine residues. Note that the horizontal axis is shown in logarithmic scale after 3 ps.

【参考文献】

- [1] M. Mizuno, M. Shibata, J. Yamada, H. Kandori, Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12121-12128.
 [2] H. Kuramochi, T. Fujisawa, S. Takeuchi and T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* **2017**, *683*, 543-546.

光駆動プロトンポンプBRにおける伸縮振動とその倍音成分の振動解析

¹名工大院工, ²University of Valencia

○伊藤 奨太¹, Víctor A. Lórenz-Fonfría², 神取 秀樹¹

Vibrational analysis of stretching vibration and its overtone signals in light-driven proton pumping rhodopsin BR

○Shota Ito¹, Víctor A. Lórenz-Fonfría², Hideki Kandori¹

¹ Department of Life and Materials Engineering, Nagoya Institute of Technology, Japan

² The institute of Molecular Science, University of Valencia, Spain

【Abstract】

Bacteriorhodopsin (BR) is a light-driven proton pumping membrane protein. For its proton pumping, light energy first converted to the retinal isomerization, followed by pKa changes of amino acids and protein structural changes. The sensitivity of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to molecular vibration allows to monitor such changes.

In this study, we investigated the first overtone of retinal C-C stretching vibration and C-H out-of plane bending vibration in BR as a model system of biomolecules and they were compared with their fundamental vibrations. Experimental anharmonicities for C-C stretching vibration and C-H out-of plane bending vibration were estimated to $\sim 1.5 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$, respectively. Based on our FTIR difference spectra, anharmonicity of retinal vibrational modes in protein and in solvent will be discussed.

【序】光駆動外向きプロトンポンプの一種であるバクテリオロドプシン(BR)は、発色団レチナールの光異性化を初期反応として、カルボン酸を経由した一方向のプロトン移動を実現している(Fig.1)。BRにおけるレチナールの化学構造は同位体試料を用いた赤外分光法やラマン分光法により明らかにされ、all-trans型からK中間体への13-cis型への光異性化をトリガーとして、M中間体でのシッフ塩基の脱プロトン化、N中間体での再プロトン化を経由して、最終的にO中間体でall-trans型に熱異性化する光サイクルが知られている。これらレチナールの化学構造の変化とタンパク質内に存在するカルボン酸のpKaが精密に制御されることにより、一方向性のプロトン輸送が実現される[1]。このようにBRは、光反応サイクルとその機能メカニズムの理解が最も進んでいる膜タンパク質であり、またその熱安定性や光反応性の高さから新規測定手法を行う上での生体系のモデルタンパク質として良く知られている。

今回、我々はBRの光反応性の高さを利用して、光反応中におけるレチナール

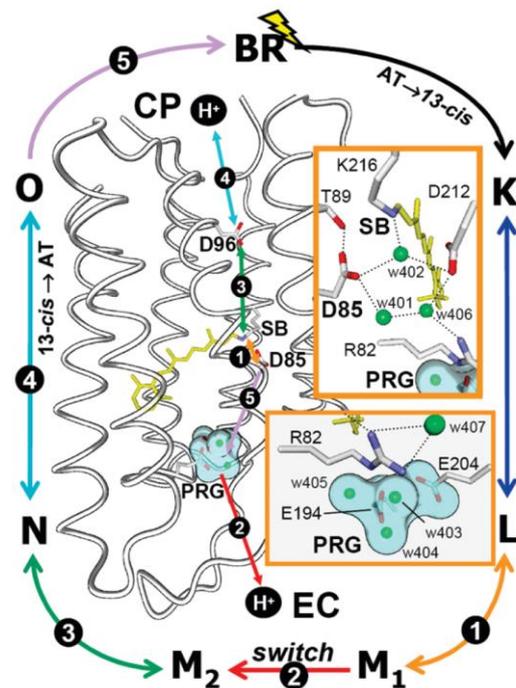


Fig.1 Schematic representation of the BR photocycle (Lórenz-Fonfría et al., 2009 *J. Am. Chem. Soc.*)

分子の振動モードの非調和性の解析を試みた。赤外分光法によって、レチナール分子の C-C 伸縮振動、C-H 面外偏角振動とその倍音成分を測定し、その振動数と強度を比較した。

【方法】 *Halobacterium. Salinarum.* より単離・精製した BR を含む紫膜を 2 mM NaCl, 3 mM MES-NaOH pH6.5 に懸濁し、赤外分光法用の乾燥フィルムを作成した。20% グリセロール水を 2 μ L 用いて BR を水和させた後、>500 nm の光で BR を明順応させた。その後、各光反応中間体の蓄積する測定温度(77, 190K, 230 K)まで冷却し、光照射により各光反応中間体を形成させた。光照射後と光照射前の赤外スペクトルを MCT デテクターを用いて測定し、両者を引き算することにより、各中間体と暗状態との光反応差スペクトルを解析した。

【結果・考察】 BR の暗状態と K 中間体との光反応差スペクトルを Fig.2 に示す。レチナールの C-C 伸縮振動と C-H 面外偏角振動はそれぞれ、1250-1150 cm^{-1} と 1000-900 cm^{-1} に表れることが知られており、1203 cm^{-1} は C14-15 伸縮振動、1194 cm^{-1} は C10-11 と C14-15 伸縮振動、957 cm^{-1} は C15-H 面外偏角振動に由来される [2]。それらの倍音領域にあたる 2500-1800 cm^{-1} 領域を拡大すると、基音の振動モードと同様のスペクトル形状をした信号モードが検出されたために、これらの信号にレチナール分子の振動モードの倍音成分が含まれていると考えられた(Fig.2 : 黒線)。次に赤外光の干渉や MCT デテクターの非線形性などの赤外分光器に由来するアーティファクトを除去するために、1700 cm^{-1} 以下の赤外光をカットするサファイヤフィルターを用いた測定を行った(Fig.2: 赤線)。この条件で観測された 2404/2386 cm^{-1} や 1906 cm^{-1} のバンドは、C10-11, C14-15 伸縮振動と C15-H 面外偏角振動の倍音成分と考えられ、それぞれ $\sim 1.5 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$ の非調和性を受けていることが分かった。また 2149 cm^{-1} は 1194 cm^{-1} と 957 cm^{-1} の結合音成分と考えられ、 $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$ の非調和性を受けていることが観測された。またそれぞれの信号の強度は基音より ~ 170 倍小さくなっていった。これらの振動数変化(非調和性)は X-H 伸縮振動 ($\sim 80 \text{ cm}^{-1}$) や N-O 伸縮振動 ($\sim 10 \text{ cm}^{-1}$) よりも小さく、レチナールの C-C 伸縮振動、C-H 面外偏角振動の特徴だと思われる [3]。本発表では、BR に含まれるレチナールの振動モードとその倍音成分、また溶液中のレチナールとの振動モードとの比較を行い、生体分子の振動構造とその非調和性について議論したい。

【参考文献】

- [1] L6renz-Fonfr6ria, V. A. et al., (2009) *J. Am. Chem. Soc*
- [2] Smith, S. O. et al., (1985) *J. Membr. Biol.*
- [3] Struve, W. S. (1989) *Fundamentals of molecular spectroscopy, John Wiley & Sons, Inc.,*

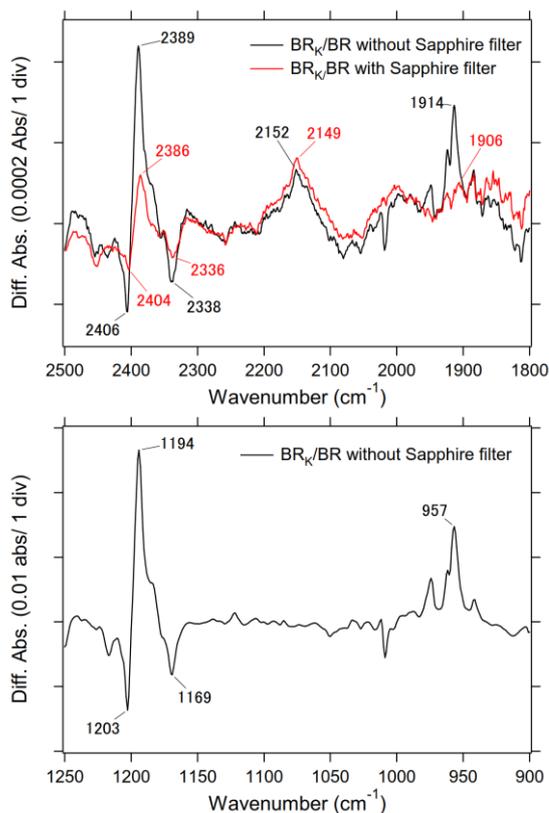


Fig.2 FTIR difference spectra of BR_K/BR in 2500-1800 and 1250- 900 cm^{-1} region.

全反射赤外分光法によるカリウムチャネルTWIK-1の イオン選択フィルター構造とアルカリ金属イオンとの相互作用解析

¹分子研, ²総研大物理, ³生理研, ⁴総研大生命科学, ⁵大阪医科大
塚本寿夫^{1,2}, 中條浩一^{3,4,5}, 久保義弘^{3,4}, ○古谷祐詞^{1,2}

Attenuated total reflection spectroscopy on a potassium ion channel TWIK-1 for investigating the structure of the ion selectivity filter and its interaction with alkali metal cations

Hisao Tsukamoto^{1,2}, Koichi Nakajo^{3,4,5}, Yoshihiro Kubo^{3,4}, ○Yuji Furutani^{1,2}
¹ *Institute for Molecular Science, Japan*
² *School of Physical Sciences, SOKENDAI, Japan*
³ *National Institute for Physiological Sciences, Japan*
⁴ *School of Life Science, SOKENDAI, Japan*
⁵ *Osaka Medical College, Japan*

【Abstract】 Potassium channels are selectively permeable to K^+ ions over Na^+ ions (typically 1000:1 molar ratio), which form a homo tetrameric structure with a pore penetrating along the central symmetric axis. The selectivity filter works as atomic mechanical sieves, which is composed of several carboxyl groups of the main chains at the specific sequence for potassium channels. Recently, the interactions between the channel and alkali metal cations have been studied by infrared spectroscopy. We applied attenuated total reflection FTIR spectroscopy on one of potassium channels, KcsA, and revealed amide I bands changing their frequencies depends on the types of alkali metal cations. Here, we have succeeded to extend the method to a mammalian potassium channel, TWIK-1, which forms a dimer with a pseudo-symmetric pore structure and has less potassium selectivity under some conditions. We found that the ion specific difference spectra of TWIK-1 are basically very similar to those of KcsA and the 1680 cm^{-1} band would be a general marker band for the selectivity filter interacting with potassium ions.

【序】 細胞膜に存在するイオンチャネルは生体電気信号の源であり、カリウム (K^+) イオンやナトリウム (Na^+) イオンを選択的に透過するチャネルが細胞外の刺激や膜電位の変化に応じて開閉することで生体電気信号を形成する。カリウムチャネルは K^+ イオンを選択的に透過するイオンチャネルであり、 Na^+ イオンよりイオン半径が大きい K^+ イオンを選択的に透過できる分子機構について、様々な実験および理論的研究が行われている。イオン選択性の分子機構の解明にはイオンを透過する孔 (ポア) の構造やダイナミクス情報が不可欠である。X線結晶構造解析により、イオン選択フィルターと呼ばれる部位において、主鎖のカルボニル基が K^+ イオンを配位するのに適当な距離で配置されていることが明らかにされた。最近、二次元 IR を含む、赤外分光法により、イオン選択フィルターの構造やダイナミクスを明らかにする試みがなされている[1-5]。これまで全反射赤外分光解析を用いて、細菌由来のカリウムチャネル KcsA において、様々なアルカリ金属イオンとの相互作用を解析し、amide I 領域に特徴的なバンドが見られることを明らかにしてきた[1-3]。本研究では、ほ乳動物由来のカリウムチャネル TWIK-1 に全反射赤外分光解析を適用し、二量体構造により 4 回対称性が崩れたイオン選択フィルター (Fig. 1) を持ち、条件により Na^+ イオンの透

過性が上昇する特異なイオン選択性の分子機構を明らかにすることを試みた。

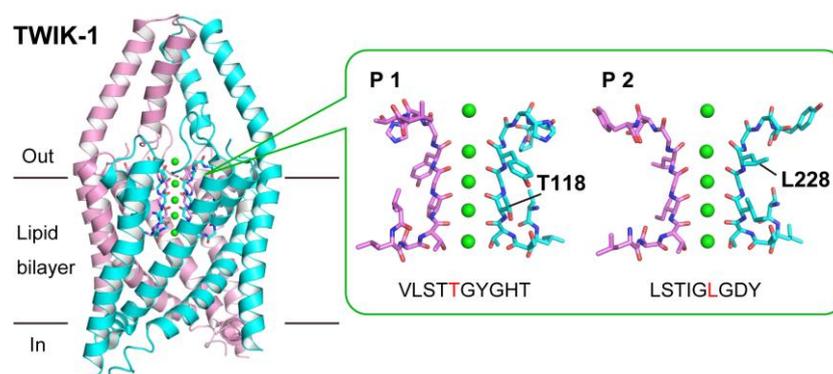


Fig. 1. X-ray crystal structure of TWIK-1 (PDB: 3UKM)

【方法 (実験)】マウス由来の TWIK-1 の全長配列の C 末端に 8xHis を精製用タグとして付加した pMT ベクターを、COS-1 細胞にトランスフェクションした。細胞膜を回収し、1% n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM)を含む緩衝液で抽出し、Ni カラムおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。その後、脂質膜 (POPE:POPG=3:1) に再構成した (脂質とタンパク質のモル比は 50:1)。KcsA での計測[2, 3]と同様に、9 回反射型ダイヤモンド製の内部反射結晶の全反射赤外分光装置にクロマトグラフィー用のペリスタポンプやバルブ切換装置を接続し、イオン交換による赤外差スペクトルを計測した。20 mM HEPES (pH7.0)に 200 mM KCl もしくは 200 mM NaCl を含む緩衝液を用いた。

【結果・考察】 Fig. 2 に典型的なイオン交換誘起赤外差スペクトルを示す。KcsA での結果[2, 3]と同様に amide I 領域に特徴的なバンドが正負に現れた。WT では細胞外が低 K^+ イオン状態であったり、酸性状態であるなどの条件下において、 Na^+ イオンも透過する性質を示す。一方、T118I 変異体は KcsA と同様に恒常的に K^+ イオン選択性が高いことが報告されている。今回の K^+/Na^+ の赤外差スペクトルにおいて、正側、つまり K^+ イオン存在下では 1680, 1654 cm^{-1} の 2 本のバンドが同様に見られたが、負側、 Na^+ イオン存在下では 1642, 1624 cm^{-1} の 2 本のバンドのうち、1642 cm^{-1} のバンドの強度が大きいことが分かった。過去の KcsA の報告によると、1680 cm^{-1} はイオン選択フィルターモード、1654 cm^{-1} はヘリックスモードと帰属されている[4]。今回、TWIK-1 でも同様のバンドが観測され、 K^+ イオン存在下では WT と T118I に違いはほとんど見られず、 Na^+ イオン存在下ではヘリックスモードの変化がより大きいことが明らかになった。TWIK-1 の特異なイオン選択性は K^+ イオンが存在しない状況下での構造の差異によって説明されるのかもしれない。

【参考文献】

- [1]古谷ら, 第3回分子科学討論会, 4B16(2009). [2] Y. Furutani *et al.* *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 3806 (2012). [3] Y. Furutani *et al.* *Biophys. Physicobiol.* **12**, 37 (2015). [4] P. Stevenson *et al.* *J. Phys. Chem. B* **119**, 5824 (2015). [5] H.T. Kratochvil *et al.* *Science* **353**, 1040 (2016).

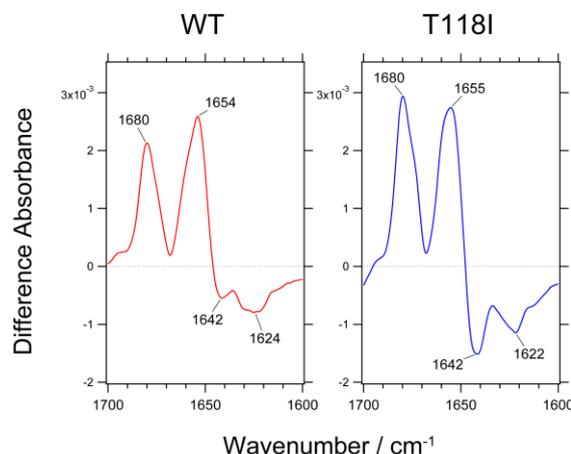


Fig. 2. The ion-exchange-induced (K^+ -minus- Na^+) difference infrared spectra of TWIK-1 WT and T118I mutant in the amide-I region.

ラマン光学活性によるインスリンアミロイド線維の構造解析

¹阪大院理, ² IOCB・チェコ

○山本茂樹¹, Jiří Kessler², Petr Bouř²

Structural Analysis of Insulin Amyloid Fibril on the Basis of Raman Optical Activity

○Shigeki Yamamoto¹, Jiří Kessler², Petr Bouř²

¹ *Department of Chemistry, Osaka University, Japan*

² *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech*

【Abstract】 Protein folding into insoluble amyloid fibrils is involved in a number of biological processes including neurodegenerative diseases. However, their structures are still difficult to analyze. As a simple model of amyloid-forming proteins, we have studied amyloid fibril of insulin by using Raman optical activity (ROA) to explore its secondary- and tertiary structures. ROA is sensitive to molecular conformation in solutions and applicable to aggregated proteins. We successfully measured ROA spectra of insulin amyloid in a naturing process. To connect the spectra to the protein structures, quantum mechanical simulation of the spectra was applied to both amyloid and native ones, which was achieved by applying a molecular fragment method, the Cartesian coordinate tensor transfer, combined with molecular dynamics simulations. The main changes in the experimental spectra were successfully simulated, which suggests β -roll is the preferred structure of the insulin amyloid.

【序】 不溶性のアミロイド線維の形成は、アルツハイマー病などの神経変性疾患に深く関わる。しかしアミロイド線維の構造解析は依然難しい。ラマン光学活性 (Raman Optical Activity: ROA) は分子の立体配座に鋭敏であり、アミロイド線維のような時間変化するコロイド系にも適用可能である。我々は、インスリンのアミロイド線維が天然状態へ構造変化する過程を ROA により測定した[1]。スペクトルに現れた変化をタンパク質構造と対応させる為に、量子力学スペクトル計算および分子動力学を行った。

タンパク質のように巨大な分子全体の振動スペクトルの量子力学計算は、その計算コストが莫大となり困難である。我々は分子断片化法[2,3]を適用することで、天然状態のインスリンの ROA およびラマンスペクトルの計算を可能とした[4]。分子断片化法においては、巨大分子のモデル構造を小さな分子断片に分割し、断片の力場微分、ラマンおよび ROA テンソル微分テンソルを量子計算し、元のモデルに転写することで、巨大分子全体のスペクトルを得る。断片化の自動化によって、より巨大なタンパク質 (ヒト血清アルブミンなど) のスペクトル計算も可能となった[5]。本研究においては、分子動力学 (Molecular Dynamics, MD) 計算と分子断片化法を組み合わせ、インスリンアミロイド線維の構造揺らぎをスペクトル計算に取り入れた[6]。実験において観測されたスペクトル変化を計算により良く再現することができた。インスリンアミロイド線維は β ロール構造を取ることが示された。

【方法 (実験・理論)】

ウシ膵臓由来インスリン (Sigma-Aldrich) を 100 mg/mL となるよう 0.1M HCl 水溶液に溶かした。pH は 2.5 から 3.1 であった。この溶液を 82 °C において 10-20 分加熱し、アミロイド線維を生成させた。室温 (22 °C) において放置すると、数時間かけてアミロイド線維が天然状態へ変化し、この過程の構造変化を ROA により測定した[1]。

インスリンアミロイド線維のモデル構造として、 β ロールおよび β ヘリックスを検討した (Fig. 1)。 β ロール構造をとるタンパク質 (PDB; 1VH4) の X 線結晶構造の一部 (A256-A306) から、ペプチドのねじれ角 (ϕ, ψ) をインスリン分子に写し、 β ロール構造をとるインスリンモデルを作製した。実験 pH2.5-3.1 に合わせ側鎖をプロトン化し、これを初期構造とした。同様に、 β ヘリックス構造をとるインスリンについても、タンパク質部分 (PDB; 1DAB, A113-A163) のねじれ角を基にモデルを作製した。

タンパク質構造の柔軟さと温度による揺らぎを考慮するために、MD 計算を行った。インスリン単量体または線維状の 3 量体を、水分子の存在下にて計算した (1 ns, 300 K, NVT, Amber03 ff, Amber10)。別に、インスリン単量体を用い、らせん周期境界条件 (単量体間の許容ねじれ角 0-6°) において計算を行った (0.1 ns, NVT, Amber99 ff, Tinker)。

天然およびアミロイド線維のインスリンについて、分子断片化法を用いて ROA およびラマンスペクトルを計算した。4 つのアミノ酸を含む分子断片モデルを作製し、末端をメチル基により保護した。基準振動座標において、 100 cm^{-1} 以下の基準振動モードを固定し、部分的構造最適化を行った。調和近似において力場、ラマンおよび ROA の原子テンソルを計算した。Gaussian09 と B3PW91/6-31++G**/CPCM(water) の理論を用いた。テンソルを元の構造に転写し、後方散乱 ROA およびラマン強度を求めた。

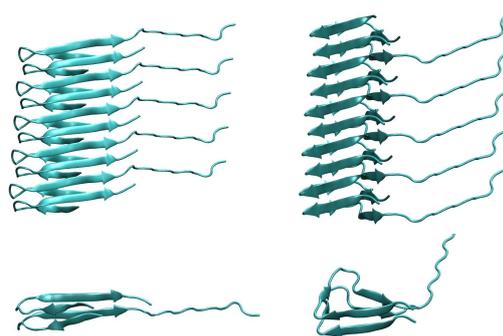


Fig. 1. Model structures of β -roll (left) and β -helix (right) of insulin

【結果・考察】

MD 計算においてインスリン単量体間の相互作用が存在する場合、 β ロール構造は初期の 3 次構造を保ったが、 β ヘリックス構造は保たなかった。このことから、インスリンアミロイド線維内において β ヘリックス構造は不安定であると予想される。

MD 計算から、 β ロール構造をとる 865 個のスナップショットを取り出し、テンソルを転写することで 865 個のスペクトルを計算し、平均化した。天然状態インスリンについても同様に行った。実験 ROA スペクトルにおいて観測された変化 (アミド I バンドの形状および位置変化, 拡張アミド III バンドの半値幅の減少, アミド III バンドの高波数シフトと増強, 300 cm^{-1} 以下のバンドの符号変化) を、計算においてよく再現することができた。このことから、モデル構造が妥当だと結論できる。インスリンアミロイド線維は β ロール構造を取ることが示された。

【参考文献】

- [1] S. Yamamoto *et al.* *Chirality*, 24, 97–103, 2012
- [2] P. Bouř *et al.* *J. Comput. Chem.* 18, 646–659, 1997
- [3] S. Yamamoto *et al.* *J. Chem. Theory Comput.* 8, 977–985, 2012
- [4] S. Yamamoto *et al.* *Anal. Chem.*, 84, 2440–2451, 2012
- [5] J. Kessler *et al.* *J. Phys. Chem. Lett.*, 6, 3314–3319, 2015
- [6] J. Kessler *et al.* *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19, 13614–13621, 2017

振動和周波発生分光で観るナトリウムポンプロドプシンの気水界面での構造および配向変化ダイナミクス

¹筑波大院数理, ²名工大, ³JSTさきがけ

○近藤正人¹, 奥野将成¹, 井上圭一^{2,3}, 神取秀樹², 石橋孝章¹

Dynamics of conformational and orientational change in sodium pump rhodopsin at the air/water interface monitored by vibrational sum frequency generation spectroscopy

○Masato Kondoh¹, Masanari Okuno¹, Keiichi Inoue^{2,3}, Hideki Kadori², Taka-aki Ishibashi¹

¹ Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Japan

² Nagoya Institute of Technology, Japan

³ PRESTO, JST

【Abstract】 We investigated conformational and orientational dynamics of a light-driven sodium ion pump (KR2) reconstituted in a phospholipid liposome at an air/water interface by vibrational sum frequency generation (VSFG) spectroscopy. A vibrational band at 1640 cm⁻¹ was observed in a VSFG spectrum of the KR2 on aqueous buffer solution. We monitored a temporal profile of intensity of the 1640 cm⁻¹ band after the KR2 sample was added on the solution. We found that the band intensity rose sharply at about 20 min after the addition of the sample. This observation indicates that conformation or orientation of KR2 shows step function-like dynamics at the air/water interface.

【序】 クロキノバクターロドプシン (KR2) は、海洋性細菌の持つ光駆動ナトリウムイオンポンプである。その発見以来、バルク溶液中でのタンパク質構造やレチナール発色団の光反応が調べられ、ポンプ機構の詳細が議論されてきた[1]。膜タンパク質であるロドプシンは、生体中において膜と水の界面で機能する。そのため、界面での構造や動きにも興味を持たれており、ウシロドプシンの系で、気水界面での配向や、その表面圧による違いが研究されている[2]。しかし、研究例は限られており、配向や構造の時間変化の詳細は分かっていない。特に、KR2 について界面での研究例は全くない。本研究では、ヘテロダイン検出振動和周波発生 (HD-VSFG) 分光を用いて、脂質二重膜に再構成した KR2 を対象に、気水界面での配向や構造とその時間変化を調べた。

【実験方法】 リン脂質 POPE と POPG を 3:1 で構成したリポソームを作成し、KR2 を再構成させた。タンパク質と脂質の比は、1:50 とした。得られた KR2 再構成膜は、KR2 濃度が 0.03 mM 程度となるよう、Tris 緩衝液 ([Tris] = 50 mM, [NaCl] = 100 mM, pH 8) に懸濁させた。また、対照実験のため、リポソームだけの懸濁液も調製した。試料懸濁液をマイクロシリンジで Tris 緩衝液上に滴下させ、HD-VSFG スペクトルを測定した。HD-VSFG 測定では、可視光を 630 nm に、赤外光を CO 振動領域 (1600-1750 cm⁻¹) あるいは、CH 振動領域 (2700-3000 cm⁻¹) に設定した。SFG、可視、赤外光の偏光は、それぞれ、S、S、P とした (SSP 偏光配置)。

【結果と考察】 KR2 再構成膜を緩衝液上に滴下後、30 分以上の時間を置いてから得た HD-VSFG スペクトルの虚部を、脂質二重膜だけを滴下後、および、試料滴下前 (下層液だけ) に得たスペクトルと合わせて図 1 に示した。KR2 再構成膜のスペクトルには、1640 cm⁻¹ と 1724 cm⁻¹ に振動バンドが観測された。これらのうち、1640 cm⁻¹ のバンドは、脂質二重膜だけの場合には現れなかったため、KR2 に由来するものである。

KR2 の VSFG スペクトルが観測された事実は、気水界面での KR2 の配向がランダムではなく、配向していることを示している。1724 cm^{-1} のバンドは脂質分子のエステル CO 伸縮振動だと帰属した。

この結果をもとに、KR2 再構成膜が気水界面で示すダイナミクスを調べた。まず、試料を滴下後の表面圧の時間変化を測定した (図 2A)。表面圧は試料滴下直後には上昇せず、滴下約 5 分を過ぎたところから徐々に上昇し始め、30 分後に約 $5(\pm 1) \text{mNm}^{-1}$ に達し、その後もゆっくり上昇した。この時間変化は、滴下後に一旦水中に沈んだ試料が、気水界面に集まる過程を反映したものだと考えられる。

次に、KR2 由来の 1640 cm^{-1} の VSFG バンドについて、試料滴下後の強度の時間変化を調べた (図 2B)。その結果、このバンドは、滴下から約 20 分後に急激に立ち上がり、その後一定の強度を示すことが分かった。また、同様の時間変化は、脂質由来の 1724 cm^{-1} バンドや、CH 振動領域の VSFG バンドでも観られていた。これらの時間変化は、表面圧の時間変化と完全には対応していない。以上をもとに、KR2 再構成膜のダイナミクスを議論する。

SFG 分光の原理を考えると、二重膜を形成した脂質分子は対称性が高いため、その SFG 信号は非常に弱いと予想される。試料滴下後、表面圧が上昇したにも関わらず、VSFG バンドが現れなかったことは、二重膜構造が保たれていることを反映している。一方で、滴下約 20 分後以降、脂質分子の VSFG バンドが予想に反して観られた事実は、二重膜構造が壊れたことを強く示唆している。この考察に基づくと、KR2 由来の 1640 cm^{-1} バンドが同様の時間変化を示したことは、次のように解釈できる。二重膜が保たれた状態の KR2 には、そのリポソーム外側を、気体側と液体側それぞれに向けたものが、ほぼ同じ割合で存在する。このため、滴下直後には VSFG バンドが現れない。一方、二重膜構造が壊れると、KR2 の構造や配向に対する制限が小さくなり、KR2 は気水界面の誘電環境を反映した有利な向きに配向、あるいは構造を変化させる。結果、KR2 のバンドが現れる。

以上より、KR2 再構成膜が気水界面で示すダイナミクスとして、次の描像が提案される。KR2 再構成膜は、一旦水中に沈んだ後、二重膜構造を保ったまま、徐々に水上に集まる。これを反映して、表面圧が上昇する。滴下約 20 分後に二重膜構造が壊れる。この際に生じた脂質分子が気水界面で配向し、脂質由来の VSFG バンドが現れる。これを引き金に、KR2 の構造や配向が変化し、KR2 由来の 1640 cm^{-1} バンドが階段関数的に立ち上がる。表面圧がその後も上昇したことは、生じた一重膜の下部にさらに分子が集まったことを反映していると考えている。

【参考文献】 [1] K. Inoue *et al. Nature Commun.* **4**, 1678 (2013)., [2] C. Salesse *et al. Biochemistry*, **29**, 4567 (1990).,

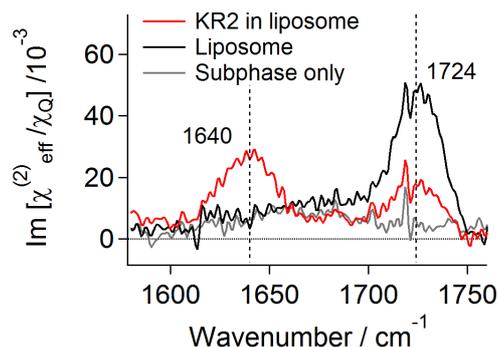


Fig. 1. HD-VSFG spectra obtained more than 30 min after adding the samples.

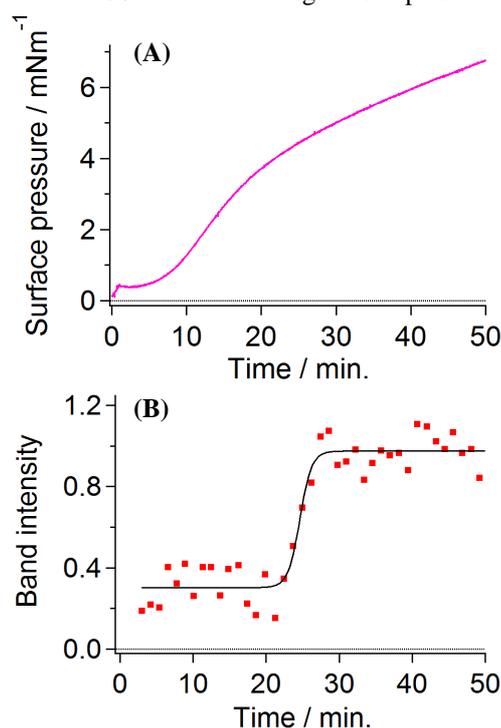


Fig. 2. Time profiles of (A) surface pressure and (B) VSFG band intensity at 1640 cm^{-1} observed after adding KR2 in liposome to buffer solution.

蛍光タンパク質eYFPとそのY145変異体の蛍光寿命に与える 発色団周辺環境の影響

¹東邦大・理, ²理研・伊藤ナノ医工学
間 紗希子¹, 宮武 秀行², 内田 朗¹, ○細井 晴子¹

Effect of the Environment around the Chromophore on Lifetimes of Enhanced Yellow Fluorescent Protein eYFP and its Y145 Mutants

Sakiko Hazama¹, Hideyuki Miyatake², Akira Uchida¹, ○Haruko Hosoi¹

¹Department of Biomolecular Science, Toho University, Japan

²Nano Medical Engineering Laboratory, RIKEN, Japan

【Abstract】 The goal of our study is to answer the fundamental question of why fluorescent proteins are fluorescent. Previously, we performed fluorescence lifetime measurements of enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) and its 19 different Y145 mutants. The lifetimes of the Y145 mutants varied drastically over a wide range of 3.4 ns to 82 ps. Further, the lifetime decreases as the mutated amino acid side chain volume becomes smaller. In this study, we determined the crystal structures of eYFP wild type (3.3 ns lifetime) and its Y145G mutant (1.0 ns lifetime) to clarify the correlation between the lifetime and the structural change caused by mutation. The overall structures are very similar ($C\alpha$ RMSD 0.447 Å) but there are several local differences. In the Y145G mutant, two voids were found around the chromophore, whereas such voids were not observed for the wild type. It is considered that the voids found in the Y145G mutant would induce an internal degree of freedom of the chromophore and lead to an efficient nonradiative decay process.

【序】 われわれは、すべての蛍光タンパク質に共通する発光メカニズムの解明を目指して研究を進めている。これまでにオワンクラゲ由来黄色蛍光タンパク質 eYFP の蛍光寿命が、145 番アミノ酸一つの変異で大きく変化すること、また、145 番アミノ酸側鎖体積が小さくなるほど短くなることを明らかにした (Fig. 1) [1]。現在、蛍光寿命変化の起源の解明を目的として、eYFP 野生型とその Y145 変異体 19 種類の X 線結晶構造解析を進めている。本発表では、構造決定に成功した長寿命 (3.3 ns) の eYFP 野生型と短寿命 (1.0 ns) の Y145G 変異体の構造を比較した結果を報告する。

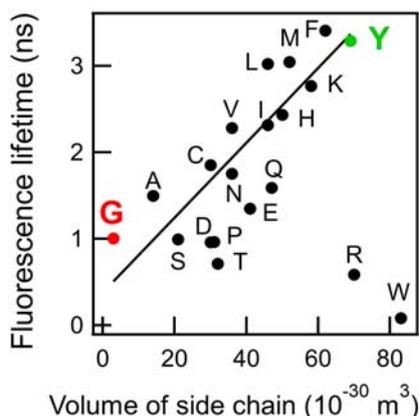


Fig. 1. A plot of the fluorescence lifetime of eYFP wild type and its Y145 mutants as a function of the amino acid side chain volume. The wild type (Y) and Y145G (G) are highlighted in green and red, respectively. A solid line indicates the linear regression line. R and W were excluded in the fitting [1].

【方法】 N-末端に His タグを有する eYFP 野生型 (Clontech) と eYFP Y145G 変異体を作製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行った。得られた結晶の X 線回折強度データを SPring-8 理研ビームライン BL26B1、BL26B2 で収集した。

【結果と考察】 eYFP 野生型と Y145G 変異体の構造を、それぞれ 2.0 Å、1.4 Å の分解能で決定した。野生型と Y145G 間の C α 炭素原子の平均二乗偏差 (RMSD) は 0.447 Å と非常に小さく、Y145G 変異によるタンパク質骨格構造の変化は非常に小さいことが分かった。

また、野生型と Y145G 変異体の発色団はともに cis 型、平面構造をとっており、Y145G 変異による発色団構造の変化も小さいことが分かった。この結果は、「発色団が cis 型だと光る、trans 型だと光らない。発色団が平面構造だと光る、非平面だと光らない。」[2]というこれまでの慣習的な描像とは異なる。

野生型と Y145G 変異体の構造の違いは非常に局所的な次の 4 点である (Fig. 2)。① G145 の C α 炭素が発色団 (β -バレル内部) に約 0.9 Å 近づく。②野生型において Y145 側鎖 ($-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$) がある場所に、Y145G (側鎖-H) では 5 個の水分子が入る。③S205 側鎖が 2 種類の構造 (double conformation) をとる。④E222 側鎖が S205 から遠ざかるように約 1.7 Å 移動する。

これらの構造の違いから、野生型よりも Y145G 変異体の蛍光寿命が短くなる理由を以下のように説明することができる。野生型の発色団は周辺アミノ酸によって完全にパッキングされ、内部自由度が少ない。そのため、振動緩和などの無輻射減衰過程が起こりにくく、蛍光寿命は長くなる。一方、Y145G 変異体では、変異により Y145 側鎖のあった場所に隙間 A ができる (Fig. 2)。隙間 A は G145 が β -バレル内部に移動するだけでは十分に補償されずに残る。さらに隙間 A に入った水分子と水素結合できるように、S205 側鎖が逆向きの構造が double conformation として現れる。逆向きの S205 側鎖は G145 主鎖カルボニル酸素とも新たに水素結合を形成する。その結果、野生型で観察された S205 側鎖-E222 側鎖間の水素結合が消失して距離が遠くなり、隙間 B ができる。最終的に発色団周辺には 2 か所の隙間ができる。その結果、 β -バレル中においても発色団の内部運動自由度が大きくなり、蛍光寿命が短くなると考えられる。

この説明は、145 番アミノ酸側鎖体積が小さい変異体ほど寿命が短くなるという傾向 (Fig. 1) と矛盾しない。今後は他の変異体についても検討し、蛍光寿命の体積依存性の起源を明らかにする。

【参考文献】

- [1] H. Hosoi, S. Hazama, and Y. Takeda, *Chem. Phys. Lett.*, **618**, 186 (2015).
- [2] 例えば、S. J. Remington, *Protein Science* **20**, 20, (2011).

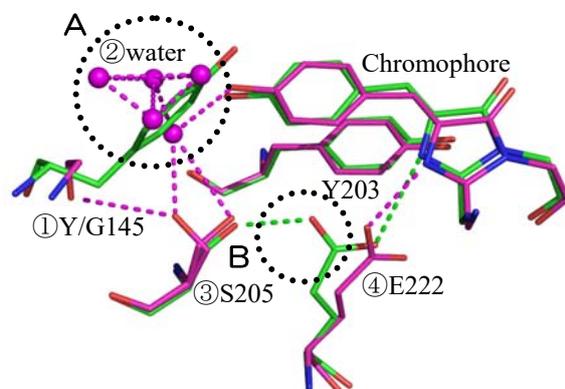


Fig. 2. Structures of eYFP wild type (green) and its Y145G mutant (red). The dotted lines indicate hydrogen bond. The dotted circles indicate the void around the chromophore.

一定の深さにおける細胞膜粘度評価法の開発

¹学習院大理, ²東工大化生研, ³京大院薬

○林春菜¹, Manjusha Joshi², 高田直人³, 高屋智久¹, 中村浩之², 申惠媛³, 岩田耕一³

Attempt to evaluate viscosity of plasma membranes at fixed depths

○Haruna Hayashi¹, Manjusha Joshi², Naoto Takada³, Tomohisa Takaya¹,
Hiroyuki Nakamura², Hye-Won Shin³, Koichi Iwata¹

¹ Faculty of Science, Gakushuin University, Japan

² Synthetic Organic Division, Tokyo Institute of Technology, Japan

³ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Japan

【Abstract】 Viscosity of a medium can be estimated by measuring the fluorescence lifetime of *trans*-stilbene with picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy because its photoisomerization rate constant shows a good correlation with the viscosity of the surrounding media. Recently, we evaluated the viscosity inside the lipid bilayer membranes of DMPC liposomes at fixed depths by using fatty acids with a *trans*-stilbene moiety as probe molecules. The result indicates that these lipid bilayers have lateral distribution of the viscosity at fixed depths. In this research, we estimated the viscosity inside membranes of HeLa cells at fixed depths by measured fluorescence lifetime of enclosed *trans*-4-hydroxystilbene and fatty acids modified with *trans*-stilbene. The measurement suggests that membranes of HeLa cells are more heterogeneous in the lateral direction than artificial lipid bilayers.

【序】 細胞膜近傍での化学反応によって細胞内外の物質輸送やシグナル伝達などの機能が実現している。これらの機能は通常的人工ベシクルにはなく細胞がもつ特別なはたらきである。反応場としての細胞膜を理解するためには、その粘度や極性といった基礎的な物性の測定が重要である。われわれは、人工脂質二重膜中に可溶化したスチルベン修飾脂肪酸のけい光寿命から、人工脂質二重膜の粘度が深さにより変化することを明らかにした。また、一定の深さにおいて2種類の粘度が得られたことから、脂質二重膜には疎密の不均一性が存在すると結論づけた。この結論は、脂質ラフトの存在と矛盾しない。本研究では、*trans*-4-ヒドロキシスチルベン (*t*SB-OH) およびスチルベン修飾脂肪酸をプローブ分子として細胞膜に封入し、そのけい光スペクトルおよびけい光減衰の測定から細胞膜の粘度の算出を試みた。

【方法 (実験・理論)】

HeLa 細胞の細胞膜中に封入した *t*SB-OH のけい光寿命をピコ秒時間分解けい光分光計により測定した。再生増幅された Ti:sapphire レーザーの出力を OPA を経て時間幅 40 fs、波長 320 nm のパルス光に変換し、この光を励起光として試料に照射した。得られたけい光を分光器に導入して、ストリークカメラによって時間分解検出した。試料部では、HeLa 細胞を培養液とともに 1cm 角セルに入れて温度可変のセルホルダー中に保持するか、あるいは培養フラスコをそのまま室温 (25°C) で保持した。

【結果・考察】

ピコ秒時間分解けい光分光測定によって *t*SB-OH を封入した HeLa 細胞と *t*SB-OH を含まない細胞の時間分解けい光スペクトルをそれぞれ 37°C で得た (Fig. 1.(a))。また、それらの差スペクトルから細胞膜中に封入された *t*SB-OH の時間分解けい光スペクト

ルとして得た (Fig. 1.(b)). また、波長 375 nm から 530 nm における *t*SB-OH のけい光減衰曲線を得た (Fig. 2.). けい光寿命の逆数は放射減衰速度定数と光異性化速度定数の和で表すことができる。アルカン溶液中において、*t*SB の光異性化速度定数は溶媒の粘度と相関をもって変化する[1, 2]。 *t*SB-OH にも同様の相関があることを確認し、光異性化速度定数と粘度の較正曲線を作成して、*t*SB-OH の周囲での粘度を見積もることに成功した。 Fig. 2. のけい光減衰曲線は、単一指数関数では再現できない。細胞膜の中でも不均一な粘度の分布が検出できた。リポソーム脂質二重膜中に封入した場合と比べて単一指数関数減衰からの解離が大きくなっている。このけい光減衰曲線を三重指数関数で近似して得られた寿命から、細胞膜には面内方向に粘度が 20 倍以上異なる領域があることが明らかとなった。これは、脂質ラフトに対応する密な部分と非ラフトに対応する疎な部分に封入されたそれぞれの *t*SB-OH の周囲の粘度を反映していると考えられる。また、脂質二重膜では温度変化によってゲル相から液晶相に転移すると粘度が小さくなるのに対して [2]、細胞膜では 30°C や 44°C よりも 37°C において最も粘度が小さくなることが示唆された。温度依存性の詳細、およびプローブ分子としてスチルベン修飾脂肪酸を用いた実験結果について当日議論する。

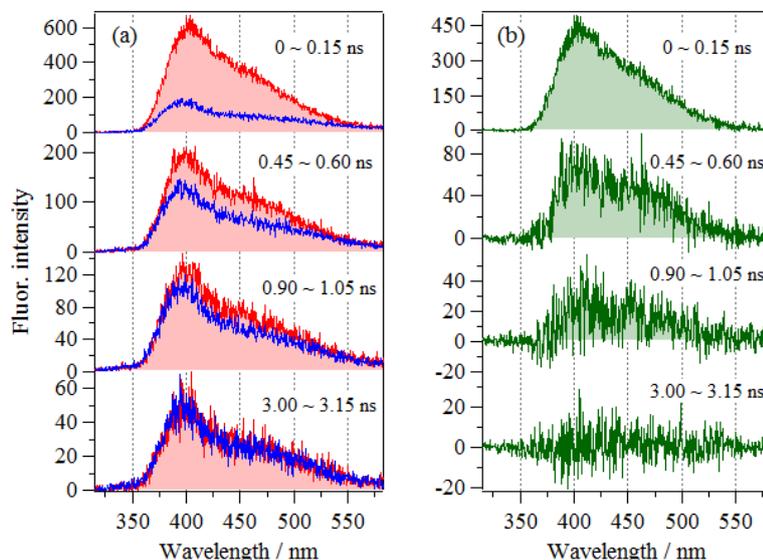


Fig. 1. (a) Time-resolved fluorescence spectra of a HeLa cell with (red) and without (blue) enclosed *t*SB-OH and (b) fluorescence signals of *t*SB-OH obtained after subtracting the HeLa cell fluorescence (green).

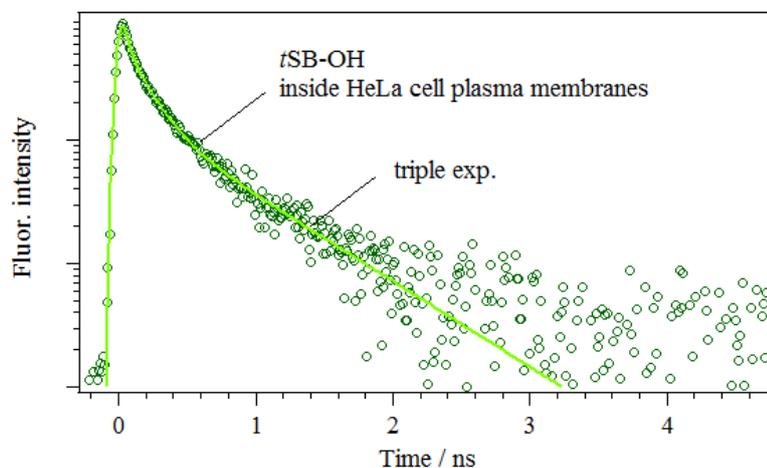


Fig. 2. Fluorescence decay curve of *t*SB-OH inside HeLa cell plasma membranes.

【参考文献】

- [1] S. H. Courtney, S. K. Kim, S. Canonica and G. R. Fleming, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **82**, 2065 (1986).
 [2] Y. Nojima and K. Iwata, *J. Phys. Chem. B* **118**, 8631 (2014).