

## 一酸化窒素還元酵素の電気化学制御表面増強赤外吸収分光計測

<sup>1</sup>北大院地球環境, <sup>2</sup>北大院環境科学, <sup>3</sup>理研SPring-8

○加藤 優<sup>1,2</sup>, 中川省吾<sup>2</sup>, 増田侑也<sup>2</sup>, 當舎武彦<sup>3</sup>, 中田耕<sup>1,2</sup>, 八木一三<sup>1,2</sup>

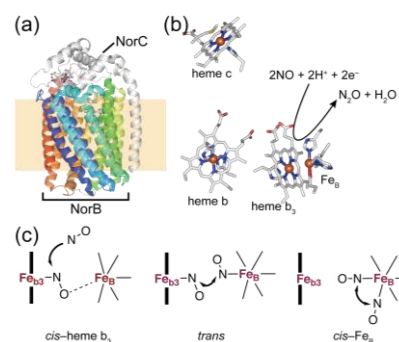
### Surface-enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase under Potential Control

○Masaru Kato<sup>1,2</sup>, Shogo Nakagawa<sup>2</sup>, Yuya Masuda<sup>2</sup>, Takehiko Tosha<sup>3</sup>,  
Kou Nakata<sup>1,2</sup>, Ichizo Yagi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University, <sup>2</sup> Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, <sup>3</sup> Spring-8 Center, RIKEN, Japan

**【Abstract】** Nitric oxide reductases (NORs) are a transmembrane metalloenzyme and reduce nitric oxide to nitrous oxide in the denitrification pathway of the global nitrogen cycle. The enzymatic NO reduction catalyzed by NORs occurs at the binuclear iron active site of heme  $b_3$  and a non-heme  $Fe_B$ . The determination of reduction potentials of these iron cofactors will help us elucidate the enzymatic reaction mechanism. However, previous reports on these potentials remain controversial. Herein, we performed electrochemical and surface-enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopic measurements of *Pseudomonas aeruginosa* NOR immobilized on gold electrodes. Cyclic voltammograms exhibited a reduction peak at  $-0.44$  V vs. SHE, and a SEIRA spectrum of NOR-immobilized electrodes using a vibrational probe of CO showed a characteristic band at  $1972\text{ cm}^{-1}$  at  $-0.4$  V vs. SHE, which was assigned to  $\nu_{CO}$  of heme  $b_3$ -CO. These results suggest that the reduction of heme  $b_3$  initiates the enzymatic NO reduction.

**【序】**一酸化窒素還元酵素(NOR)は、一酸化窒素(NO)から亜酸化窒素( $N_2O$ )への還元反応を触媒する膜貫通型金属酵素である(**Fig. 1a**)。  $N_2O$ は  $CO_2$ の約300倍もの地球温暖化係数を有し、また、オゾン層破壊物質の1つでもあり、大気中の  $N_2O$ の約7割がNORによって生成されていると言われている[1]。そのため、環境変動抑制などの観点で、NORによる  $N_2O$ 生成機構の解明が望まれている。NORの触媒反応機構には、NORが持つ4つの鉄補因子のうち heme  $b_3$ と非ヘム鉄  $Fe_B$ から構成される2核鉄錯体反応サイト(**Fig. 1b**)が関与しており、3つの反応機構(**Fig. 1c**)が提案されている。反応機構を解明するために、過去に酸化還元滴定などにより heme  $b_3$ と  $Fe_B$ の酸化還元電位が決定されているが、赤外吸収分光法のような分子構造を反映した分光計測による決定は未だなされていない。



**Fig. 1.** (a) Structures of cNOR (PDB: 3O0R) from *P. aeruginosa*. (b) The arrangement of the iron cofactors in cNOR. (c) Three proposed NO reduction reaction mechanisms: *cis*-heme  $b_3$ , *trans*, and *cis*- $Fe_B$ .

本研究では、cytochrome  $c$ 依存型NOR(cNOR)をAu電極表面に固定化し、そのタンパク質フィルム電気化学(protein film electrochemistry)により酸化還元応答および電気化学的NO還元反応を調べ、そして、赤外振動プローブとして一酸化窒素(CO)を用い

た cNOR 修飾 Au 電極の表面増強赤外吸収(SEIRA)分光計測により, heme  $b_3$  および  $\text{Fe}_B$  の還元電位を決定した.

【方法 (実験)】 cNOR は緑膿菌である *P. aeruginosa* から単離生成した[2]. 無電解メッキ法[3]により, 半円筒 Si プリズム表面に Au メッキすることで cNOR 修飾用 Au 基板を作製した. cNOR は Au 基板表面に直接修飾, または, カルボキシ基を末端に有するアルカンチオールにより自己組織化単分子層を Au 表面に形成し, アミド結合形成試薬を用いた共有結合により修飾した. SEIRA スペクトルは, Kretschmann 配置, 入射角度  $70^\circ$  で取得した. 電極構成は 3 電極式を採用し, 作用極に NOR 修飾 Au 電極, 対極に Pt, 参照極に  $\text{Ag}|\text{AgCl}$  (sat. KCl) を用いた.

【結果・考察】 cNOR の電極表面固定化前後で SEIRA スペクトルを測定した結果, cNOR 電極表面修飾後の電極においてアミド I とアミド II に由来するバンドを確認した. この結果は cNOR が電極表面に固定化されていることを示唆している. また, cNOR 修飾 Au 電極の電気化学的 NO 還元活性を調べるために, cNOR 修飾および未修飾 Au 電極を用いて, Ar および NO 雰囲気下でリニアスイープボルタモグラム(LSV)を取得したところ, cNOR 固定化電極において NO 雰囲気下で  $-0.4 \text{ V vs. SHE}$  付近に還元電流を観測した (Fig. 2). これは電極表面に

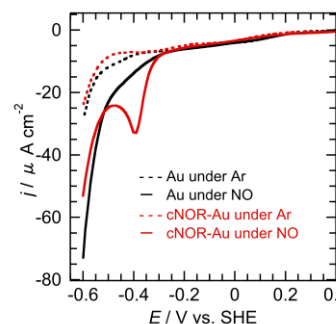


Fig. 2. (a) LSVs of cNOR-modified and unmodified Au electrodes recorded under Ar or NO.

固定化された cNOR が触媒活性を保持した状態で固定化されている, すなわち変性していないことを示唆している. 更に, 電位制御下で Au 電極表面に固定化した cNOR に CO を吸着させた後に, SEIRA スペクトルを取得したところ,  $-0.4 \text{ V vs. SHE}$  において  $1972 \text{ cm}^{-1}$  に特徴的なバンドを観測し (Fig. 3), 過去の報告[4]から, heme  $b_3$ -CO に帰属することができた. このことから heme  $b_3$  が  $-0.4 \text{ V vs. SHE}$  で鉄イオンが還元( $\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$ )されることで, CO が heme  $b_3$  に配位したと考えられる.

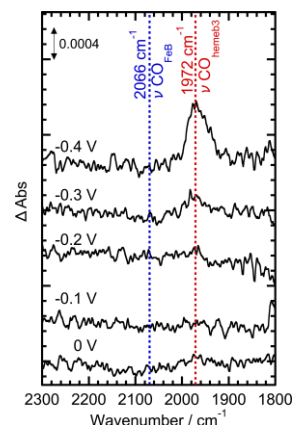


Fig. 3. SEIRA spectra of CO-adsorbed cNOR under potential control.

以上の結果を踏まえると, heme  $b_3$  の還元が引き金となり, cNOR による電極触媒的 NO 還元が起こることが明らかとなった. このことから heme  $b_3$  が反応に関与していることは明らかであり, 過去に提案されている 3 つの反応機構のうち, heme  $b_3$  が介在しない *cis*  $\text{Fe}_B$  反応機構 (Fig. 1c) を否定する結果となった[5].

### 【参考文献】

- [1] D.J. Wuebbles, *Science* **326**, 56 (2009).
- [2] T. Hino, Y. Matsumoto, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Fukumori, T. Murata, S. Iwata and Y. Shiro, *Science* **330**, 1666 (2010).
- [3] M. Yaguchi, T. Uchia, K. Motobayashi and M. Osawa, *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 3097 (2016).
- [4] N. Sato, S. Ishii, H. Sugimoto, T. Hino, Y. Fukumori, Y. Sako, Y. Shiro, T. Tosha, *Proteins* **82**, 1258 (2014).
- [5] M. Kato, S. Nakagawa, T. Tosha, Y. Shiro, Y. Masuda, K. Nakata, I. Yagi, *submitted*.

## 時間分解赤外分光法および凍結トラップX線結晶構造解析によるP450nor 反応中間体の解析

<sup>1</sup>兵庫県立大 院生命, <sup>2</sup>理研 SPring-8, <sup>3</sup>理研 CLST, <sup>4</sup>University of Liverpool,  
<sup>5</sup>東大 院理

○ 野村高志<sup>1</sup>, 當舎武彦<sup>2</sup>, 杉本宏<sup>2</sup>, 久野玉雄<sup>3</sup>, 山際来佳<sup>1</sup>, ChaiGopalasingam<sup>4</sup>,  
山下恵太郎<sup>5</sup>, 平田邦生<sup>2</sup>, 山本雅貴<sup>2</sup>, 城宣嗣<sup>1</sup>, 久保稔<sup>1</sup>

### Reaction Intermediate Analysis of P450nor by Using Time-resolved IR Spectroscopy and Freeze-trap X-ray Crystallography

○ Takashi Nomura<sup>1</sup>, Takehiko Tosha<sup>2</sup>, Hiroshi Sugimoto<sup>2</sup>, Tamao Hisano<sup>3</sup>, Raika Yamagiwa<sup>1</sup>,  
Chai Gopalasingam<sup>4</sup>, Keitaro Yamashita<sup>5</sup>, Kunio Hirata<sup>2</sup>, Masaki Yamamoto<sup>2</sup>, Yoshitsugu  
Shiro<sup>1</sup>, Minoru Kubo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Japan

<sup>2</sup>RIKEN SPring-8 center, Japan

<sup>3</sup>RIKEN CLST, Japan

<sup>4</sup>Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, United Kingdom

<sup>5</sup>Department of Biological Sciences, The University of Tokyo, Japan

**【Abstract】** P450nor is a heme enzyme that catalyzes the reduction of NO to N<sub>2</sub>O in the denitrification. In the catalytic reaction, NO is reduced by two electrons directly transferred from NADH. The resulting highly-activated species (intermediate-I) is the key intermediate to understand NO reduction reaction of P450nor. However, its electronic and geometric structures are not yet known. Here, we successfully characterized the coordination and protonation structures of intermediate-I of P450nor by the combinational use of freeze-trap XFEL crystallography at SACLA and time-resolved IR spectroscopy. The crystallography revealed that NO in intermediate-I is bound to the heme in a highly bent form, with a Fe-N-O angle of ca. 120°. On the other hand, the NO stretching IR signal of intermediate-I was observed at 1330 cm<sup>-1</sup>, assignable to the single protonated state (Fe-NHO). On the basis of the N-O vibrational data and the Fe-N-O coordination geometry, the QM/MM calculation is underway to further elucidate the electronic structure and reactivity of intermediate-I.

**【序】** 脱窒カビ (*Fusarium oxysporum*) 由来の一酸化窒素還元酵素 P450nor は、地球上の窒素循環において、一酸化窒素 (NO) を亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) へと還元するヘム酵素である。P450nor の酵素反応では、(1) 酸化型のヘム (Fe<sup>3+</sup>-H<sub>2</sub>O) に NO が結合した後、(Fe<sup>3+</sup>-NO 型の生成) (2) NADH からのヒドリド (H<sup>-</sup>) 移動によって、NO が 2 電子還元される (中間体 I の生成)。最後に (3) 中間体 I と 2 分子目の NO が反応することで N<sub>2</sub>O が生成し、系は酸化型に戻る (2NO + NADH + H<sup>+</sup> → N<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>O + NAD<sup>+</sup>) (Fig. 1)。

中間体 I は NO 活性型であり、NO 還元反応の鍵を握っている中間体である。しかし、中間体 I は不安定種であり観測が困難なため、その配位構造やプロトン化状態 (Fe-

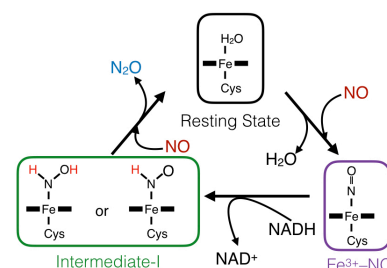


Fig. 1 Reaction cycle of P450nor

NHO or Fe-NHOH) は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、P450nor の反応機構を解明するために、X線結晶構造解析と赤外分光法を併用し、中間体 I の配位構造とプロトン化状態の決定を目指した。

**【方法】** P450nor の酵素反応を駆動するために、紫外光励起により NO を放出するケージド NO を用いた。P450nor にケージド NO と NADH を混合し、紫外光を照射することで NO 還元反応を開始できる。これまでに時間分解可視吸収分光法を適用し、中間体 I はケージド NO 光励起後、結晶相では秒、溶液相ではサブミリ秒の時間スケールで生成することを明らかにしている<sup>1</sup>。そこで、X線結晶構造解析では凍結トラップ法、赤外分光測定ではポンププローブ法により中間体 I を観測することにした。

X線結晶構造解析では、ケージド NO と NADH を浸潤させた微結晶をメッシュループに多数散布し、ケージド NO 光励起 3 秒後に微結晶を急速凍結することで中間体 I の凍結微結晶を調製した。凍結微結晶を X線自由電子レーザー (XFEL) 施設 SACLA に持ち込み、シリアル測定によって 1 結晶 1 照射条件で無損傷構造解析した。

一方、時間分解赤外分光では、ケージド NO 光励起後の時間分解スペクトルを測定した。スペクトルは、(1) ケージド NO 光励起前との差スペクトルを計算し、(2) その差からケージド NO 由来のピークを差し引き、最後に(3) <sup>14</sup>NO を用いた結果と <sup>15</sup>NO を用いた結果の差を評価することで (triple difference)、ヘムに結合した NO 伸縮振動を検出した。

**【結果・考察】** 中間体 I の XFEL 結晶構造解析結果を Fig. 2 に示す (分解能 1.8 Å)。Fe-N-O 角は約 120° であった。Fe<sup>3+</sup>-NO 型の Fe-N-O 角は約 160° のため<sup>1</sup>、ヒドリドによる 2 電子還元によって、ヘムに結合した NO はヘム法線から大きく傾くことがわかる。一方、Fe-N 結合軸は、中間体 I では 90° に近かった。

Fig. 3 に時間分解赤外分光測定の結果を示す。赤が実測スペクトル、黒がガウシアンでフィッティングしたスペクトル、青と緑がその分割成分である。この時間分解スペクトルには、同位体シフトを示す 2 本のシグナルが含まれていた。1 つは 1330 cm<sup>-1</sup> ( $\Delta^{15}\text{N} = 32 \text{ cm}^{-1}$ 、青) のシグナルで、サブミリ秒のタイムスケールで増加した。もう 1 つは 1289 cm<sup>-1</sup> ( $\Delta^{15}\text{N} = 27 \text{ cm}^{-1}$ 、緑) のシグナルで、1330 cm<sup>-1</sup> の減少に伴いミリ秒で増加した。1330 cm<sup>-1</sup> のシグナルは、NHO が結合したヘムモデル化合物の NO 伸縮振動数<sup>2</sup> とほぼ一致する事から、Fe-NHO の NO 伸縮振動に帰属される。一方、1289 cm<sup>-1</sup> のバンドは、まだ帰属に至っていない。

現在、1289 cm<sup>-1</sup> の帰属のために重水や NADD を使った解析を進めるとともに、得られた配位構造とプロトン化状態を踏まえて QM/MM 電子状態解析を進めている。

#### 【参考文献】

- [1] Tosha et al., *Nat Commun.*, **8**, 1585 (2017)  
 [2] Abucayon, E. G. et al., *Dalton Trans.*, **45**, 18259 (2016).

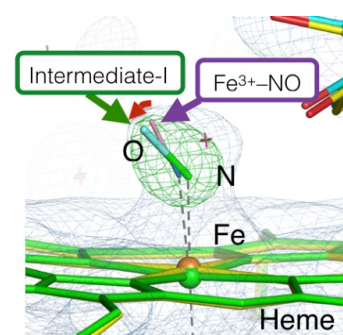


Fig. 2 X-ray structures of Fe<sup>3+</sup>-NO and intermediate-I

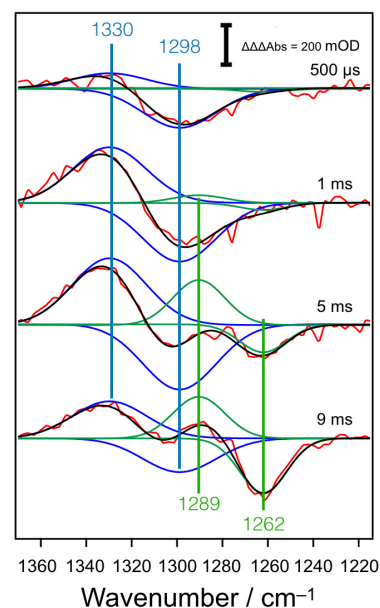


Fig. 3 Time-resolved IR spectra of P450nor

## エレクトロスプレー・冷却イオントラップレーザー分光法による天然変性タンパク質 $\alpha$ シヌクレイン部分ペプチド-低分子リガンド複合体の構造研究

<sup>1</sup>東工大院生命理工, <sup>2</sup>理論創薬研究所, <sup>3</sup>東工大科創院化生研  
○田端みずき<sup>1,3</sup>, 吉森篤史<sup>2</sup>, 中野洋文<sup>3</sup>, 石内俊一<sup>1,3</sup>, 藤井正明<sup>1,3</sup>

### Structural study on a partial peptide of intrinsically disordered protein $\alpha$ -synuclein - small ligands complexes by electrospray / cold ion trap laser spectroscopy

○Mizuki Tabata<sup>1,3</sup>, Atsushi Yoshimori<sup>2</sup>, Hirofumi Nakano<sup>3</sup>, Shun-ichi Ishiuchi<sup>1,3</sup>, Masaaki Fujii<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Japan

<sup>2</sup> Institute for Theoretical Medicine, Inc., Japan

<sup>3</sup> Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Japan

#### 【Abstract】

Aggregated intrinsically disordered protein (IDP) triggers neurodegenerative disorders, thus therapeutic strategy for the disease is targeting IDPs. Recently small ligands to inhibit IDP aggregation has been found, but highly dynamic nature of IDP-small ligand complexes complicates the use of the conventional structural biological approach such as NMR and X-ray crystallography. Here we report the bottom-up approach; infrared spectroscopy combined with electrospray / cold ion trap mass spectrometry is applied to complexes of dopamine/dopamine analogues and its binding motif in  $\alpha$ -synuclein, which is an IDP associated with Parkinson's disease.

#### 【序】

タンパク質の機能はその固有の立体構造により説明できる、と考えるのが構造生物学の大前提である。しかしながら、生理的条件下で固有の立体構造を形成しないにも関わらず機能を発揮するタンパク質が多数発見されている[1]。このようなタンパク質は天然変性タンパク質 (IDP) と呼ばれ、多様な分子と結合することによって多くの生体内プロセスに関与している。そのため IDP は凝集しやすく、パーキンソン病など神経変性疾患の多くは原因 IDP の凝集との関連が指摘されている。この治療薬開発を目指し原因 IDP の凝集を阻害する低分子リガンドが発見されているが[2]、その複合体の構造揺らぎが大きいために従来の構造生物学的手法 (NMR、X 線結晶構造解析など) を適用できず作用機序の理解につながる結合様式の解明が困難である。そこで私たちはこの問題に対し、結合部位を切り出した部分ペプチドと低分子リガンドとの複合体の構造をエレクトロスプレー・冷却イオントラップ法とレーザー分光法により調べるボトムアップアプローチ[3]を適用することを着想した。本研究では、パーキンソン病原因タンパク質である  $\alpha$  シヌクレインとその低分子凝集阻害剤であるドーパミン及びドーパミン類似体に着目した。 $\alpha$  シヌクレインのドーパミン

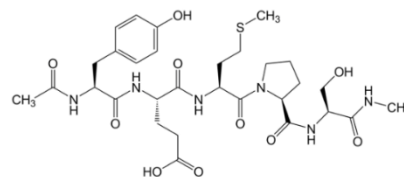


Fig. 1. Formula of Ac-YEMPS-NHMe.

結合モチーフである  $^{125}\text{YEMPS}^{129}$  の両末端を保護した Ac-YEMPS-NHMe (Fig. 1、以降 YEMPS) とその低分子リガンドであるドーパミン/ドーパとの複合体の結合様式を調べることを目的とした。

### 【実験方法】

ドーパミン/ドーパはアミノ基をもち、生理条件下ではプロトン化されている。そこで、プロトン化ドーパミン/ドーパと YEMPS の複合体をエレクトロスプレーイオン法により生成し、真空中に導入した。これを冷却イオントラップで捕捉・冷却した。ここに  $\text{H}_2$  ガスを 20% 含んだ He ガスを導入することにより、複合体の  $\text{H}_2$  クラスタを生成した。ここに赤外レーザーを照射し、波長掃引した。赤外波長が分子の振動準位に一致すると、 $\text{H}_2$  分子と複合体イオンに解離する。解離生成する複合体イオン（解離フラグメントイオン）量を飛行時間型質量分析器で検出しながら赤外レーザーを波長掃引することで、赤外吸収スペクトルに相当する赤外光解離 (IRPD) スペクトルを測定した (Fig. 2)。過去の研究によれば  $\alpha$  シヌクレインの 125-129 残基の結合モチーフはドーパミン/ドーパのカテコールの部分と結合することが示唆されている[4]。ドーパミン/ドーパのプロトン化アミノ基はペプチドと強く相互作用することが分かっており[3]、その様な構造を排除するために、プロトン化アミノ基を 18-crown-6-ether (CE) で包接保護した。

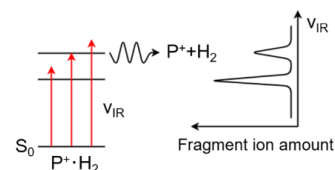


Fig. 2. IRPD spectroscopy.

### 【結果・考察】

まず、目論見通りリガンド分子がカテコール OH 基で YEMPS と結合しているかを調べるために、YEMPS-ドーパミン/ドーパ-CE 複合体の XH 伸縮振動領域の IRPD スペクトルを測定した (Fig. 3a, b)。振動数から、 $3050\sim 3530\text{ cm}^{-1}$  を NH 伸縮振動、 $3530\sim 3700\text{ cm}^{-1}$  を OH 伸縮振動と帰属した。OH 伸縮振動領域に着目すると、CE でアミノ基を保護していない複合体 (Fig. 3c, d) で観測される free のカテコール OH ( $\sim 3650\text{ cm}^{-1}$ )、分子内水素結合カテコール OH ( $\sim 3580\text{ cm}^{-1}$ ) 伸縮振動バンドがドーパミン/ドーパ-CE 複合体両方で観測されていない。これは、両カテコール OH 基が YEMPS と強い水素結合を形成したため、これらのバンドがレッドシフトしたためだと考えられる。この結果から、CE でリガンドのアミン側鎖を包接保護したことにより、目論見通り両カテコール OH 基が YEMPS と結合している複合体を選択的に生成できた結論できる。先行研究では  $\alpha$  シヌクレインのドーパミン結合モチーフはリガンド結合時に何らかの二次構造を形成していることは示唆されているが[4]、その立体構造については未だに明確な結論が出ていない。講演では、二次構造を反映する amide-I バンドに基づいて、YEMPS の立体構造について議論する。

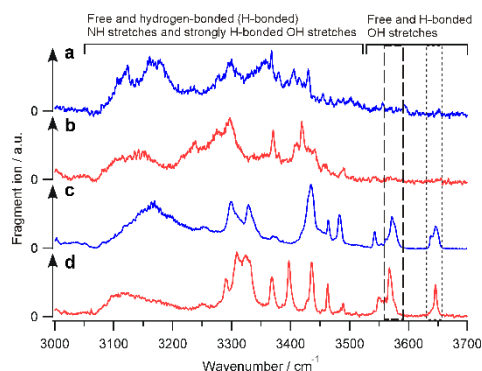


Fig. 3. IRPD spectra of the X-H stretching region of (a) YEMPS-dopamine-CE, (b) YEMPS-dopa-CE, (c) YEMPS-dopamine, and (d) YEMPS-dopa. Vibrational region of free OH stretching vibration of catechol is shown by the dotted rectangle, while that of the (weak) intramolecular hydrogen-bonded OH vibrations of catechol is marked by the dashed rectangle.

### 【参考文献】

- [1]P. E. Wright, et al., *J. Mol. Biol.* **293**, 321 (1999). [2]R. Cuchillo, et al., *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1004 (2012). [3]T. Sekiguchi, et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **57**, 5626 (2018). [4]F. E. Herrera, et al., *PLoS One.* **3**, e3394 (2008).

## サル緑視物質の塩化物イオン結合におけるQ114の構造的な役割

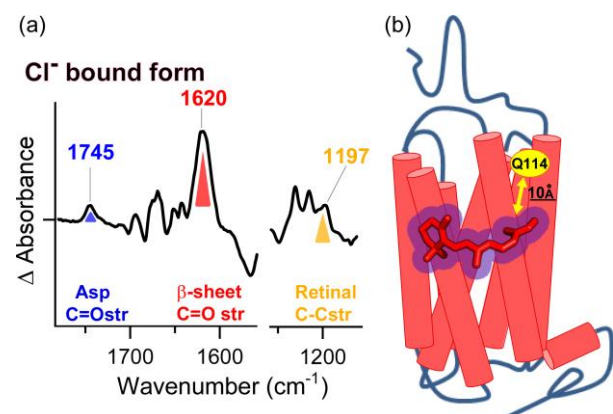
<sup>1</sup>名工大院工, <sup>2</sup>京大霊長研○片山耕大<sup>1</sup>, 中村駿太<sup>1</sup>, 佐々木琢磨<sup>1</sup>, 今井啓雄<sup>2</sup>, 神取秀樹<sup>1</sup>Structural role of Q114 for Cl<sup>-</sup> binding in primate green-sensitive visual pigment○Kota Katayama<sup>1</sup>, Shunta Nakamura<sup>1</sup>, Takuma Sasaki<sup>1</sup>, Hiroo Imai<sup>2</sup>, Hideki Kandori<sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, Japan<sup>2</sup> Primate Research Institute, Kyoto University, Japan

## 【Abstract】

Long-wavelength-sensitive (LWS) pigments, which belong to one of four classes of vertebrate cone visual pigment, possess a chloride binding site in its protein moiety. The binding of chloride alters the absorption spectra of LWS; this is known as the chloride effect. Recently, we successfully observed chloride binding-induced structural change of monkey green (MG) pigment by ATR-FTIR spectroscopy, from which structural information of the putative chloride binding site was elicited including secondary structure of  $\beta$ -sheet, the hydroxyl group of Tyr, and the protonation state of carboxylate. Here, we report that Q114 plays crucial role for chloride binding. Although Q114 is located far away from the chloride binding site due to crystal structure of rhodopsin, the chloride effect is decreased by mutation at position Q114, indicating that chloride cannot bind properly in the protein moiety. Low-temperature FTIR spectroscopy also detects the loss of important structural element for chloride binding by Q114 mutation. Accompanying with protein-bound water analyses and ATR-FTIR study, our results provide insight into the role that Q114 selectively regulates the anion binding.

【序】我々が様々な色を識別できるのは、吸収極大波長の異なる 3 種類の色覚視物質が網膜に存在するからである。これらは同一の発色団分子 11-*cis* レチナールをもつが、タンパク質部分がレチナールの電子状態を制御する結果、色の識別が可能になる。それに加えて色覚視物質の中には、塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>) が結合すると吸収波長が長波長シフトするグループ (グループ L) があり、その波長シフトの分子機構が注目されている[1]。最近我々は、水溶液中でのスペクトル測定が可能な全反射赤外分光法を用いて、サル緑視物質における Cl<sup>-</sup>の結合・解離に伴う構造変化を直接観測することに成功した[2]。その結果、Cl<sup>-</sup>結合によってタンパク質内部の $\beta$ -シート構造が安定化されることを見出した。さらにレチナールやアミノ酸の一官能基の構造変化を捉え、サル緑視物質の Cl<sup>-</sup>結合部位の構造情報を得ることができた。

本発表では、新たに Q114 が Cl<sup>-</sup>の結合に重要であることを発見したので報告する。



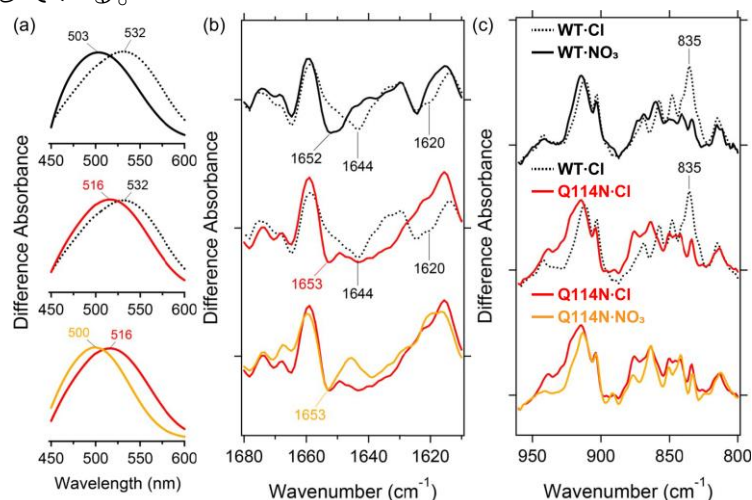
**Fig. 1.** (a) Cl<sup>-</sup> bound induced ATR-FTIR difference spectrum of MG. (b) Structural model of MG based on the crystal structure of bovine rhodopsin.

明暗を認識する (ウシ) ロドプシンの結晶構造を参考にすると、Q114 (ロドプシンの S98) は第二ヘリックスの細胞外側に位置し、Cl<sup>-</sup>結合部位と考えられるレチナール近傍からは 10 Å 程度離れている。従って、Q114 がどうやって Cl<sup>-</sup>結合に影響をもたらすのか、構造基盤に立脚して明らかにすることで、グループ L における Cl<sup>-</sup>結合機構の理解を深められると期待する。具体的には、Q114 の変異体に対する赤外分光法と紫外可視分光法を用いた構造解析を実行し、野生型との比較を行う。

**【方法 (実験・理論)】**哺乳類あるいは昆虫細胞により、サル緑視物質を発現・精製し、PC リポソームへ再構成した。Cl<sup>-</sup>非結合型、硝酸イオン (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 結合型試料を得るため、再構成における透析時に、Cl<sup>-</sup>の代わりに塩なしあるいは NO<sub>3</sub><sup>-</sup>存在下での緩衝液を用いた。再構成試料 30 μL を赤外測定用窓板に滴下し乾燥フィルムを作製した後、D<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub><sup>18</sup>O で水和、77 K での光照射前後の赤外差スペクトルを測定した。一方再構成試料 数μL を全反射赤外分光装置のシリコンプリズムに滴下し、乾燥させた後、Cl<sup>-</sup>を含む緩衝液を還流させた。その後、塩あり/なしでの赤外差スペクトルを計測した。

**【結果・考察】** Fig. 2a は緑視物質の野生型と Q114N 変異体の Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>結合型の紫外可視吸収スペクトルを示している。野生型の Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>結合型で 30 nm 程度の波長シフトが確認されており、過去の文献とも一致した[1]。一方で Q114N では両者における波長シフト幅が小さくなり (16 nm)、Cl<sup>-</sup>効果が減少した。Cl<sup>-</sup>がレチナール近傍に結合するのに対し、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>はイオンサイズが大きいいためレチナール近傍に結合できないことを全反射赤外分光解析により示してきたが[2]、Q114N の結果は、Cl<sup>-</sup>がレチナール近傍に結合できないことを示唆している。

Fig. 2b, c は 77 K における光反応初期中間体バツと始状態との赤外差スペクトルを比較したものである。Fig. 2c において野生型の Cl<sup>-</sup>結合型にのみ表れた 835 cm<sup>-1</sup> バンドは、レチナールの C<sub>14</sub> 位の面外変角振動 (HOOP) に対応し、Cl<sup>-</sup>結合の指標バンドとして知られているが[3]、Q114N では Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>いずれの結合型でもバンドが消失した。つまり、Q114 の変異により構造的に Cl<sup>-</sup>がレチナールの C<sub>14</sub> 位近傍に結合できなくなったことを示している。また Fig. 2b における野生型の Cl<sup>-</sup>結合型で観測される 1644, 1620 cm<sup>-1</sup> バンドが、野生型の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>結合型および Q114N のいずれのイオン結合型でも消失した。これらのバンドはβ-シート構造に特徴的な amide-I バンドの振動数に対応しており、Cl<sup>-</sup>結合でのみβ-シート構造が安定化されたことを示唆している。この結果は過去の全反射赤外分光の結果とも一致する[2]。本発表では、内部結合水の違いや、全反射赤外分光測定の結果も合わせ、Q114 が Cl<sup>-</sup>の結合に果たす構造的な役割について議論する。



**Fig. 2.** (a) UV-visible spectra of the Cl<sup>-</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> bound form of WT and Q114N measured at 293 K. (b, c) Light induced FTIR difference spectra of the Cl<sup>-</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> bound form of WT and Q114N measured at 77 K in the 1680-1610 (b) and 950-800 (c) cm<sup>-1</sup> region.

### 【参考文献】

- [1] Z. Wang *et al.* *Biochemistry* **32**, 2125 (1993). [2] K. Katayama *et al.* *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3381 (2018). [3] T. Hirano *et al.* *Biochemistry* **40**, 1385 (2001).



## 脊椎動物がもつ新規光センサーOpn5L1の不活性化状態の発色団構造

<sup>1</sup> 阪大院理, <sup>2</sup> 岡山大院医歯薬, <sup>3</sup> 京大院理, <sup>4</sup> 立命館大, <sup>5</sup> 神戸薬科大  
 ○水野 操<sup>1</sup>, 水谷 泰久<sup>1</sup>, 佐藤 恵太<sup>2</sup>, 大内 淑代<sup>2</sup>, 山下 高廣<sup>3</sup>, 酒井 佳寿美<sup>3</sup>,  
 今元 泰<sup>3</sup>, 七田 芳則<sup>3,4</sup>, 山野 由美子<sup>5</sup>, 和田 昭盛<sup>5</sup>

### Chromophore structure in an inactive state of a novel photosensor Opn5L1 of vertebrates

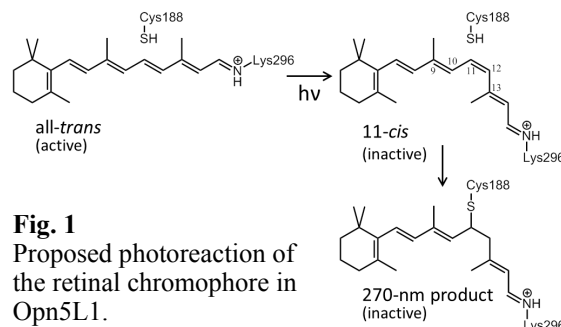
○Misao Mizuno<sup>1</sup>, Yasuhisa Mizutani<sup>1</sup>, Keita Sato<sup>2</sup>, Hideyo Ohuchi<sup>2</sup>, Takahiro Yamashita<sup>3</sup>, Kazumi Sakai<sup>3</sup>, Yasushi Imamoto<sup>3</sup>, Yoshinori Shichida<sup>3,4</sup>, Yumiko Yamano<sup>5</sup>, Akimori Wada<sup>5</sup>  
<sup>1</sup> Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Japan  
<sup>2</sup> Department of Cytology and Histology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Japan  
<sup>3</sup> Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kobe University, Japan  
<sup>4</sup> Research Organization for Science and Technology, Ritsumeikan University, Japan  
<sup>5</sup> Laboratory of Organic Chemistry for Life Science, Kobe Pharmaceutical University, Japan

#### 【Abstract】

Opn5L1 is a newly identified vertebrate opsin that functions as a Gi-coupled retinal receptor. Unlike conventional opsins including visual pigments, it exclusively binds to all-*trans*-retinal to form an active state. Photoisomerization from the all-*trans* to the 11-*cis* structure deactivates the protein and is followed by formation of a covalent adduct between retinal and nearby cysteine, which provides an absorption band at 270 nm, resulting in thermal re-isomerization to the initial structure. Therefore, Opn5L1 acts as a reverse photoreceptor that loses its activity by light. In this study, we measured resonance Raman spectra of the covalent adduct of Opn5L1 to identify which position in the retinal is bound by cysteine. Based on both the measurements of spectra of isotope substitutes and quantum chemical calculations, we determined the unique structure of the retinal-cysteine adduct.

#### 【序】

最近発見された Opn5L1 は、脊椎動物のオプシンの一種である。これまで発見されていた視覚オプシンを含む多くのオプシンとは異なり、11-シスレチナールとは結合せず、全トランスレチナールと結合して活性状態になるユニークさをもつ。基質であるレチナールは、発色団としても働く。レチナール発色団は光吸収により 11-シス体へ異性化し、Opn5L1 は不活性状態になる。その後、分子内のシステイン側鎖がレチナールに付加し、270 nm に吸収極大をもつ中間体（270 nm 付加体）に変化する。この中間体は、初期状態へ熱的に回復する。このことから、Opn5L1 は付加反応を利用し、11-シス体から全トランス体へ熱的に変化することが示唆されている (Fig. 1) [1]。本研究では、この付加反応を含む Opn5L1 の反応機構を明らかにするため、鍵となる 270 nm 付加体の共鳴ラマンスペクトルを観測した。同位体置換体のラマンスペクトル観測および量子化学計算に基づき、270 nm 付加体の構造を決定した。



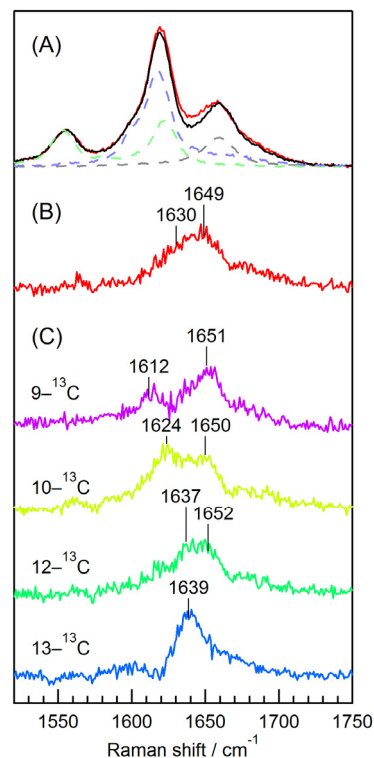
**Fig. 1**  
 Proposed photoreaction of the retinal chromophore in Opn5L1.

## 【結果と考察】

ニワトリ由来 Opn5L1 は界面活性剤により可溶化した試料をもちいた。これに対して、可視光 (>500 nm) を照射し 270 nm 付加体を生成した。光反応による発色団の吸収変化は、レチナールにシステイン残基が付加し、ポリエーテル鎖の共役系が切断されることに起因すると考えられている。励起光 238 nm で観測した 270 nm 付加体における発色団の共鳴ラマンスペクトルを Fig. 2A に示す。スペクトルには、発色団に由来するバンドの他に、タンパク質中にあるトリプトファン・チロシン、およびタンパク質の発現にもちいた細胞の脂質に由来するバンドが強く現れた。野生型 Opn5L1 と付加体を形成しない C188T 変異体のスペクトルを比較すると、 $1640\text{ cm}^{-1}$  付近の散乱光強度が異なっていた。アミノ酸置換したタンパク質が野生型と大きく構造が変わらないと仮定すると、観測されたスペクトル形状の違いは、270 nm 付加体の発色団の C=C 伸縮振動バンドと考えられる。そこで、野生型のスペクトルから、脂質および C188T 変異体のスペクトルを差し引き、270 nm 付加体の発色団のバンドを得た結果、 $1640\text{ cm}^{-1}$  付近に 2 本のバンドを観測した (Fig. 2B)。これらのバンドの帰属を行うために、ポリエーテル鎖の炭素原子を同位体置換した試料のスペクトルを観測した (Fig. 2C)。9 および 10 位の置換体のスペクトルでは低波数側のバンドが、13 位の置換体では高波数側のバンドが同位体シフトを示したのに対し、12 位の置換体では明確なシフトを示さなかった。これらの結果は、低波数側のバンドはイオン環側の C=C 伸縮振動モードに、高波数側のバンドはシッフ塩基側の C=C 伸縮振動モードに帰属されること、12 位の炭素は 2 重結合を形成していないことを示しており、これまでに提案されている 11 位の炭素原子へのシステイン付加を強く支持した。

さらに、270 nm 付加体の発色団モデルについて DFT 法 (B3LYP/6-311G\*\*) による量子化学計算を行った。シッフ塩基がプロトン化している条件では、 $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$  伸縮振動の振動数が著しく低く実験結果を再現しなかったのに対して、シッフ塩基が脱プロトン化した条件では、 $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$  伸縮振動の振動数がもっとも高波数側に現れることがわかり、実験結果をよく再現した。また、発色団モデル化合物である 11,12-ジヒドロレチナールシッフ塩基のラマンスペクトルにおいても、13 位の炭素原子を同位体置換した試料では、脱プロトン化状態でタンパク質と類似の同位体効果が観測された。これらの結果から、Opn5L1 のレチナール発色団は、270 nm 付加体において、11 位の炭素原子にシステインが付加し、シッフ塩基が脱プロトン化している構造をとっていることを結論した。

【参考文献】 [1] K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, A. Takeuchi, H. Gotoh, K. Ono, M. Mizuno, Y. Mizutani, S. Tomonari, K. Sakai, Y. Imamoto, A. Wada, Y. Shichida, *Nature Commun.* 9, 1255 (2018).



**Fig. 2** (A) Resonance Raman spectra of Opn5L1 excited at 238 nm. Red and black traces are Raman spectra of the wild type and the C188T mutant. Green, blue and gray broken traces indicate Raman spectra of tryptophan, tyrosine and lipid, respectively. (B) Difference spectrum obtained by subtracting the spectrum of the C188T mutant from that of the wild type, representing the Raman spectrum of the 270-nm product of Opn5L1. (C) Raman spectra of the isotope substitutes of the 270-nm product of Opn5L1. Intensities of the spectra in panels B and C were multiplied by 4.

## 青色光受容タンパク質PYPと下流分子PBPによる 複合体形成ダイナミクスの検出

<sup>1</sup>京大院理, <sup>2</sup>学習院大理, <sup>3</sup>奈良先端大物質

○金穂香<sup>1</sup>, 中曽根祐介<sup>1</sup>, 高門輝<sup>2</sup>, 山崎洋一<sup>3</sup>, 上久保裕生<sup>3</sup>, 寺嶋正秀<sup>1</sup>

### Complex formation dynamics of blue light sensor protein PYP and its downstream protein PBP

○Suhyang Kim<sup>1</sup>, Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Akira Takakado<sup>2</sup>, Yoichi Yamazaki<sup>3</sup>,  
Hironari Kamikubo<sup>3</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Kyoto University, Japan

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Gakushuin University, Japan

<sup>3</sup> Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, Japan

**【Abstract】** PYP is a bacterial blue light sensor protein regulating a negative phototactic response. It contains *p*-coumaric acid as a chromophore[1]. Upon photoexcitation, PYP undergoes a photocyclic reaction that begins with a *trans-cis* isomerization of the chromophore. Though the photochemistry of the chromophore has been studied extensively, the signal transduction mechanism is still under debate to a lack of information on downstream proteins. Recently, however, a partner protein which is called PYP binding protein (PBP) was identified for PYP from *Rhodobacter capsulatus*[2]. In this study, to understand the signaling mechanism, we investigated the reaction dynamics of the complex formation between PYP and PBP using the transient grating (TG) method. In the presence of PBP, a significant decrease of the diffusion coefficient of PYP was observed, representing a formation of the PYP-PBP complex. Analyzing a time development of the diffusion signal, we firstly determined the rate constants of several steps of the complex formation.

**【序】** PYP は紅色細菌の負の走行性に関わる青色光受容タンパク質である。発色団である *p*-クマル酸のトランス-シス異性化を起点として、プロトン移動や構造変化を伴う光反応サイクルを示す[1]。PYP はタンパク質間相互作用を媒介する PAS ドメインの一種であり、そのシグナル伝達機構が注目されているが、直接相互作用する下流分子が同定されていなかったため、信号伝達機構について未知な点が多い。しかし近年、紅色細菌 *Rhodobacter capsulatus* において PYP の下流分子 PBP が同定された[2]。溶液中でダイマー構造をとる PBP は PYP と光依存的に相互作用し、Fig. 1 に示すように多段階に複合体を形成することが小角 X 線散乱測定により予想されている[2] (Fig. 1)。本研究では、分子間の信号伝達機構を速度論的に明らかにするために、拡散係数変化という観点から複合体形成反応を時間分解で検出可能である過渡回折格子法 (TG 法) を用いて PYP と PBP による複合体形成ダイナミクスを検出することを目的とした。

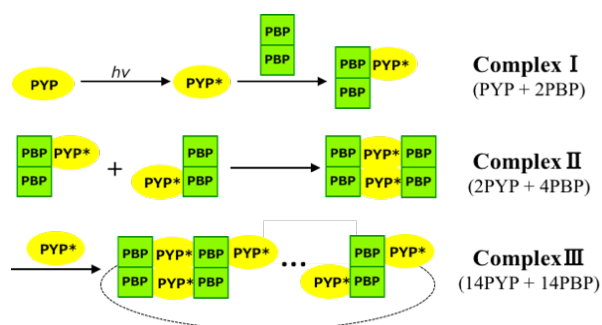


Fig. 1 Model of complex formation

【方法】TG 測定では、励起光として 462 nm のパルスレーザーを、プローブ光として 840 nm の CW レーザーを用いた。複合体形成を PYP の反応から分離するために、PYP のみの試料および PYP と PBP を混合した試料について測定した。

【結果・考察】PYP 単独の試料と PBP を加えた試料の TG 信号を測定し、分子拡散信号を比較したところ (Fig. 2(a))、PBP 共存下でのみ強い山型の信号が観測された。これは光励起によって拡散係数が顕著に変化したことを示しており、複合体形成による分子サイズの変化に帰属できる。

Fig. 2(b)に TG 信号の格子波数依存性を示す。拡散信号の時間発展は、観測している時間スケール (ミリ秒以降) で拡散係数変化 (複合体形成) が起こっていることを示している。2 段階で拡散係数が変化するモデルを用いると信号をよく再現できた。早い反応の速度定数は PBP 濃度に線形に依存したことから PYP と PBP ダイマーの会合反応であると帰属した (複合体 I の形成)。拡散係数の値は PYP 単体では  $1.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 、複合体 I では  $4.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  であり、会合反応の速度定数は  $4.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であることがわかった。この拡散係数の変化量は分子サイズの変化から予想されるよりも大きい。CD 測定により光照射前後で顕著な二次構造変化が見られたため、これが要因で拡散係数が大きく減少したと考えられる。

興味深いことに、早い反応の速度は励起光強度に依存しない一方、遅い反応の速度定数は励起光強度を上げるとともに増加した。この結果は遅い反応が励起分子同士の会合反応であることを示しており、複合体 II の形成過程と同定した。解析の結果、複合体 II の拡散係数は  $3.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、励起光強度  $210 \mu\text{J}$  の条件において速度定数は  $2.1 \text{ s}^{-1}$  と求めた。拡散係数の変化量が複合体 II の形成反応として妥当であったことも上記解釈を支持している。Fig. 3 に本研究により明らかになった反応スキームを示す。本討論会では、上記結果を基に PYP と PBP による複合体形成ダイナミクスの詳細について発表する。

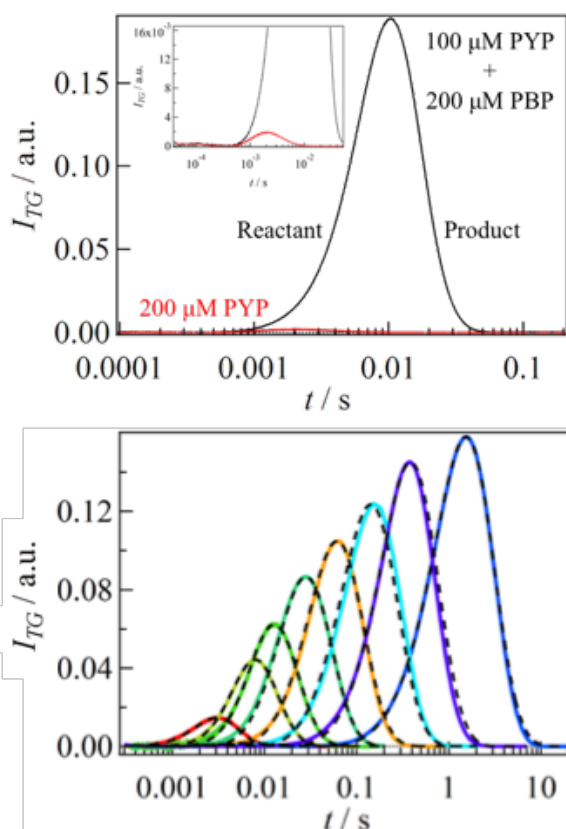


Fig. 2 (a) TG signals of PYP in the absence and presence of PBP. (b) Time development of the molecular diffusion signal of PYP with PBP. The dotted lines are fitting curves.

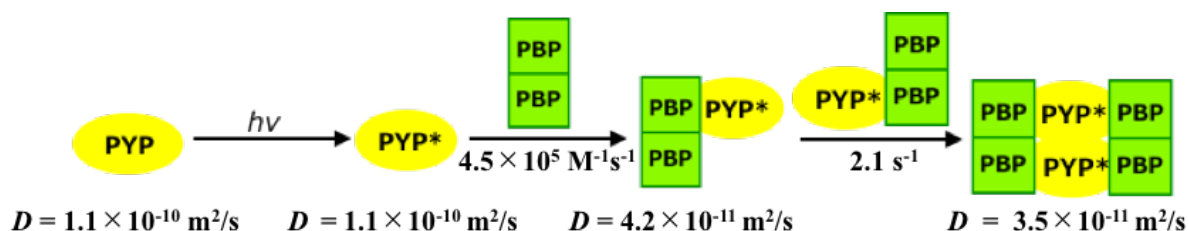


Fig. 3 interaction dynamics between PYP and PBP

### 【参考文献】

- [1] Van Aalten, D. M. F *et al.*, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 64.
- [2] Yamazaki *et al.*, private communication.

## 青色光センサータンパク質PixDの分子機能におけるC末端領域の重要性

京大院理

○床次俊郎, 中曾根祐介, 寺嶋正秀

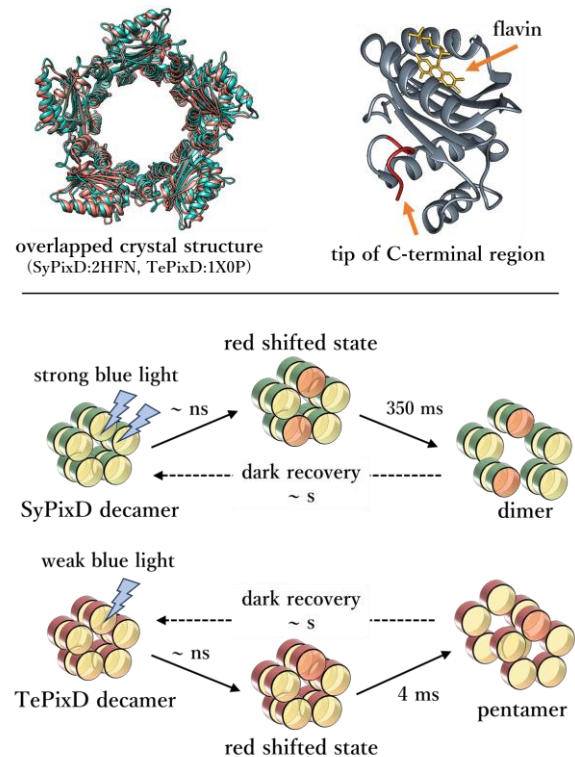
### The importance of C-terminal region on the molecular function of blue light sensor protein PixD

○Shunrou Tokonami, Yusuke Nakasone, Masahide Terazima

*Department of Chemistry, Kyoto University, Japan*

**【Abstract】** Bacterial blue light sensor BLUF proteins, SyPixD and TePixD, have highly similar decamer structures in crystal. However, they show distinct photoreaction. SyPixD dissociates into the dimer under high fluence of light irradiation, while TePixD dissociates into the pentamer under weak light condition. In order to understand the molecular mechanism underlying the difference, we focus on the C-terminal region of the BLUF domain. Since this region is considered to be important for signal transduction and shows no similarity in amino acid sequence among various BLUF proteins, it might be a key factor determining the diversity of the reaction. We investigated the photoreaction dynamics of several C-terminal truncated mutants of SyPixD using the transient grating method and revealed that the C-terminal region indeed affects the oligomeric state and light response at the molecular level.

**【序】** PixD は、発色団にフラビン色素を有する青色光センサー-BLUF(sensor of Blue Light Using Flavin)タンパク質ファミリーの 1 つで、生体内ではシアノバクテリアが持つ、走光性におけるシグナル伝達初期過程の制御を担っている。PixD には、*Synechocystis* 由来の SyPixD と *Thermosynechococcus elongatus* 由来の TePixD の 2 種が知られており、共に非常に類似した 10 量体構造を有している (Fig.1 左上)。しかし、面白いことに SyPixD と TePixD は全く異なる光反応ダイナミクスを示す (Fig.1 下)。SyPixD は強青色光で励起されると、まずフラビン由来の吸収スペクトルがレッドシフトした状態に至り (BLUF タンパク質共通の反応)、その後 10 量体が 2 量体へ解離する [1]。一方 TePixD は、弱青色光でレッドシフト状態に至り、10 量体から 5 量体に解離する [2]。2 つのアミノ酸配列を比較すると、フラビンを保持する光センサードメインには相同性があるが、C 末端領域には相同性



**Fig. 1.** Structure (upper) and photoreaction schemes (lower) of PixDs

がないため、2つの違いはC末端領域に起因する可能性がある。特に SyPixD は TePixD よりも C 末端の先端領域が 7 残基だけ短い(Fig1.右上)。そこで本研究では、SyPixD の C 末端を 7 残基除去した変異体(SyC7d)を作製し、PixD の光誘起解離反応に C 末端領域が及ぼす影響を調べた。光反応の検出には、反応前後の分子の拡散係数変化を検出できる分光手法、過渡回折格子(TG)法を用いた。

**【実験】** PixD の野生型や変異体のサンプルは、大腸菌を用いた発現系により大量発現し、HisTrap 精製を行った。TG 測定では、462 nm の色素レーザーを励起パルス光に、830 nm の CW ダイオードレーザーをプローブ光に使い、サンプルから出た回折光を赤外光用 PMT で検出した。

**【結果・考察】** Figure2 に SyPixD の WT と C7d 変異体それぞれの暗状態と光状態の吸収スペクトルを示した。変異体でも WT 同様のレッドシフトが起こっていることから、変異後も発色団周辺の環境が保たれていることを確認した。

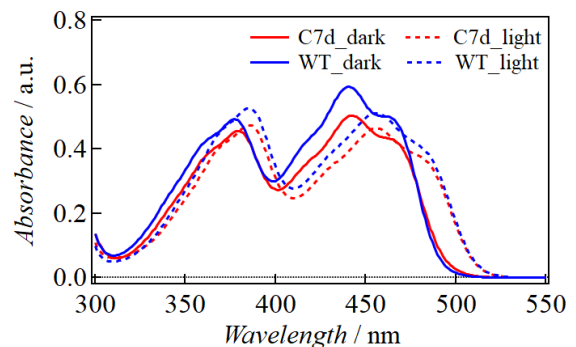
Figure3 に SyPixD の WT と C7d 変異体の TG 信号を示した。山型の信号は、光反応によって分子に拡散係数変化が生じたことを示す信号であり、先行研究から、WT では 10 量体から 2 量体への解離を表していることが分かっている[1]。一方、C7d 変異体では信号が大きく変化した。すなわち、分子拡散信号が速い時間領域へとシフトしており、これは反応物の拡散係数が WT よりも大きく、より小さな会合状態を形成していることを示唆している。詳細に解析を行ったところ、C7d では光反応物と生成物の拡散係数が、それぞれ  $D_R=7.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $D_P=8.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  であった。WT の光生成物の 2 量体の拡散係数  $D_P=7.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  と非常に良い一致を示すことから、C7d では 2 量体の構造変化が光誘起されていることが示唆された。また、サイズ排除クロマトグラフィや Native-PAGE でも、分子量から 2 量体であることを確認した。

さらに、7 残基だけではなく、5, 3, 1 残基を除去した変異体でも 2 量体を支持する結果が得られており、C 末端を 1 残基でも除去すると、PixD の特異な 10 量体構造形成に影響があることが明らかになった。

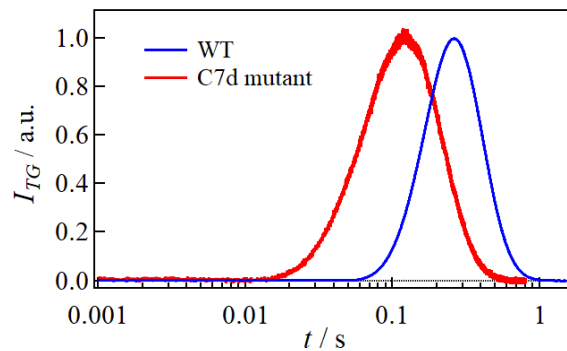
これまでの研究から、SyPixD は 10 量体構造を持つことで初めて、下流分子 SyPixE と相互作用が可能になり、走光性のシグナル伝達が発現すると考えられている。本結果は、一見不必要な、光センサードメインから離れた C 末端領域の先端部位が、PixD の 10 量体構造の維持に必要な要素であり、分子機能発現のためには欠くことができない要素であることを示唆している。現在、C 末端に置換、付加を施した変異体の測定も行っており、講演ではそれらの結果も踏まえ、PixD の分子機能に関わる C 末端の役割を議論する。

**【参考文献】** [1] K. Tanaka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 409, pp.773-785 (2011).

[2] K. Tanaka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 386, pp.1290-1300 (2009).



**Fig. 2.** Absorption spectra under dark and light condition of WT and C7d mutant



**Fig. 3.** TG signals of WT and C7d mutant (normalized at peak intensity)

## Unraveling the excited-state structural dynamics of LSSmOrange protein through time-resolved impulsive stimulated Raman spectroscopy

○ Pardeep Kumar<sup>1,2</sup>, David Manuel Rantasa<sup>3</sup>, Eduard Fron<sup>4</sup>, Haruko Hosoi<sup>5</sup>, Hikaru Kuramochi<sup>1,2,6</sup>, Satoshi Takeuchi<sup>1,2</sup>, Hideaki Mizuno<sup>3</sup>, Tahei Tahara<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN, Japan*

<sup>2</sup> *RIKEN Center for Advanced Photonics (RAP), RIKEN, Japan*

<sup>3</sup> *Laboratory of Biomolecular Network Dynamics, Biochemistry, Molecular and Structural Biology Section, Department of Chemistry, KU Leuven, Belgium*

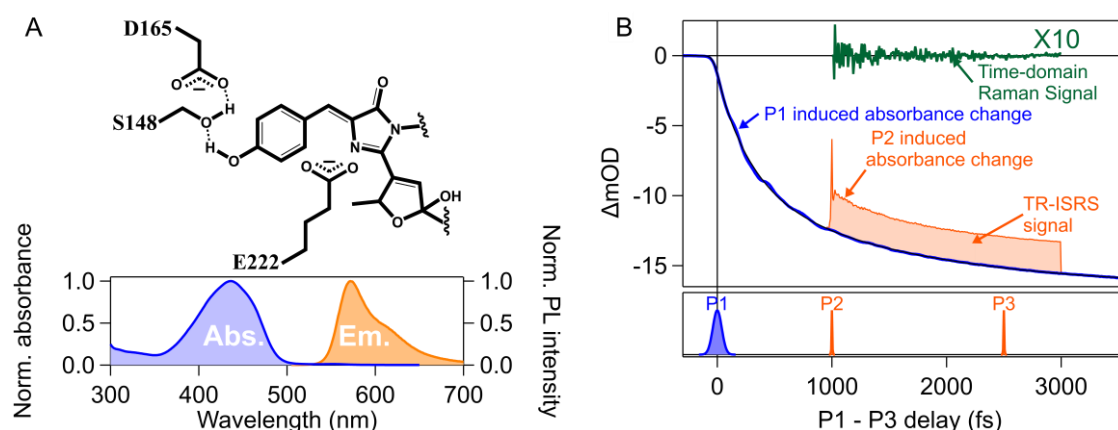
<sup>4</sup> *Laboratory of Molecular Imaging and Photonics, Department of Chemistry, KU Leuven, Belgium*

<sup>5</sup> *Department of Biomolecular Science, Faculty of Science, Toho University, Japan*

<sup>6</sup> *JST PRESTO, Japan*

**[Abstract]** LSSmOrange is a mutant of a coral fluorescent protein, DsRed. The absorption and emission maxima of LSSmOrange are separated by  $5453\text{ cm}^{-1}$ , and this large energy difference has provided the capability of multicolor imaging with a single excitation laser line in living cells. The chromophore of LSSmOrange has a neutral form in the ground state. Upon photoexcitation, it undergoes ultrafast excited-state proton transfer (ESPT), resulting in the formation of the bright anionic state. This ESPT dynamics of the LSSmOrange is represented by the multi-exponential kinetics, however, its mechanism has not been fully understood yet. To clarify the ESPT mechanism from a structural viewpoint, we employed time-resolved impulsive stimulated Raman spectroscopy (TR-ISRS) using sub-10 fs pulses, and recorded the Raman spectra of the chromophore with femtosecond time resolution. The obtained time-resolved Raman data indicate that the chromophore in LSSmOrange is present in two different structural forms and thus explain the observed multi-exponential kinetics of the ESPT.

**[Introduction]** Studying biological processes in the living cells is a challenging task, however,

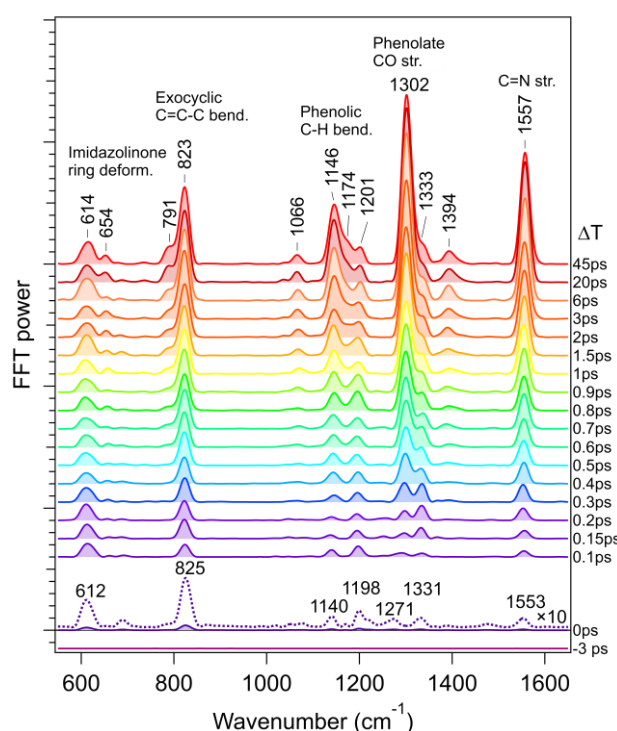


**Fig. 1.** (A) Chromophore structure with interactions with the nearest amino acids in LSSmOrange based on the crystallographic structure (PDB ID: 4Q7R). Blue and orange traces are the steady state absorption and fluorescence spectra of LSSmOrange (pH 7.4, 20 mM Tris-HCl buffer + 150 mM NaCl). (B) Measurement scheme and pulse sequence of TR-ISRS. Blue and orange traces denote a pump-probe signal measured with P1 and P3 pulses, and a TR-ISRS signal measured with P1, P2 and P3 pulses, respectively. Green trace is the time-domain Raman signal, which is extracted from the TR-ISRS signal by subtracting the slowly-varying population component.

fluorescent proteins have provided the capability of observing these biological processes under the physiological conditions. LSSmOrange is a fluorescent protein developed to fill the spectral gap between green-yellow and red fluorescent proteins. The absorption and emission maxima of LSSmOrange is separated with very large energy (Figure 1A). This large energy separation is rationalized with the mechanism of ultrafast excited-state proton transfer (ESPT)<sup>1</sup>. The initial photo-excited chromophore has a neutral form (Figure 1A), and it undergoes the ultrafast ESPT, resulting in the formation of the bright anionic state. However, the excited-state dynamics of LSSmOrange have not been clearly understood yet. To clarify the excited-state dynamics from a structural viewpoint, we employed time-resolved impulsive stimulated Raman spectroscopy (TR-ISRS)<sup>2</sup> using sub-10 fs pulses, and recorded the Raman spectra of the chromophore with femtosecond time resolution.

**[Methods]** Measurement scheme and pulse sequence of TR-ISRS are shown in Figure 1B. The actinic pump pulse (P1, 415 nm, 90 fs) was generated by frequency-doubling the output of the Ti:Sapphire amplifier. The Raman pump and probe pulses (P2 and P3, 600–800 nm) were generated using a non-collinear optical parametric amplifier (NOPA). The output of the NOPA was compressed to <8 fs using a folded prism pair and micro-machined membrane deformable mirror, and the obtained pulse was characterized by self-diffraction frequency-resolved optical gating (SD-FROG) at the sample position. These three pulses (P1, P2, and P3) were focused together onto a 0.3-mm thick flow cell.

**[Results and Discussion]** Time-resolved Raman spectra of LSSmOrange, obtained by TR-ISRS, are shown in Figure 2. Immediately after photoexcitation (for example,  $\Delta T = 0$ ), weak Raman bands of the neutral form before the ESPT were observed. Subsequently, on the femto-to-picosecond time scale, we observed the growth of numbers of Raman bands, which is attributable to the formation of the anionic form chromophore through the ESPT. The kinetic analysis of these anionic form Raman bands reveals bi-exponential growth of its population. The analysis also indicates that this bi-exponential feature is associated with two parallel ESPT pathways producing two different anionic form species with different Raman spectra, suggesting the heterogeneity of the chromophore structure of LSSmOrange. On the basis of the previous X-ray crystallographic study of LSSmOrange<sup>3</sup>, we attribute the origin of this heterogeneity to the different hydrogen bond environments around the chromophore.



**Fig. 2.** Time-resolved Raman spectra of LSSmOrange (pH 7.4, 20 mM Tris-HCl buffer + 150 mM NaCl) at various P1-P2 delays ( $\Delta T$ ). Raman spectrum at 0 ps is 10 times magnified (dotted curve).

## [References]

- [1] E. Fron et al. *J. Phys. Chem. B*, **119**, 14880 (2015).
- [2] H. Kuramochi et al. *Rev. Sci. Instrum.*, **87**, 043107 (2016).
- [3] S. Pletnev et al. *PLOS ONE*, **9**, e99136 (2014).



## ピコ秒時間分解けい光分光法による 人工脂質二重膜と細胞膜の粘度分布の比較

<sup>1</sup>学習院大理, <sup>2</sup>京大院薬

○林春菜<sup>1</sup>, 木村光男<sup>1</sup>, 高田直人<sup>2</sup>, 高門輝<sup>1</sup>, 申惠媛<sup>2</sup>, 岩田耕一<sup>1</sup>

### Comparison of Viscosity Distribution Between Artificial Membranes and The Plasma Membrane with Picosecond Time-resolved Fluorescence Spectroscopy

○Haruna Hayashi<sup>1</sup>, Mitsuo Kimura<sup>1</sup>, Naoto Takada<sup>2</sup>,  
Akira Takakado<sup>1</sup>, Hye-Won Shin<sup>2</sup>, Koichi Iwata<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Science, Gakushuin University, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Japan

**【Abstract】** The raft structure presumed in the plasma membrane is often compared with the static raft structure artificially formed in phase separated lipid bilayers. We tried to characterize the structure and possible fluctuation of lipid bilayer membranes by estimating their viscosity. We evaluated the membrane viscosity by using *trans*-stilbene as a fluorescence probe, with picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy. In this study, we attempted to estimate the viscosity of artificial lipid bilayers in phase separated liposomes and the plasma membrane of HeLa cells by using 4-hydroxy-*trans*-stilbene as a fluorescent probe. The result indicates that both of the phase separated membranes and the plasma membrane have at least two environments with different viscosity. The presence of the lipid raft is strongly suggested in the plasma membrane. The difference in viscosity between the two environments of the plasma membrane is larger than that of the phase separated artificial liposome, suggesting the presence of more complicated raft structure in the plasma membrane.

**【序】** 近年広く支持されている細胞膜の構造モデルとして、脂質二重膜の中に「ラフト」と呼ばれるミクロドメインが存在するラフトモデルが挙げられる。ラフトは動的な構造ゆえに可視化が困難で、構造やサイズなども明らかとなっていない。このラフトを模したものが相分離系の脂質二重膜であり、細胞膜のモデルとして多くの研究に用いられている。しかし、静的な「人工ラフト」と動的な「ラフト」のあいだでは、その動的挙動の違いゆえに物性やミクロ構造に乖離があると考えられる。そこでわれわれは、構造に依存して変化する物性のひとつである粘度に着目した。われわれはこれまで、脂質二重膜中に封入した *trans*-スチルベン (*tSB*) の異性化速度をピコ秒時間分解けい光分光法によるけい光減衰過程の測定から算出し、粘度を見積もることに成功している [1, 2]。本研究では、三成分系の相分離脂質二重膜と細胞膜に 4-ヒドロキシ *trans* スチルベン (*tSB-OH*) をプローブ分子として封入し、局所粘度を評価することによって、人工ラフトとラフトの構造の比較を試みた。

#### 【方法 (実験・理論)】

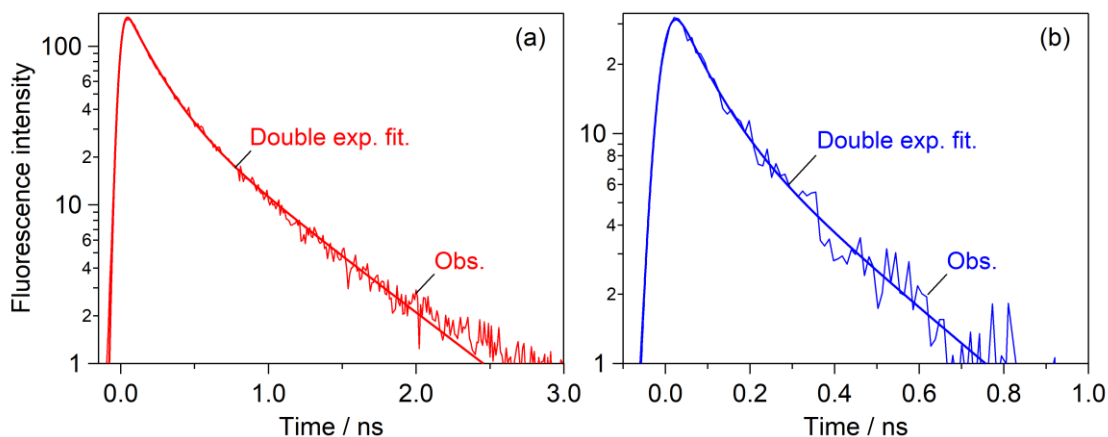
DOPC:DPPC:コレステロール (Chol) (モル比 1:1:1) から成るリポソームおよび HeLa 細胞の細胞膜に封入した *tSB-OH* のけい光寿命を、ピコ秒時間分解けい光分光計により測定した。再生増幅された Ti:Sapphire レーザーの出力を OPA を経て時間幅 40 fs、波長 320 nm のパルス光に変換し、この光を励起光として試料に照射した。得られたけい光を分光器に導入後、ストリークカメラによって時間分解検出し、波長 360 nm から

420 nm のけい光減衰曲線を解析に用いた。試料部では、リポソームは 1 cm 角セルに入れて温度制御し、HeLa 細胞は培養フラスコのまま室温で保持した。

### 【結果・考察】

最初に *t*SB-OH でもけい光寿命から見積もられた光異性化速度定数が、アルカン溶媒の粘度と相関をもって変化することを確認した。*t*SB と同様に、*t*SB-OH の光異性化反応も線時計として利用できる。次に、リポソーム中の *t*SB-OH のけい光減衰曲線を観測した。得られた減衰過程は二重指数関数で近似できた (Fig. 1.(a))。この人工脂質二重膜は、コレステロールに富む DPPC 相とコレステロールに乏しい DOPC 相に相分離することが知られている[3]。DOPC リポソームおよび DPPC:Chol (7:3) リポソーム中の *t*SB-OH の減衰曲線と比較することで、DOPC:DPPC:Chol リポソームの 2 種類の減衰過程には、形成した各相の異なる粘度が反映されていることが明らかとなった。また、*t*SB-OH を封入した HeLa 細胞と *t*SB-OH を含まない HeLa 細胞のけい光差スペクトルから、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を得ることに成功した。得られた *t*SB-OH のけい光減衰曲線 (Fig. 1.(b)) は、二重指数関数で再現できた。このことは、相状態の異なるドメイン構造の存在を示唆する。人工の相分離脂質二重膜においてラフトの存在と矛盾しない結果が得られた。

けい光寿命から見積もった粘度を Table 1 に示す。HeLa 細胞の細胞膜の粘度は人工脂質二重膜と比較して約 10 倍小さい。不飽和脂質の割合が高い細胞膜では流動性が大きいと考えられる。また、膜内に存在する 2 種類の領域の粘度の差が、人工脂質二重膜では 30 倍であったのに対し細胞膜では 100 倍であった一方で、振幅比には大きな差は見られなかった。マクロな観点でドメインの存在比を比較すると人工ラフトは細胞膜に近い良いモデルであるが、複雑な構造が反映される各ドメインの粘度には大きな違いが見られることが明らかとなった。



**Fig. 1.** Fluorescence decay curves of *t*SB-OH embedded in the lipid bilayers of DOPC:DPPC:Chol liposomes (red trace) and the plasma membrane of HeLa cells (blue trace). Each decay kinetics is fitted with a double exponential function.

**Table 1.** Viscosity ( $\eta$ ) of the lipid bilayer and the plasma membranes estimated from fluorescence lifetime of *t*SB-OH.

Sample	$\eta$ (fluid) / mPa s	$\eta$ (viscous) / mPa s	Amplitude ratio
DOPC:DPPC:Chol.	10	300	0.72
HeLa cell	0.5	45	0.69

### 【参考文献】

- [1] Y. Nojima and K. Iwata, *J. Phys. Chem. B* **118**, 8631 (2014).
- [2] 林, Manjusha, 高田, 高屋, 中村, 申, 岩田, 第12回分子科学討論会, 1D20 (2017).
- [3] G. W. Feigenson, *BBA* **1788**, 47 (2009).

## 金属錯体脂質と金属イオン集積による脂質膜ドメイン構造体の創出

<sup>1</sup>熊本大院先端, <sup>2</sup>九大院理

○大谷亮<sup>1</sup>, 木下祥尚<sup>2</sup>, 松森信明<sup>2</sup>, 速水真也<sup>1</sup>

### Construction of lateral domains incorporating metal complex lipids and metal ions in lipid bilayers

○Ryo Ohtani<sup>1</sup>, Masanao Kinoshita<sup>2</sup>, Nobuaki Matsumori<sup>2</sup>, Shinya Hayami<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, Japan

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Kyushu University, Japan

**【Abstract】** The artificial lateral domain architectures in lipid bilayers were constructed by coordination networks incorporating metal complex lipid  $[\text{Mn}(\text{N})(\text{CN})_4][\text{dabco}-\text{C}_{16}\text{H}_{33}]_2$  (**1**) and metal ions. The resultant domains on giant-unilamellar vesicles (GUVs) show dynamic formation/deformation behavior responding temperature changes. It is noteworthy that angular domains are formed not circles in lipid membranes, indicating a crystallization of domain components via metal accumulations.

#### 【序】

生体膜では、様々な脂質種間の異なる分子間相互作用を反映した流動性の異なる領域“ラフトドメイン”が存在し、高度な生体機能を担っている。このような膜機能を理解し制御するためには、人工的な脂質間相互作用の制御による膜ドメインシステム構築が不可欠である。我々のグループでは、脂質膜内で制御可能な分子間相互作用として“配位結合”に着目し、脂質膜内での金属錯体構築によるドメイン化を目指し研究展開してきた<sup>[1,2]</sup>。

本研究では、金属錯体脂質  $[\text{Mn}(\text{N})(\text{CN})_4][\text{dabco}-\text{C}_{16}\text{H}_{33}]_2$  (**1**) と DMPC から multilamellar vesicles (MLVs) および giant-unilamellar vesicles (GUVs) を調整し、DSC や共焦点蛍光顕微鏡観察などから金属イオン添加による脂質膜の相分離挙動について検討した(図1)。**1** は、金属イオン添加によりシアノ架橋型のネットワーク構造体を構築可能な機能性錯体脂質である。**1** を含む脂質膜において、金属イオン添加前後での熱挙動について詳細に検討することで、脂質膜内で動的な錯体ドメインが得られていることが分かった。

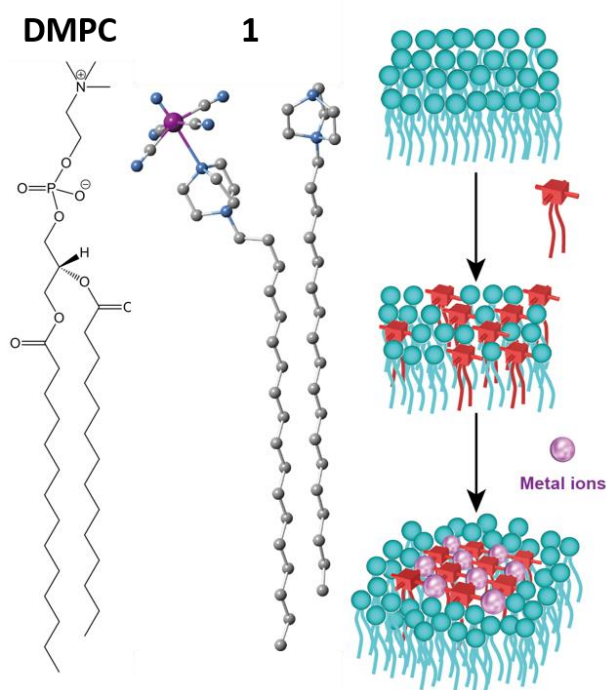


図1. **1** の構造とドメイン構築の流れ

### 【方法 (実験・理論)】

DMPC と錯体脂質 1 を mol 比 1 : 0.18 で混合することで MLVs を作成し、DSC、WAXD 測定から、金属イオン添加による相分離挙動について検討した。また、同様の混合比で、electroformation 法により GUVs を作成し、温度制御下での共焦点蛍光顕微鏡観察により、形成される錯体ドメインの形態や動的挙動について明らかにした。

### 【結果・考察】

DSC および WAXD の結果から、作成した DMPC/1(0.18) は 298 K でゲル相から液晶相への主転移を示した。これに  $\text{MnSO}_4$  を滴下すると、DSC 測定から、より高温側の 303 K 付近までの新たなピークが生じることが分かった (図 2)。これは、1 と  $\text{MnSO}_4$  間での配位結合により金属錯体ドメインが構築されることで、高温まで安定なゲル相が生じ、膜の相分離が起こっていることを示している。そこで、得られたドメインの形態や動的挙動について明らかにするために、同組成の GUVs を作成し、301 K から 312 K までの温度領域における共焦点蛍光顕微鏡観察を行った。

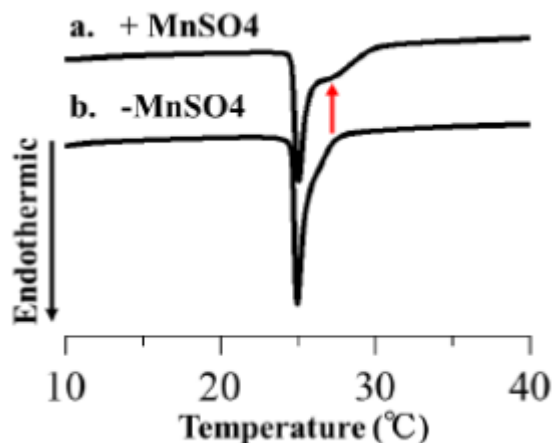


図 2. DSC の結果

予想に反して、302 K (29 °C) 付近では相分離が観測されなかったが、306 K (33 °C) 付近までの昇温により徐々に数  $\mu\text{m}$  程度のドメインが形成することが分かった。これは、302 K では視認できない程度の非常に小さい錯体ドメインがゲル相として形成し、温度上昇に伴ってそれらが集まることで大きなドメインへと成長したことを示している。更に、昇温することで、形成した錯体ドメインがゲル相から流動相に相転移し全体が均一な流動相に変化した (図 3)。この挙動は、降温過程においても示され可逆的であることが分かった。興味深いことに、形成したドメインは円形ではなく角張った形状であり、金属イオン集積による結晶化が示唆された。本成果は、人工ドメインシステム構築のために配位結合が有用であることを示しており、金属イオン種によりドメインサイズ、安定性など機能制御が可能であると期待される。

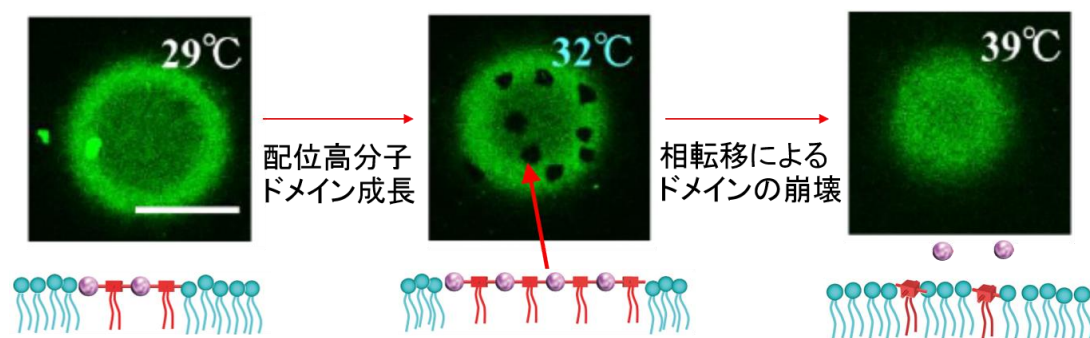


図 2. 共焦点蛍光顕微鏡観察結果とドメインの動的挙動

### 【参考文献】

- [1] R. Ohtani *et al.* *Chem. Commun.* **53**, 13249 (2017).
- [2] R. Ohtani *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 1139 (2015).