

## 業績紹介：尿酸の疎水的性質を水和クラスターの立場から検討

三枝洋之（横浜市立大・  
生命ナノシステム科学研究科・公募研究代表者）

論文題目：“Structural characterization of uric acid and its monohydrates by IR-UV double resonance spectroscopy”

著者：H. Asami, S. Urashima and H. Saigusa 雑誌  
巻号：Phys. Chem. Chem. Phys., 13, 20476-20480 (2011).

人や霊長類におけるプリンヌクレオチドの代謝過程では、最終分解生成物である尿酸（図 1）が生成し、尿に排泄される。尿酸は難溶性で体内に蓄積されやすいため、痛風など多くの病気を引き起こす原因となる。本研究では、尿酸の疎水的性質を分子論的に明らかにするために、水和クラスターの立場から検討することを試みた。尿酸は熱的に不安定であるため、これまで気相で研究報告はなされていない。

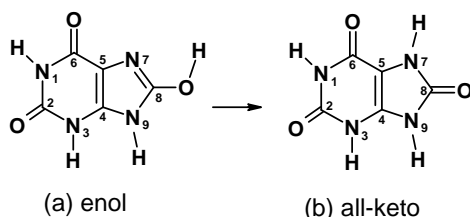


図 1. 尿酸の構造. (a) enol, (b) all-keto.

尿酸の生成過程では、前駆体であるキサンチンからまずエノール体(a)が生成し、これが安定な all-keto 体(b)に変化するとされている。このような互変異性化を調べるために、レーザー脱離・超音速分子線法を用いて、孤立冷却した尿酸単体の赤外振動スペクトルを測定したところ、最安定構造である all-keto 体(b)と帰属された。

一方、尿酸一水和物では2つの構造異性体が観測された。それぞれの赤外振動スペクトルを図 2 に示す。異性体(a)では、単体で  $3519\text{ cm}^{-1}$  に観測される N9H 伸縮振動が、 $3322\text{ cm}^{-1}$  にシフトしていることから、この水和物は N9H に水和した構造[図 3(a)]であることが分かる。一方異性体(b)では、N3H 伸縮振動が  $3494\text{ cm}^{-1}$  から  $3266\text{ cm}^{-1}$  にシフトしていることから、図 3(b)の構造と帰属される。これら2つの異性体はいずれも keto 体の一水和物であり、計算で得られた最安定構造である。これ以外にも4つの異性体が  $6\text{ kJ/mol}$  以内で安定に存在することが計算から示唆され、尿酸は

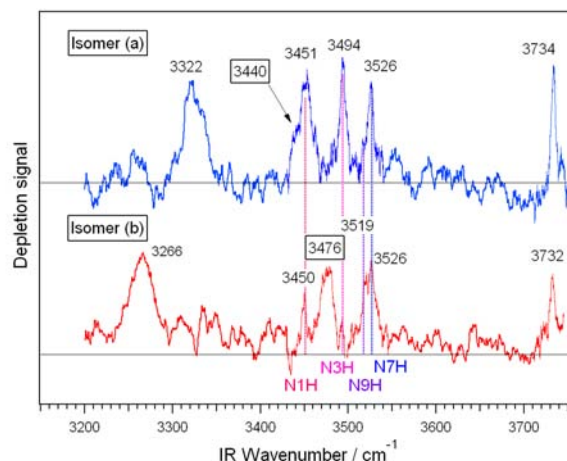


図 2. 尿酸一水和物の異性体の赤外振動スペクトル.

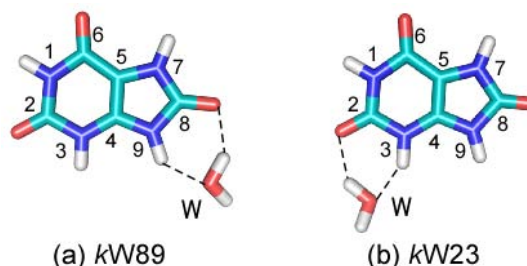


図 3. 観測された尿酸一水和物の構造.

特に安定な水和サイトを持たないことが分かる。一方、グアニンやアデニンでは、Watson-Crick 結合にも用いられるような特定の水和サイトが存在する。

また図 2 の赤外スペクトルには、水素結合した水の OH 伸縮振動が(a)では  $3440\text{ cm}^{-1}$ 、(b)では  $3476\text{ cm}^{-1}$  に観測される。一方グアニン類の一水和物では、 $3300\text{ cm}^{-1}$  以下に低波数シフトすることから、尿酸水和物では水素結合による水分子の分極が小さいことが分かる。しかし、両者の結合エネルギーは殆ど同じであることから、水和による水分子の分極が、その後の水和のしやすさを支配しているものと推定される。実際、グアニンで見られる二水和物以上の高次クラスターは、尿酸では殆ど観測されない。以上のことから、尿酸では第一水和圏に水和しても、その後水和ネットワークを形成しにくいと推定され、疎水性を示すものと考えられる。

今後、生体分子の構造や性質が水和によりどのように影響を受けるかを、分子レベルで明らかにすることを目指していきたい。

## 業績紹介：ドメイン構造を有する光合成アンテナ膜タンパク質の組織化

出羽 毅久 (名工大院工・A02 公募班)

論文題目："Selective Assembly of Photosynthetic Antenna Proteins into a Domain-Structured Lipid Bilayer for the Construction of Artificial Photosynthetic Antenna Systems: Structural Analysis of the Assembly Using Surface Plasmon Resonance and Atomic Force Microscopy"

著者：Ayumi Sumino, Takehisa Dewa, Masaharu Kondo, Takashi Morii, Hideki Hashimoto, and Mamoru Nango  
雑誌巻号：Langmuir 27, 1092-1099 (2011)

光合成膜での光反応の初期過程では、高密度に集合したアンテナ膜タンパク質(光収穫系複合体: LH2, LH1)と反応中心複合体(RC)により高効率な光エネルギー収穫と電荷分離が行われている。紅色光合成細菌では、アンテナ膜タンパク質(コアアンテナ: LH1)と RC が一体化した複合体(LH1-RC)となり、LH2 で吸収された光エネルギーを効率よく LH1 で集光し電荷分離へと導いている。光合成膜中での LH2 および LH1-RC の分散状態は不均一であることが原子間力顕微鏡像(AFM)により観察され[1,2]、ある菌種の膜中では、LH2 と LH1-RC がそれぞれ集合した相分離様の構造が観察された[1]。しかし、LH2 と LH1-RC の集合構造と機能との関係は不明である。そこで、人工的に LH2 と LH1-RC の分散状態を制御する手法が確立できれば、連動/協同して機能している LH2 と LH1-RC の集合構造と機能(エネルギー移動・電荷分離)との相関の解明につながる。

本研究では、LH2 と LH1-RC を空間的(数十マイクロン)に分離してガラス基板上に組織化する手法を確立した。図 1 にその手法の模式図を示す。膜タンパク質の環境を天然類似にするために、脂質二分子膜を基盤とする組織化手法を考案した。まず、アミノ基修飾を施したカバーガラス(A: APS-modified cover glass)上にアニオン性ベシクルを添加し、パッチ状の平面脂質二分子膜を形成する(B)。そこに、LH2 を組み込んだカチオン性ベシクルを添加すると、B で形成したアニオン性脂質膜領域に静電相互作用により膜融合し[3]、LH2 が導入される(C)。図中の写真は全反射顕微鏡により観察された LH2 由来の蛍光画像であり(スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ )、B であらかじめ形成された脂質二分子膜(B)での蛍光はローダミン脂質によるもの)に選択的に LH2

が導入されていることが分かる。AFM 観察より、膜融合後も 1 層の脂質二分子膜形状を保っていることがわかった。次に、LH1-RC を再構成したアニオン性ベシクルを添加すると、C で形成した脂質ドメインの外側(APS ガラス基板)の領域に選択的に吸着・平面膜化し、LH1-RC が組織化されることが示された(D)。これらのプロセスで膜タンパク質は変性せずに組織化される。今後、タンパク質の高密度化とサブミクロンレベルのドメイン構造の形成により、エネルギー移動・光電流発生等の機能評価が可能となると期待できる。

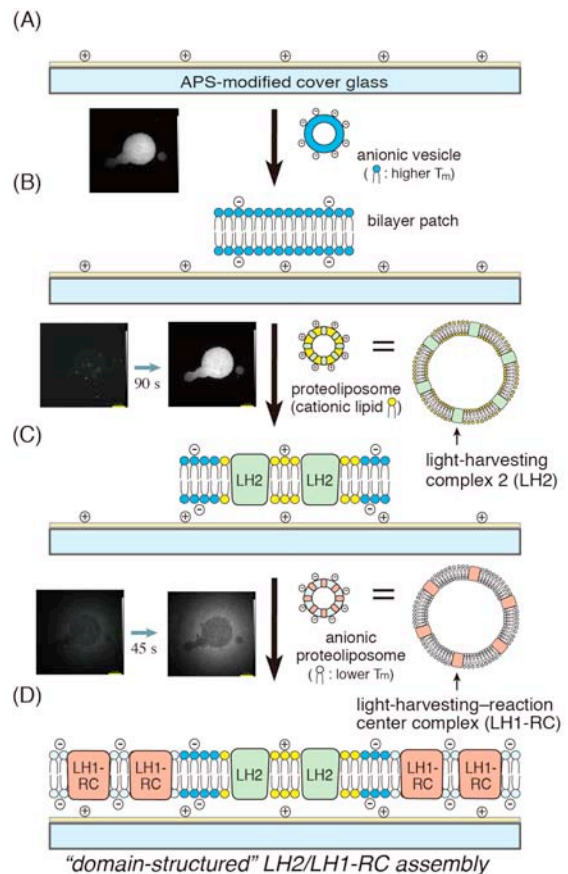


図 1. 脂質が形成するドメイン構造中への光合成アンテナ膜タンパク質(LH2, LH1-RC)の選択的組織化。化学修飾を施したカバーガラス(A)上で段階的に LH2 および LH1-RC を脂質膜とともに膜融合させることにより、ドメイン構造を有する組織構造が形成できる(C-D)。

### 引用文献

- [1] S. Bahatyrova, et al. *Nature* **430**, 1058-1062 (2004).
- [2] S. Scheuring and J. Sturgis *Science* **309**, 484-487 (2004).
- [3] T. Dewa, et al. *Langmuir* **22**, 5412-5418 (2005).

## 業績紹介：膜タンパク質機能解明のための細胞膜類似構造を有する 繋ぎ止め平面脂質二分子膜の作成

出羽 毅久 (名工大院工・A02 公募班)

論文題目：“Construction and Structural Analysis of Tethered Lipid Bilayer Containing Photosynthetic Antenna Proteins for Functional Analysis”

著者：Ayumi Sumino, Takehisa Dewa, Mamoru Nango, et al.

雑誌巻号：Biomacromolecules 12, 2850-2858 (2011)

単離精製した膜タンパク質の機能を調べるためには、活性を維持した状態で安定化に膜タンパク質を固定化できる実験系の構築が重要である。膜タンパク質は脂質二分子膜環境で機能しており、この点から膜タンパク質を脂質二分子膜中に再構成し基板などの固体表面に適切に固定化する手法が有用である[1]。しかし、大きな膜外ドメインを有する膜タンパク質の場合、固体表面との物理的接触により、変性や活性の低下が大きな問題となる[2]。固体と脂質二分子膜間に膜外ドメインを収納できる水層を設けることにより、固体表面と膜タンパク質の接触を避けることが可能となる。本研究では、アビジンとビオチンとの結合を利用することによりカバーガラス表面に平面脂質二分子膜を”繋ぎ止め”、平面膜とガラス表面間に約 5 nm の水層を有する細胞膜類似の繋ぎ止め平面脂質二分子膜を作成した。また、膜中に光合成アンテナ膜タンパク質(LH2, LH1-RC)を導入し、その機能(LH2 から LH1-RC へのエネルギー移動)を評価した(図 1)。

繋ぎ止め脂質二分子膜の作成方法は下記の通りである。化学修飾を施したカバーガラス表面にアビジンを共有結合により固定化し、そこにビオチン化脂質を導入したりポソームをアビジン-ビオチン結合により繋ぎ止める。その後、低張液による浸透圧ショックによりリポソームを破裂させると、隣り合うリポソーム同士がつながり、連続的な平面脂質二分子膜が形成される。それぞれのプロセスは原子間力顕微鏡(AFM)と全反射型蛍光顕微鏡により確認された。膜タンパク質(LH2 あるいは LH1-RC)を再構成したりポソームを用いると、膜タンパク質が導入された繋ぎ止め脂質二分子膜が得られる(図 1)。LH1-RC は RC(反応中心複合体)部分に膜面から約 3 nm 突出した H サブユニットを有している。LH1-RC を再構成したりポソームを直接

ガラス基板の上に平面膜化させると、LH1-RC は膜中で側方拡散できないが、繋ぎ止め脂質二分子膜中では高い側方拡散性が認められた。これは、平面膜—基板間の水層(~5 nm)の存在により RC の H サブユニットと基板との接触が解消された結果であると考えられた。

繋ぎ止め脂質二分子膜に導入された LH2 および LH1-RC の吸収スペクトルから、変成せずに存在していることが示された。LH2 と LH1-RC の共存膜系での定常蛍光を計測したところ、LH2 の B800 吸収帯の励起により、LH2 および LH1-RC の両方からの蛍光が観察された。LH2 および LH1-RC の発光でフィッティングすると、LH1-RC の含量の増加により LH2 の発光が減少し、LH1-RC の蛍光が増加したことから、繋ぎ止め脂質二分子膜中で LH2 から LH1-RC へのエネルギー移動が起こっていることが示唆された。

本研究での光合成アンテナ膜タンパク質を組み込んだ繋ぎ止め脂質二分子膜の構築により、今後、様々な膜タンパク質の機能解明のためのプラットフォームとなると期待できる。

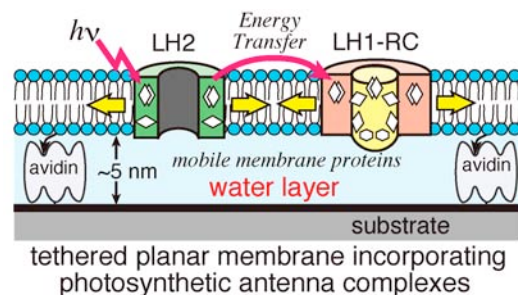


図 1. 細胞膜類似構造を有する平面脂質二分子膜の模式図。固体基板(カバーガラス)上にアビジンを固定化し、ビオチン化脂質により平面脂質二分子膜を「繋ぎ止め」る。これにより、基板と平面膜間に約 5 nm の水層が形成される。

### 引用文献

- [1] V. Früh, A. P. IJzerman, and G. Siegal *Chem. Rev.*, **111**, 640-656 (2011).  
[2] M. Tanaka and E. Sackmann *Nature* **437**, 656-663 (2005).

## 班友の片岡幹雄氏が日本中性子科学会賞を受賞

水谷泰久（阪大院理・A03計画研究代表者）

班友の片岡幹雄氏（奈良先端大物質）が、日本中性子科学会の学会賞を受賞されました。受賞の大きな理由となったイェロープロテインの水素結合ネットワークの性質に関する研究は、水素結合の新しい側面を明らかにした重要なものあり、また本特定領域研究の中でも理論・実験の両面にわたり注目されています。領域としても氏の受賞を心からお祝い申し上げたいと思います。

日本中性子科学会は、中性子科学の発展に著しく寄与した者の功績をたたえるため、毎年学会賞を授与しており、今年が9回目になります。学会賞は、中性子科学の進歩発展に寄与し、その業績が顕著な者に対し授与されることになっています。11月22日筑波で開催中であった第1回アジアオセアニア中性子散乱会議の際、授賞式と受賞講演が行われました。日本中性子科学会による片岡幹雄氏の受賞理由は以下の通りです。

**受賞課題：中性子生物物理学（中性子非弾性散乱による蛋白質の動力学の研究ならびに中性子結晶構造解析によるイェロープロテインの水素結合ネットワークの性質に関する研究）**

### 授賞理由：

片岡幹雄氏は、我が国における中性子生物物理学の指導的立場にある研究者である。特に日本で本格的に中性子非弾性散乱を用いた蛋白質分子のダイナミクスの研究を開始し、世界に比肩するまで研究レベルを引き上げたことは特筆に値する。ここに至る業績を簡単に述べる。蛋白質の精度のよい中性子非弾性散乱スペクトルを測定し、基準振動解析と合わせて、この方法が蛋白質動力学解析の新しいツールとして利用できることを示した。蛋白質のボゾンピークの起源について、分子内の2次構造に由来する説を完全に否定し、分子全体に広がったモードであることを明らかにした。水と動力学の関係を詳細に調べ、水によって蛋白質分子の調和的性質が硬くなり、かつこれが水和率に対し線形であることを明らかにした。また、動力学転移の水和率依存にしきい値の存在することを明らかにし

た。このしきい値の起源を明らかにし、蛋白質機能と水和水ダイナミクスの関係を明らかにしている。一方、中性子結晶解析によって、イェロープロテインの全912個の水素原子のうち849個を決定した。これにより水素結合網を詳細に検討し、発色団と特定のアミノ酸の間の特異な水素結合（低障壁水素結合）を見出した。低障壁水素結合の発見は、タンパク質においては世界初である。また、この発見は、46番目のアミノ酸がプロトン化し発色団が脱プロトン化しているとするこれまでの説を完全に否定したため、この説に基づいていたこれまでの全ての実験結果の解釈の変更を求めらるほどの大発見である。これまでの説に代わり、低障壁水素結合から通常の水素結合への緩和という光受容蛋白質の光反応初期過程の新しい生理学的プロセスを提唱した。さらにこの研究を進めるにあたって、1.5Å分解能という中性子解析での世界最高分解能を達成し、このデータとX線結晶構造解析データを併用した信頼性の高い分子構造精密化方法を提示した点も特筆される。

以上のように、片岡氏は中性子非弾性および弾性散乱を有効に使い、蛋白質分子の物性物理研究を推進し生理学的機能との関連を提示した。これは中性子科学の進歩発展に大きく寄与し、これらの業績は日本中性子科学会「学会賞」に値する。



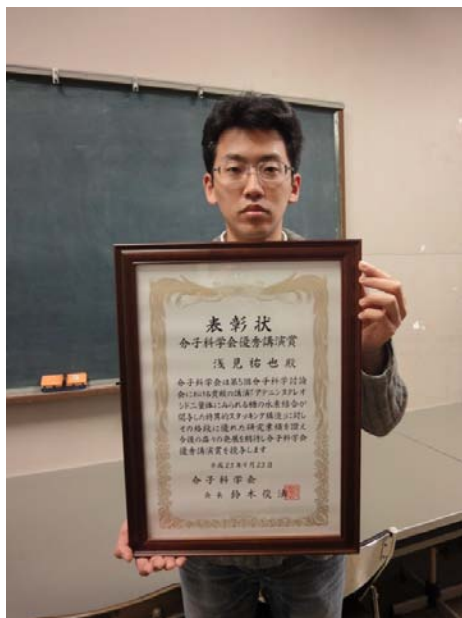
授賞式で金谷中性子科学会長と片岡氏

## 第 5 回分子科学討論会2011札幌 優秀講演賞を受賞

三枝洋之（横浜市立大・A01 公募研究代表者）

八木清（イリノイ大化学・A01 研究協力者）

横浜市立大学三枝グループ（A01 公募班）の大学院生、浅見祐也君（D2）が平成 23 年 9 月 20–23 日に行われた第 5 回分子科学討論会（札幌コンベンションセンター）において口頭発表「アデニンヌクレオシド二量体にみられる糖の水素結合が関与した特異的スタッキング構造」を行い、優秀講演賞を受賞しました。本研究は、同じ A01 班の研究協力者である八木グループとの共同研究として行われたもので、気相部門では 2 名が受賞した。



三枝グループではこれまで、グアノシンをレーザー一脱離法により気相孤立化し、糖を含む立体構造や水和構造を決定してきた。今回、図 1 に示したアデノシン(Ado)と、アミノ基をジメチル化したジメチルアデノシン(DMAdo)について同様の測定を行ったところ、DMAdo の 2 量体の特異的に安定であることを見出した。

図 2(a)に示した DMAdo の 2 量体の赤外スペクトルは非常にブロードであるが、糖間の水素結合によるスタッキング構造（図 3）を仮定すると解釈できる。しかし、

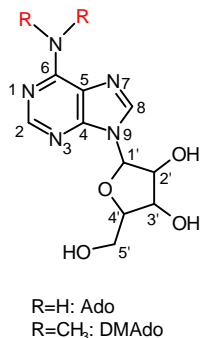


図 1. Ado と DMAdo の構造。

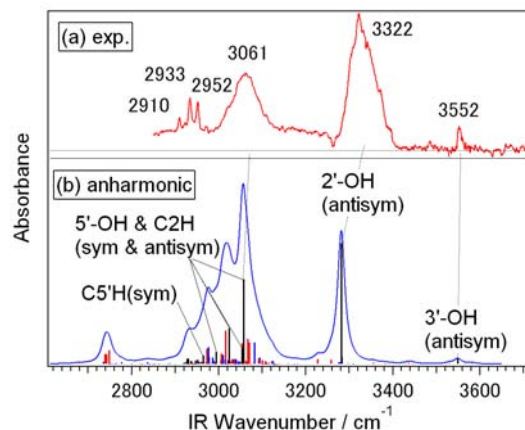


図 2. (a)DMAdo 2 量体の赤外振動スペクトル, (b)Ado 2 量体の非調和振動計算. 非調和振動計算の負荷を軽減するため、図 3 に示した DMAdo と同じ構造の Ado 2 量体について計算した. Ado 2 量体の赤外スペクトルは、高次クラスターの解離のため正確な測定が困難であった。討論会で報告後、スペクトルの S/N 比と計算精度が飛躍的に向上した。

通常行われる調和振動計算では、糖の 3 つの OH 伸縮振動による 3 本のピークは再現できるが、C<sub>2</sub> 対称性を持つ高次スタッキング構造の詳細については全く知ることができない。

そこでこのような大規模分子系にも拘わらず、高精度の非調和振動計算を試みた。図 2(b)に示した結果をみると、黒線で示した OH 伸縮振動などの基音の振動数が、スケールリング因子なしに実験値をよく再現していることが分かる。更

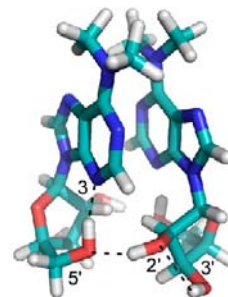


図 3. DMAdo のスタッキング構造。

に、3200 cm<sup>-1</sup> より低波数に現れるブロードなバックグラウンドは、低振動モードとの共鳴効果 [2:1 共鳴（赤線）や 3:1 共鳴（青線の棒線）] によると解釈できる。一方、実験のスペクトルでは 2950 cm<sup>-1</sup> 以下に CH 伸縮振動と帰属できるバンドが強く現れることや、3322 cm<sup>-1</sup> の 2'-OH 伸縮振動のブロードニングを再現できないことは、計算精度がまだ不十分であることを示している

我々のグループが目指す、生体分子による高次水素結合ネットワークの構造解析には、このような非調和振動計算によるアプローチが有力で、更なる展開を期待している。なお本研究の成果は、論文として投稿済である。