

業績紹介：大きな中性水クラスターのサイズ選別赤外分光

藤井朱鳥（東北大院理・A01 計画研究）

論文題目：“Infrared Spectroscopy of Phenol-(H₂O)_{n>10}: Structural Strains in Hydrogen Bond Networks Of Neutral Water Clusters”

著者：Kenta Mizuse, Toru Hamashima, Asuka Fujii

雑誌巻号：J. Phys. Chem. A **113**, 12134-12141 (2009)

中性水クラスター(H₂O)_nの構造についてはこれまで非常に数多くの研究報告があるが、サイズ（構成分子数、n）が10を超えるものに関しては、実験例が極めて少ない。本研究では厳密なサイズ選択に代わり、ある程度(Δn<~6)のサイズ幅を許容するという考えに立ち、質量分析法と組み合わせた赤外-紫外二重共鳴法によりサイズ 50 程度までの大きな水クラスターのサイズ選別赤外分光を行った。

光イオン化の発色団としてフェノール1分子を含む水クラスターPhOH-(H₂O)_nを対象とした。フェノールはちょうど水1分子と同じ役割を水素結合ネットワークにおいて果たすので、純粋な水クラスターと等価な構造が期待できる。大サイズクラスターのブロードな電子遷移に共鳴した紫外光でクラスターを共鳴イオン化させ、生じるクラスターイオンを質量分析し、対応するサイズの中性クラスター分布数のモニターとした。紫外光に先立ち赤外光を入射・波長掃引し、赤外光吸収をその結果生じるクラスターの解離によるイオンクラスター信号の減少として捉えた。実際はイオン化に伴っても水分子の解離（蒸発）が起きるため、測定サイズに不確実性が生じるが、エネルギー計算から、その最大値はおおよそ6程度と見積もることが出来る。

図1に観測した大サイズ PhOH-(H₂O)_nの自由OH伸縮振動領域赤外スペクトルを示す。サイズ増大と共に自由OH振動ははっきりとした低波数シフトを示し、50分子という大きなサイズまでサイズ選択されたクラスターのスペクトルが観測されていることが分かる。スペクトルに現れる自由OH伸縮振動はクラスターサイズから考えて3配位の水分子によるものと帰属される。3配位の水分子では2つの非共有電子対がそれぞれプロトンを受容しているため、自由OH結合の電子密度が低下し、伸縮振動の低波数シフトが生じると考えられる。従ってサイズと共に低波数シフトが増大することは、サイズと共に自由OH結合周辺の水素結合

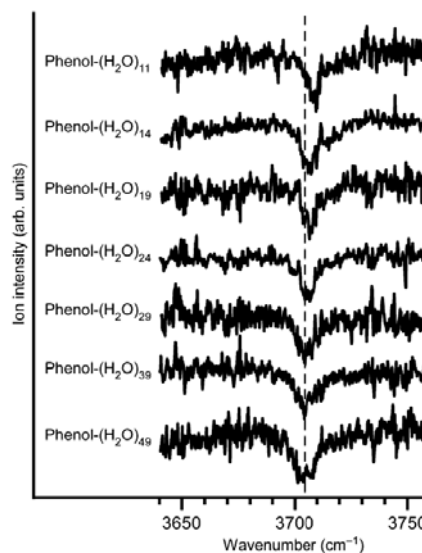
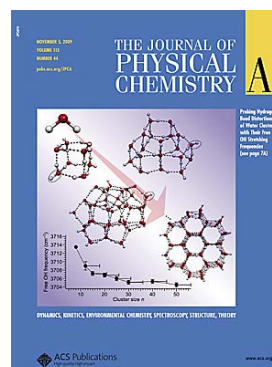


図1 Phenol-(H₂O)_nの自由OH伸縮振動赤外スペクトル

強度が増大していることを示している。この結果を解釈するため、いくつかのモデルクラスター構造における自由OH伸縮振動数と水素結合構造との相関を調べた。小サイズクラスターでは水素結合数を増すために4員環構造を好むが、水素結合の歪みが大きいため水素結合一本あたりの強度は弱く、自由OH振動数は比較的高くなる。これに対してサイズ増大と共に5, 6員環構造が比重を増すと、水素結合の歪みが取れ、一本あたりの強度が強まる。その結果、自由OH振動数は低下する。すなわち、観測された自由OH振動数の低下は、水素結合ネットワーク構造が小サイズクラスター特有の4員環構造からより一般的な5, 6員環構造へと移行していく過程を捉えたものと解釈される。

本論文はJ. Phys. Chem. Aに掲載され、担当 editor の推薦により当該号の表紙を飾った。



業績紹介：振動電子二重共鳴 SFG 分光による酒石酸添加ポルフィリン会合体薄膜のキラリティ検出

石橋孝章 (広島大院理・A02 計画研究代表者)

論文題目："Chiral Sum Frequency Spectroscopy of Thin Films of Porphyrin J-Aggregates"

著者：Tetsuhiko Nagahara, Kenji Kisoda, Hiroshi Harima, Misako Aida, and Taka-aki Ishibashi

雑誌巻号：J. Phys. Chem. B **113**, 5098-5103 (2009)

電子共鳴条件下における振動 SFG 分光である電子振動二重共鳴 SFG (DR-SFG) は、薄膜試料のキラリティの新しい高感度検出手法として期待されている [1]。キララル振動 SFG の信号強度は、ラマンテンソルの逆対称成分に由来している。逆対称成分は、電子非共鳴条件下では値を持たないが、電子共鳴条件下では対称成分に匹敵する大きさとなり得る。このため振動 SFG 分光による高感度キラリティ検出には、電子共鳴条件下での測定が実質的に必須である。適切な偏光配置で得られるキララル和周波 (SFG) はバルク中でも発生するが、表面・界面・薄膜では信号が弱い検出できた例はあまり多くない。本研究では、キララルな酒石酸添加ポルフィリン会合体薄膜にキララル SFG 分光を適用し、L-体添加試料と D-体添加試料について SFG によるキラリティの識別を行った。さらに、振動 SFG バンド強度の可視プローブ波長依存性を測定し、キララル SFG 信号の発生機構に関して検討した。

Tetrakis-4-sulfonatophenyl-porphyrin(TSPP) は酸性水溶性中で会合体を形成するが、キララルな酒石酸分子が共存すると会合体はキララルな構造となる。会合体水溶液をガラス基板上にキャストすることで膜厚約 40 nm の薄膜を作製し測定試料とした。薄膜のキラリティを確認するため、円偏光二色性 (CD) 信号の測定を行ったが CD 活性は確認できなかった。一方、490 nm 付近の先鋭化した会合体の電子吸収 (B バンド) に共鳴する条件下で薄膜試料の振動 SFG を測定したところ、1300 ~ 950 cm^{-1} 領域で強いキララル SFG 信号が得られ、DR-SFG の高いキラリティ検出感度が確認された。図 1 にキラリティ識別のための偏光 SFG の測定結果の例を示す。ポルフィリンの振動バンドの符号が、添加した酒石酸のキラリティに応じて反転している。このことは、薄膜中でもポルフィリン会合体が酒石酸に誘導されたキララルな構造を持っており、そのキラリティを

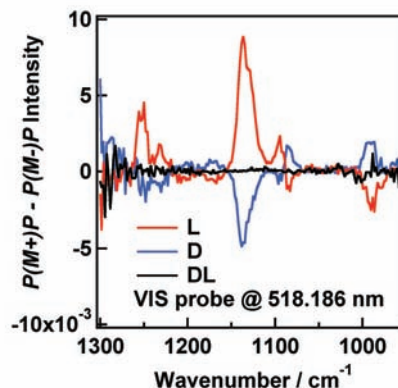


図 1 酒石酸添加 TSPP 会合体薄膜のキララル SFG スペクトル (PMP 差信号) 赤：L-酒石酸を添加した試料、青：D-酒石酸を添加した試料、黒：DL-酒石酸を添加した試料。振動バンドはすべてポルフィリンの振動である。

DR-SFG で識別できたことを示している。さらに信号発生機構を検討するために、観測された振動バンドの振幅の可視プローブ波長依存性 (DR-SFG 電子励起スペクトル) を、B バンド付近 (SFG 信号波長 430-530 nm) で測定した。電子励起スペクトルは、990, 1090, 1130, 1190 cm^{-1} の 4 本の振動バンドに関して測定したが、得られた電子スペクトルには、次のような特徴があった。(1) すべての振動バンドに関して、電子吸収バンド (B バンド) の長波長側である 520 nm より長波長側で、吸収強度が減少するのに伴い、逆に SFG バンド振幅は増大する、(2) 1090 と 1130 cm^{-1} バンドの励起スペクトルは、キララル成分 (PSP 偏光成分) かアキララル成分 (PPP 偏光成分) かによって異なり、キララル成分は吸収極大より短波長側でアキララル成分は長波長側で極大となる。特徴 (1) は、測定波長領域より遥かに離れている 700 nm 付近にある Q バンドの影響が、B バンドの影響に近い大きさであることを示唆している。さらに、共鳴ラマンに対する Albrecht の理論の B 項を使いキララル成分はラマンテンソルの逆対称成分、アキララル成分は対称成分が対応すると仮定したシミュレーションにより、B バンドに由来する振電項と Q バンドに由来する項の干渉効果の結果として、観測された励起スペクトルの特異なスペクトル形の特徴 (2) を解釈できることを示した。

引用文献

[1] N. Ji and Y. R. Shen, *Chirality* **18**, 146 (2006).

業績紹介：温度応答性高分子の脱水和初期過程の観測

藤野竜也（首都大院理工・A02 計画研究代表者）

論文題目："Picosecond time-resolved fluorescence study of poly vinyl methyl ether aqueous solution"

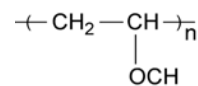
著者：Tsutomu Sakamaki, Tatsuya Fujino, Haruko Hosoi, Tahei Tahara, Takashi Korenaga

雑誌巻号：Chem. Phys. Lett. **468**, 171-175 (2009)

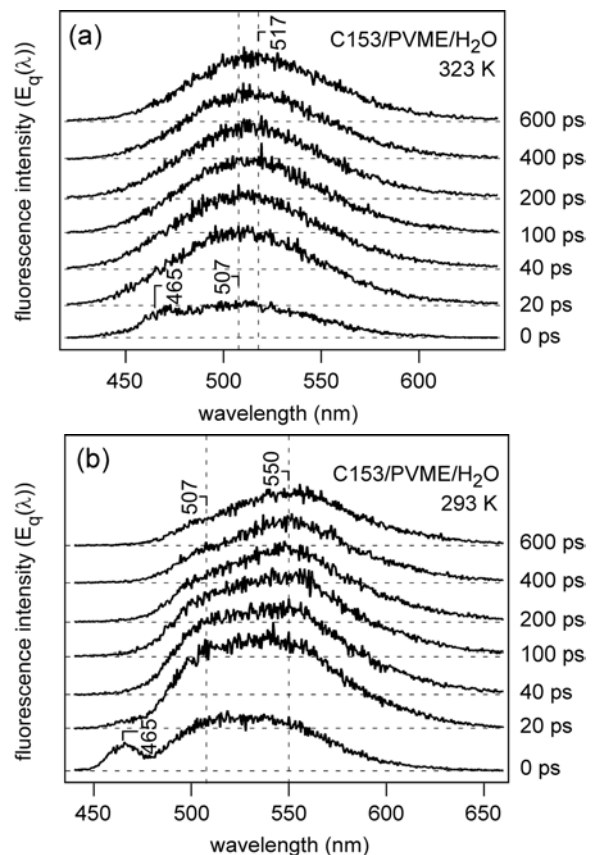
N-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAM)やポリビニルメチルエーテル(PVME)は温度により親水性と疎水性を変化させる高分子として知られている。下限臨界温度(LCST~308K)以下ではコイル状の構造をとり水中に溶解するが、下限臨界温度以上ではコイル状の高分子の脱水和によりグロービュル状へと変化する。この変化はコイル-グロービュル相転移として知られており、光散乱をはじめ様々な手法により研究されている。本研究では蛍光プローブ分子(C153)を用いることにより、下限臨界温度以上(323 K)、以下(293 K)の温度でピコ秒時間分解蛍光分光を行い、温度応答性高分子の一つ PVME 周辺の分子環境変化を明らかにした。また蛍光プローブ分子の光励起により誘起されたコイル-グロービュル相転移の初期過程を観測した。

下限臨界温度以上(323 K)で C153/PVME/H₂O のピコ秒時間分解蛍光スペクトルの偏光異方性を観測した結果、二つの時定数 72.4 ps、10.9 ns が得られた。Stokes-Einstein-Debye (SED)式による考察からそれぞれの時定数は、PVME 粒子周辺と水との間に存在する疎水的環境 (1.2 cP)、及び PVME 粒子内に形成されたウォータープール(181 cP)を表していると考えられた。また 323 K で観測したピコ秒時間分解蛍光スペクトルを図(a)に示した。下限臨界温度以上では時間原点に水の OH 伸縮振動によるラマン散乱が観測された他は時間変化に伴うスペクトル変化は観測されなかった。一方、下限臨界温度以下で PVME はコイル状の形態をとり、エーテル基による親水サイトは水分子の吸着により完全に覆われていることが分かっている。バルク水中での C153 の蛍光ピーク波長が 550nm であることを考慮すると、図(b)の 550 nm のピークはバルク水中における C153 の蛍光であると帰属できる。また 505nm 付近に観測されたピークは定常蛍光スペクトルでは観測されず、蛍光プローブ分子の光励起によって始めて観測される。またピーク波長は臨界温度

以上で観測した C153/PVME /H₂O の蛍光スペクトルのピーク波長と同じであることから、光励起により PVME 周辺の吸着水分子が脱離し、脱水和が起こるコイル-グロービュル相転移の初期過程を観測したものと考えられた。光励起後観測された 505nm の成分をスペクトルのデコンボリューションにより取り出し、その強度のピーク面積の時間変化をプロットした。これから PVME 周辺の水素結合の一部が 6ps 程度で変化するということが分かった。現在様々な蛍光プローブ分子を用いて、脱水和環境からのクマリン蛍光の立ち上がり時間を観測し、振動冷却と熱拡散の関係から[1]、高分子とクマリン分子との相対的な距離の見積りを行っている。



ポリビニルメチルエーテル(PVME)



[1] K. Iwata, H. Hamaguchi, J. Phys. Chem. A **101** 632-637 (1997).

業績紹介: 完全酸化型チトクロム *c* 酸化酵素における Fe—Cu 間ペルオキシ架橋と
プロトンポンプ反応の抑制

小倉尚志 (兵庫県立大院生命理・A03 公募研究代表者)

論文題目: A peroxide bridge between Fe and Cu ions in the O₂ reduction site of fully oxidized cytochrome *c* oxidase could suppress the proton pump

著者: H. Aoyama, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukihara, T. Ogura and S. Yoshikawa

雑誌巻号: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 2165 – 2169 (2009).

チトクロム*c*酸化酵素はミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系に存在する膜タンパク質複合体である。分子状酸素を水にまで四電子還元する反応に共役して、プロトンを膜の内側から外側へ能動輸送することによって、膜を隔てたプロトン駆動力を形成し、ATP合成酵素を駆動するエネルギー変換タンパク質である。ウシ心筋酵素は13本の異なるサブユニットから成り、機能単位の分子量は210 kDである。酸化還元中心として2つの銅部位と2つのヘムを持つが、その中で一組のFe—Cu二核中心が酸素還元部位である。完全還元型酵素が酸素と反応した直後に生成する“酸化型酵素”は2回の一電子還元反応により一つずつのプロトンを輸送するが、ウシ心筋から単離した後の“休止完全酸化型”は、プロトンポンプを行わない。“酸化型酵素”は共鳴ラマン分光法によりFe—OH構造を採ることがわかっていたが、“休止完全酸化型”に関しては、酸化還元滴定の実験とX線結晶構造解析による“酸素約2個分の電子密度の検出”により、Fe—O⁻—O⁻—Cu構造と推定されるに留まっていた。“休止完全酸化型”における二核反応中心の結晶構造は、シンクロトロン (SPring-8) の強い放射光により生じた水和電子が金属中心を還元してしまうため、これまで決定困難であった。本研究では、X線照射スポット (50 μm × 50 μm) と同じ部分の吸収スペクトルを測定する装置を組み立て、X線照射量を詳しく検討することにより、水和電子による還元の影響の無い条件で、二核反応中心の電子密度を得た。

図1に本研究で組み立てたシンクロトロンビームライン用吸収分光装置の概略を示す。光源はキセノンアークランプを用い、シングルコアの光フ

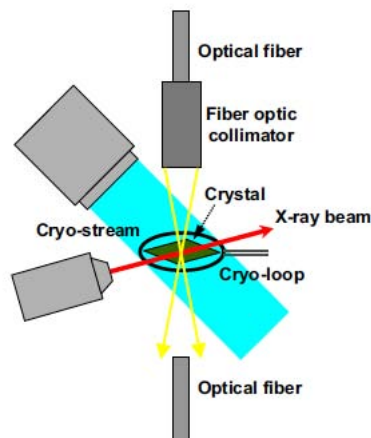


図1. 結晶分光装置の光照射部

ァイバーで結晶の近くに導いてコリメータで直径50 μmに集光した。波長0.9 ÅのX線を 2×10^{14} photons · sec⁻¹ · mm⁻²のフォトンフラックスで“休止完全酸化型”に100 Kにおいて照射すると、604 nmと582 nmの吸光度がそれぞれ $t_{1/2} = 3.0$ および4.0 secで上昇するという変化が起きた。しかし、結晶を一度室温に戻して直ちに凍結すると正常な完全還元型の吸収スペクトルを与えたので、上述のスペクトル変化はヘムの分解等によるものではなく、水和電子による還元の結果であると判断した。

この研究では、500 μm × 500 μm × 200 μmの結晶を約400個使用し、X線の照射時には結晶を0.6°回転させるあいだに100 μm水平変位させ、一箇所への照射量を減らした。このようにして、“休止完全酸化型”の分解能1.95 Åの結晶構造を決定した。二核反応中心の配位構造はFe—O⁻—O⁻—Cuであり、Fe—O、O—OおよびO—Cu距離はそれぞれ2.24、1.70および2.17 Åであった。このO—O結合距離は、これまでに報告のある金属二核ペルオキシ錯体の1.4 Åに比べて長いことが明らかになった。

電子が充分存在しない時に分子状酸素が二核中心で電子を受け取ると活性酸素種が生成し、それはタンパク質にとって有害であるが、安定なペルオキシ架橋構造がそのような反応を防ぐと考えられ、このことが、その構造の生理的意義であると思われる。

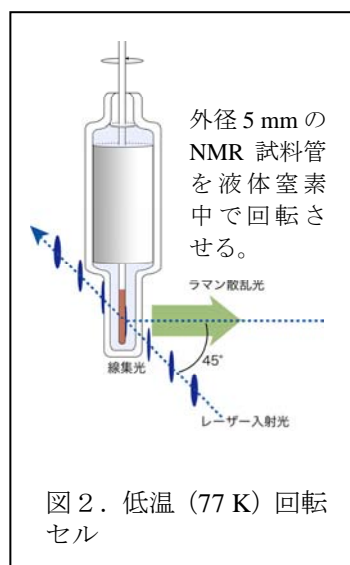
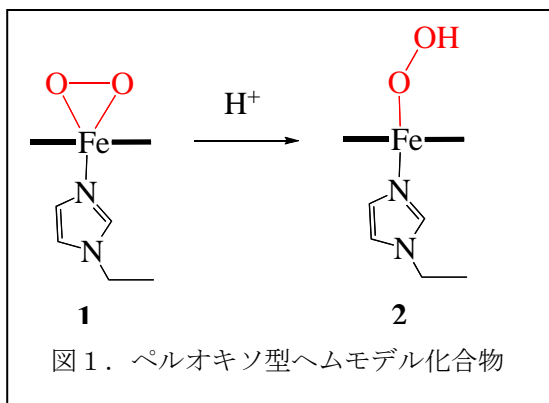
業績紹介: ハイドロペルオキシ型ヘムの構造研究: サイドオン型ペルオキシ錯体からエンドオン型ハイドロペルオキシ錯体への転換 — *Angew. Chem. Int. Ed.* の VIP (Very Important Paper) に選ばれる —

小倉尚志 (兵庫県立大院生命理・A03 公募研究代表者)

論文題目: Spectroscopic Characterization of a Hydroperoxo-Heme Intermediate: Conversion of a Side-On Peroxo to an End-On Hydroperoxo Complex
著者: Jing-Gang Liu, Takehiro Ohta, Satoru Yamaguchi, Takashi Ogura, Satoshi Sakamoto, Yonezo Maeda and Yoshinori Naruta
雑誌巻号: *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 9262 – 9267 (2009).

鉄イオンの価数は通常 2+ または 3+ とされているが、ヘム酵素の反応中間体には 4+ や 5+ に相当するものが見られ、高酸化型ヘム種 (High-valent heme species) と呼ばれている。これらは、 O_2 を基質とする酸素添加反応や酸素還元反応、さらに H_2O_2 を基質とするペルオキシダーゼ反応において、活性種であり重要な役割を果たす。これまでに、 $Fe^{4+}=O$ (フェリルオキシ) 型ヘムについて、酵素およびヘムモデル錯体について構造および反応性に関する幅広い研究が行われてきており、共鳴ラマン分光法によって $\nu_{Fe=O}$ モードが検出されている。その振動数は、高酸化型ヘム種を特徴付ける。 O_2 や H_2O_2 を基質とする酵素反応においては、 $Fe^{4+}=O$ 型ヘムの生成より先にペルオキシヘムやハイドロペルオキシヘムが出現するはずであるが、タンパク質では検出されていない。

本研究のモデル化合物は、TMPIIm (3-Imidazol-1-ylmethyl-N-{2-[10,15,20-tris-(2,4,6-trimethyl-phenyl)-porphyrin-5-yl]-phenyl}-benzamide) であり、これは軸配位子としてイミダゾールの N 原子がヘム Fe に配位している。このものに $-30^\circ C$ で KO_2 を反応させると茶緑色の **1** が得られた (図1)。 **1** は ESR スペクトルより、 η^2 -ペルオキシヘム種と考え



られる。その 441.6 nm 励起の共鳴ラマンスペクトルは、これまで使用してきた回転セル (173 K) では不安定で測定できなかった。そこで本研究では、図2に示す回転セルにより 77 K で測定することを試みた。得られた共鳴ラマンスペクトルには、 $^{16}O_2$ に対し、 807 cm^{-1} と 475 cm^{-1} にラマン線が観測され、 $^{18}O_2$ に対して、これらはそれぞれ 758 cm^{-1} と 455 cm^{-1} に低波数シフトを示した。この結果をもとに 807 cm^{-1} と 475 cm^{-1} のラマン線を **1** (図1) の ν_{OO} および ν_{Fe-O} モードに帰属した。サイドオン型 7 配位ペルオキシヘムの ν_{OO} および ν_{Fe-O} の両方の振動モードが観測されたのは初めてである。

つぎに **1** に $-65^\circ C$ でメタノールを添加したところ **2** を得たが、その吸収および ESR スペクトルはこのものがエンドオン型ハイドロペルオキシヘムであることを示唆した。その 77 K での共鳴ラマンスペクトルは、 $^{18}O_2$ 敏感ラマン線を 810 cm^{-1} と 570 cm^{-1} に与えたが、これらは重メタノール添加ではそれぞれ 814 cm^{-1} と 566 cm^{-1} にシフトを示した。これらの結果をもとに 810 cm^{-1} と 570 cm^{-1} のラマン線をそれぞれ **2** の ν_{OO} および ν_{Fe-O} に帰属した。

以上のことから本研究では、高スピン 7 配位 η^2 -ペルオキシヘムへのプロトン付加により低スピン 6 配位エンドオン型ハイドロペルオキシヘムへの転換が起きることを示した。また、このような不安定種の共鳴ラマンスペクトルを測定するための低温回転セル (77 K) の有効性を示した。

業績紹介: インドールアミン 2, 3 ジオキシゲナーゼ (IDO) の Fe-O₂ 型および Fe=O 型反応中間種の
検出 — Chem. Lett. の Editor's Choice 論文第 1 号に選ばれる —

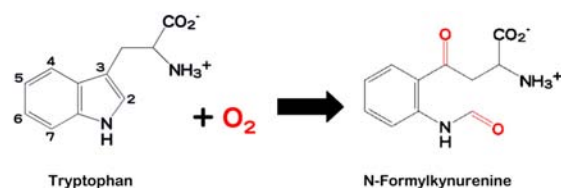
小倉尚志 (兵庫県立大院生命理・A03 公募研究代表者)
城 宜嗣 (理研播磨 SP8-Center・A03 公募研究代表者)

論文題目: Identification of the Fe-O₂ and the Fe=O Heme Species for Indoleamine 2, 3- Dioxygenase during Catalytic Turnover

著者: Sachiko Yanagisawa, Keiko Yotsuya, Yumi Hashiwaki, Masaki Horitani, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Evan H. Appelman and Takashi Ogura

雑誌巻号: Chem. Lett. **39**, 36 – 37 (2010).

インドールアミン 2, 3 ジオキシゲナーゼ (Indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO) は、ヒトのトリプトファン異化経路の最初に位置し、下記の酸素添加反応を触媒する。50 年以上前に早石らによ



って報告された。近年の研究によりトリプトファンの代謝産物は免疫系や神経系の障害、白内障などに関わっているとされ、IDO は再び注目されている。2006 年に杉本、城らにより結晶構造が報告された。それまでは、ヘムの近くに基質が結合した時、トリプトファンの NH の H を引き抜くアミノ酸残基が存在すると推定されており、それに基づいて反応機構が議論されていた。しかし、そのような残基が存在しないことが結晶構造によりはっきりした。

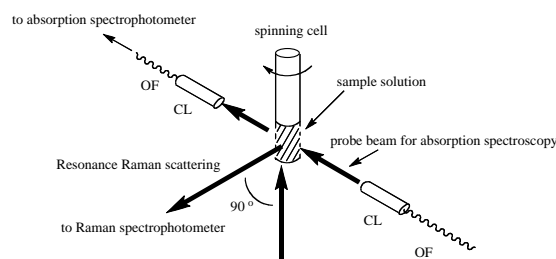
結晶構造が示唆する反応機構は、O-O 結合が開裂することなく基質に取り込まれる、というものだが、反応中間体の構造に関する情報が無く、詳細は不明であった。本研究では、IDO の還元型に酸素を加えて調製した酸素化型と、酸素化型に基質を加えてできる中間種 (593 nm に吸収帯を持つので“593 nm 種”と呼ぶ) の 413.1 nm 励起の共鳴ラマンスペクトルを測定し、活性部位ヘムの振動スペクトルを選択的に得た。

試料は内径 3 mm、外径 5 mm の円筒型回転セルに入れ、セル底面から励起レーザー光を入射して 90° 方向のラマン散乱光を観測した。回転セルは 1200 rpm で回転させ、励起光が局所に入射することによる光反応や温度上昇による反応中間体の分

解を防いだ。共鳴ラマンスペクトルの測定中、同時に吸収スペクトルを測定した。その時用いた光学系を下図に示す。この装置により、吸収スペクトル的に定義されたおのおの反応中間体の共鳴ラマンスペクトルの測定を確認した。

酸素化型反応中間体は、569 cm⁻¹ にラマン線を与えたが、これは ¹⁸O₂ に対しては 541 cm⁻¹ に 28 cm⁻¹ だけ低波数シフトしたので、エンドオン型の酸素

Raman/Absorption Simultaneous Measurement Geometry for a Spinning Cell



化型反応中間体の Fe-O₂ 伸縮振動に帰属した。一方、“593 nm 種”は、798 cm⁻¹ にラマン線を与え、これは ¹⁸O₂ に対しては 762 cm⁻¹ に 36 cm⁻¹ だけ低波数シフトした。振動モードはパーオキサイド (O₂²⁻) の ν_{OO} または Fe⁴⁺=O 型ヘムの ν_{Fe=O} の 2 つの可能性がある。これを区別するため、¹⁶O¹⁸O を用いた実験を行ったところ、ラマン線は 798 cm⁻¹ と 762 cm⁻¹ に ¹⁶O₂ と ¹⁸O₂ に対して観測されたラマン線のそれぞれ半分の強度で観測された。この結果を基にこのラマン線を Fe⁴⁺=O 型ヘムの ν_{Fe=O} に帰属した。このことは、IDO による酸素添加反応において反応の途中で O-O 結合が開裂することを意味し、これまで提案されてきた反応機構に反する結果である。

本研究は、触媒反応中の IDO について 2 つの反応中間体の配位構造を明らかにしたので、反応機構を考える上で重要な基礎を与えたことになる。

業績紹介：自然界に存在しない「プロトンポンプの逆向き輸送」を実現

神取秀樹 (名工大院工・総括班研究協力者)
古谷祐詞 (分子研・A01 班公募研究代表者)

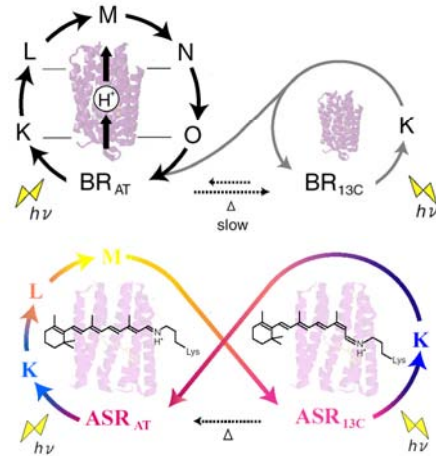
論文題目: "Engineering an inward proton transport from a bacterial sensor rhodopsin"

著者: Akira Kawanabe, Yuji Furutani, Kwang-Hwan Jung, and Hideki Kandori

雑誌巻号: *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 16439-16444 (2009)

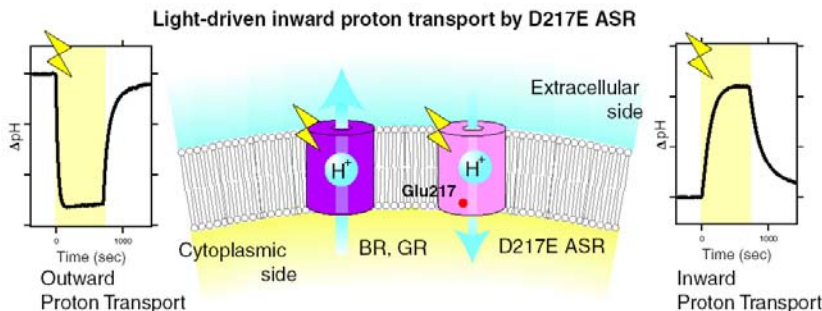
プロトンポンプ蛋白質は濃度勾配に逆らってプロトンを輸送することができる。疎水的な蛋白質内部に水分子を含む水素結合ネットワークが過渡的に形成される結果と考えられるが、エネルギー入力からポンプという機能に至る蛋白質構造変化の連動性はたいへん興味深い。我々は代表的なプロトンポンプであるバクテリオロドプシンの赤外分光解析により、これまで内部結合水の重要性を明らかにしてきた[1]。こうして形成されたプロトンの濃度勾配が ATP 合成酵素を駆動し、「生物のエネルギー通貨」である ATP の合成に使われる。ATP 合成酵素は細胞の内部へのプロトンの流入と共役して ATP を合成するため、天然に存在するプロトンポンプはすべて外向きである。細胞内側へのプロトン輸送は生命にとって自殺行為とも言えるため天然には全く存在せず、人工的にも内向きの水素イオン輸送を実現した例は皆無であった。

今回、我々はラン藻由来の *Anabaena* sensory rhodopsin (ASR) という古細菌型ロドプシンを用いて内向きのプロトン輸送を実現した。ASR は実にユニークなロドプシンであり、バクテリアの光センサーが膜貫通の伝達蛋白質を活性化するのに対し、細胞質側で水溶性の伝達蛋白質を活性化するフォトクロミズムセンサーであると考えられている。実際に我々が光反応を検討したところ、バクテリオロドプシンなどが全ト



ランス型からの 100 % のサイクル反応を示すのに対して、ASR は異性化さえすれば 100 % のフォトクロミズム反応を示すことを明らかにしている[2]。光センサーである ASR にはプロトンポンプ能力はないと言われていたが、我々は D217E という変異体がプロトンポンプ活性をもつこと、さらにその方向は内向きであることを見出した。特に興味深いのは、ポンプの方向性を決定するスイッチ部位はレチナール近傍に存在するとこれまで考えられていたのに対し、15 Å も離れた細胞質側に変異を導入したという点であり、論文中では赤外分光を用いた解析によりプロトンの親和性という観点からメカニズムを説明している。

どうやってこんなものをつくったかという問いをよく受けるが、本成果は博士研究員の川鍋君が赤外バンドの帰属のため変異体を系統的に作製する中で特異なカルボン酸の信号を観測したことが発端となった。振動分光解析という地味な研究の中から、機能の創造が産まれたという意味で、高次系分子科学の将来を示唆する研究例と言えるかもしれない。光で内向きプロトン輸送が可能となったため、脳神経回路の研究など様々な応用も期待されている[3]。



[1] 神取秀樹, *日本物理学会誌* **56**, 75 (2001); H. Kandori, *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 177 (2000); *ibid* **1658**, 72 (2004).

[2] A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung and H. Kandori, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8644 (2007).

[3] 中日新聞 平成 21 年 9 月 30 日、読売新聞 9 月 30 日、日刊工業新聞 10 月 15 日掲載

日本分光学会生細胞分光部会

平成 21 年度生細胞部会シンポジウム 報告

藤野竜也 (首都大院理工・A02 計画研究代表者)

主催：日本分光学会

共催：首都大学東京大学院 GP

日時：平成 21 年 12 月 4 日

場所：首都大学東京 8 号館 2 階大会議室

近年の分子分光学の発展により、生きた細胞をあるがままにその場計測することが可能となってきた。蛍光蛋白質を用いた蛍光イメージングや、線形および非線形ラマン散乱によるラマンイメージングにより、生細胞の中にある分子をマッピング、そして時間分解するなど時空間情報を高い感度で取得する技術が確立されてきた。さらに非線形分光過程を利用する超解像赤外イメージング等を導入してこれら先鋭化する試みが盛んに行われている。その結果、分光学を基盤とした「生細胞の分子科学」とも呼ぶべき新分野が、従来の物理学、化学、生物学の垣根を超えて創成されつつあり、医学、薬学、農学、工学の分野でのさまざまな萌芽的新技术を先導しつつある。生細胞を見る新しい手法を開発しようとする分光学者と、それを利用して生細胞の分子機構を解明しようとする物理、化学、生物学者がこの部会に集うことによって、分光学会の翼がとくに生物学の方向に向かって大きく広がるものと期待して本シンポジウムは開催された。プログラムは以下のとおりであった。

12:50 開会挨拶

13:00-13:40 酒井誠 (東工大資源研)

「赤外超解像顕微鏡を用いた生細胞の赤外イメージング」

13:40-14:20 田岡万悟 (首都大院理工)

「リボヌクレオプロテオミクス:液体クロマトグラフィーと質量分析を基盤とした低分子 RNA 同定法の開発」

14:20-15:00 熊崎茂一 (京大院理)

「葉緑体内部構造を見るための 2 光子励起蛍光スペクトル顕微鏡の諸様式」

休憩

15:20-16:00 中林孝和 (北大電子研)

「蛍光寿命イメージングを用いる細胞内環境計測の展開」

16:00-16:40 西舘泉 (農工大院生物)

「光散乱スペクトルを利用した生理機能計測」

16:40-17:20 伊藤隆 (首都大院理工)

「In-cell NMR を用いた生細胞内蛋白質の立体構造解析」

17:20 閉会挨拶

17:30 意見交換会

酒井誠氏の発表では、赤外光と可視光の和周波発生により超解像を達成した顕微鏡が紹介され、ガン細胞などへの応用例が示された。赤外顕微鏡では極めて高い $1\mu\text{m}$ 程度の空間分解能が出ることも示された。田岡万悟氏の発表では独自に開発したナノ ESI (エレクトロスプレーイオン化) 質量分析法及び微量送流ポンプを用いた RNA 研究に関する結果が示された。熊崎茂一氏の発表ではライン走査型二光子蛍光顕微鏡に始まり、同一細胞での顕微吸収と顕微蛍光分光を行える装置などの紹介がなされ、葉緑体の特に系 1 機構を選択的に観測できることが報告された。休憩を挟み、中林孝和氏による発表が行われた。ナノ秒領域における時間分解蛍光を単一指数関数を仮定して測定することにより、細胞内の pH に関する報告がなされた。西舘泉氏は RGB カメラを用いて反射画像を色分割し、血液の流れを画像化する手法が発表された。伊藤隆氏は生きた細胞中の蛋白質構造を NMR で実際に観測した結果が報告された。以上の発表の後には意見会が開かれ、打ち解けた雰囲気の中で参加者の間で討論が続けられた。

シンポジウムには研究者、大学院生、合わせて 55 名の参加があった。太田信廣先生、浜口宏夫先生、藤井正明先生、朝日剛先生などの御参加を得て盛況のうちにシンポジウムを開催することができた。この場を借りて御礼申し上げます。