

業績紹介：神経伝達物質ドーパの特異的に安定な構造の出現機構の解明

石内俊一（東工大資源研・A01 計画研究分担者）
藤井正明（東工大資源研・A01 計画研究代表者）

論文題目："Conformational reduction of DOPA in the gas phase studied by laser desorption supersonic jet laser spectroscopy"

著者：Shun-ichi Ishiuchi, Haruhiko Mitsuda, Toshiro Asakawa, Mitsuhiko Miyazaki and Masaaki Fujii

雑誌巻号：Phys. Chem. Chem. Phys., **13**, 7812-7820 (2011)

我々は神経伝達物質であるカテコールアミン類に対して気相分光の手法を適用し、それらのコンフォメーションを研究してきた。その結果、カテコールアミンの気相中で観測されるコンフォメーションの数は特異的に少ない事を明らかにした[1]。カテコールアミンであるドーパはチロシンのフェノール性水酸基の隣にもう1つ OH 基を有する。チロシンでは気相中で8種のコンフォマーが観測されているが[2]、ドーパでは1種のみが観測される。この様な劇的なコンフォマー数の減少は3-位の OH 基とアミノ酸鎖との相互作用が原因ではないかと考え、3-位にのみ OH 基を有するメタチロシンについて調査したところ、14種のコンフォマーが観測された。この事から、3-位の OH 基とアミノ酸鎖との相互作用はなく、隣接する2つの OH 基が揃って初めてコンフォマー数が劇的に減少する事が明らかとなった。そこで、本研究では、ドーパに対して赤外分光及び量子化学計算を適用し、特異的に安定なコンフォマーの構造を明らかにする事により、その安定性の起源の解明を試みた。

図1にジェット冷却したドーパの赤外スペクトルを示す。カテコールの赤外スペクトル[3]との比較から、 3660 cm^{-1} と 3607 cm^{-1} のバンドを、自由なカテコール環 OH 伸縮振動及び分子内水素結合したカテコール環 OH 伸縮振動と帰属した。 3426 cm^{-1} 及び 3333 cm^{-1} のバンドとブロードな 3205 cm^{-1} のバンドは、フェニルアラ

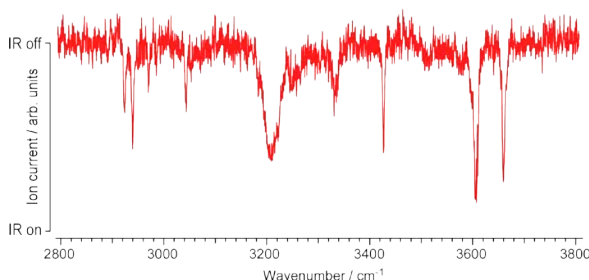


図1 ドーパの赤外スペクトル

ニンの赤外スペクトル[4]との比較から、 NH_2 の逆対称及び対称伸縮振動、及び OH \rightarrow N 型の水素結合を形成した COOH の OH 伸縮振動と帰属した。

構造帰属のために、考え得る88種のコンフォマーに対し種々の手法で構造最適化及び基準振動解析を行い、実測の赤外スペクトルを最もよく再現する構造を探索した。その結果、全ての計算手法で最も安定であると予測される構造(図2参照)が実験結果を最もよく再現する事が分かった。

この構造の特異的な安定性は、Hartree-Fock レベルの低レベルな量子化学計算でも再現される事から、基本的な静電相互作用で説明できると考えた。カテコール OH 基は分子内水素結合により配向が固定され、それが作る部分双極子モーメントは単独の OH 基のほぼ2倍となる事から、カテコール OH 基とアミノ酸鎖の部分双極子モーメントの相互作用に注目した。図2に示す様に、観測される構造ではそれらの双極子モーメントがほぼ反平行となっており、また、実際に相互作用エネルギーを計算したところ、予想通り双極子-双極子相互作用による安定化が最大である事が分かった。

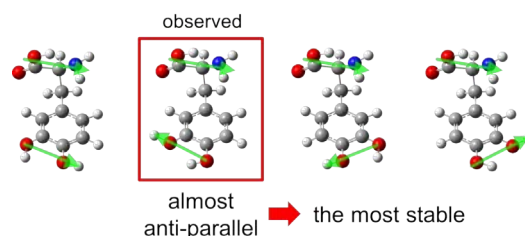


図2 ドーパの最安定構造と種々のカテコール OH 基配向における双極子-双極子相互作用

[1] H. Mitsuda, M. Miyazaki, I. B. Nielsen, P. Çarçabal, C. Dedonder, C. Jouvret, S. Ishiuchi, M. Fujii, *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 1130-1133 (2010).

[2] Y. Inokuchi, Y. Kobayashi, T. Ito, T. Ebata, *J. Phys. Chem. A* **111**, 3209-3215 (2007).

[3] H. G. Kjaergaard, D. L. Howard, D. P. Schofield, T. W. Robinson, S. Ishiuchi, M. Fujii, *J. Phys. Chem. A*, **106**, 258-266 (2002).

[4] T. Ebata, T. Hashimoto, T. Ito, Y. Inokuchi, F. Altunso, B. Brutschy, P. Tarakeshwar, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 4783-4791 (2006).

業績紹介：NO 分子間の共有結合を制御、可視化

奥山 弘 (京大院理・公募研究代表者)

論文題目："Imaging covalent bonding between two NO molecules on Cu(110)"

著者：A. Shiotari, Y. Kitaguchi, H. Okuyama, S. Hatta, and T. Aruga

雑誌巻号：Phys. Rev. Lett. **106**, 156104/1-4 (2011)

分子（原子）間の波動関数の重なりを制御することにより、共有結合を形成・解離することは化学反応制御の一つの基礎である。一酸化窒素(NO)は不対電子を有しており、分子間の共有結合によりダイマーを形成することはよく知られている。本研究では Cu(110)表面に吸着した2つのNO分子間の距離を変化させることにより分子間の電子状態の重なりを制御し、共有結合の可視化を行った。

図1 aはCu(110)に吸着した2つのNO分子の走査トンネル顕微鏡(STM)像である。各分子はダンベル状に観測されている。STMはフェルミ準位における分子-基板の電子状態密度を画像化するので、ダンベル形状はNOの不対電子の電子状態($2\pi^*$)を反映している。片方の分子を操作することで、分子間距離を $4a_0$ (図1a)、 $3a_0$ (1b)、 $2a_0$ (1c)、 a_0 (1d)とした。ここで $a_0=0.256$ nmは基板のCu-Cu原子間距離である。 $3a_0$ (図1b)までの分子間距離ではそれぞれのNO分子はほとんど独立に見える。一方、 $2a_0$ (図1c)では重なりが生じてその部分のコントラストが下がっている。相互作用によってフェルミ準位近傍の電子状態が変化したことを示唆している。さらに a_0 (図1d)まで接近すると、 $2\pi^*$ の状態密度はフェルミ近傍から消滅してしまう。状態密度はトンネル分光(STS)に現れる(図2)。孤立したNO分子の状態密度はフェルミ準位にピークを示す(空いた $2\pi^*$ 軌道、図2a下)。一方、 $2a_0$ の距離で相互作用する(NO)₂は-30 mV, 30 mVにそれぞれ結合性、反結合性軌道が形成され(図2a上)、それらの空間分布は $2\pi^*$ 軌道間の σ 型の共有結合を示している(図2b,2c)。正確には各々の $2\pi^*$ 軌道は基板と混成しているので、基板の電子状態も併せたNO間の共有結合といえる。本研究は共有結合を距離の関数として制御、可視化したものであり、今後は水素結合の制御と併せて基板上に多彩な人工構造物の作成を行い、高次ダイナミクスの観測へと展開したい。

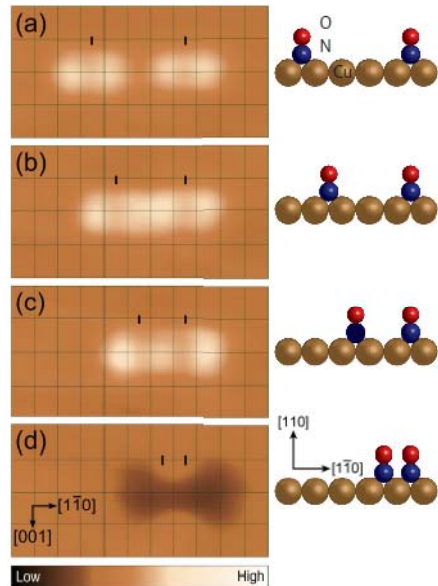


図1 2つのNO分子間の相互作用。格子線は基板のCu(110)を表わし、横方向の格子定数 $a_0=0.256$ nmである。左のNO分子を操作し、 $4a_0$, $3a_0$, $2a_0$, a_0 の距離まで近づけた。 $2a_0$ 以下では相互作用により電子状態に変化が見られる。

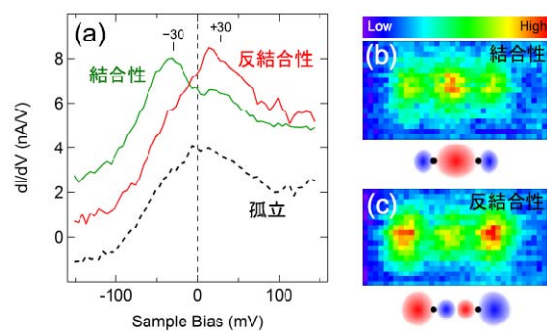


図2 (a) 孤立NO分子と $2a_0$ 離れた(NO)₂(図1c)に対する $2\pi^*$ 状態密度。孤立NOではフェルミ準位(0 mV)にピークを持つが、(NO)₂では相互作用により結合、反結合状態に分裂する。(b,c) 結合性、反結合性軌道の状態密度(STSピーク)の空間分布。

業績紹介：アンチストークス顕微蛍光スペクトルの特性評価と顕微吸収スペクトルの併用 --- 緑藻と植物の差異、およびクロロフィル会合体形成過程の観測---

熊崎茂一（京大院理・計画研究代表者）

論文題目：“Anti-Stokes Fluorescence Spectra of Chloroplasts in *Parachlorella kessleri* and Maize at Room Temperature as Characterized by Near-Infrared Continuous-Wave Laser Fluorescence Microscopy and Absorption Microscopy”

著者： Makoto Hasegawa, Takahiko Yoshida, Mitsunori Yabuta, Masahide Terazima, and Shigeichi Kumazaki

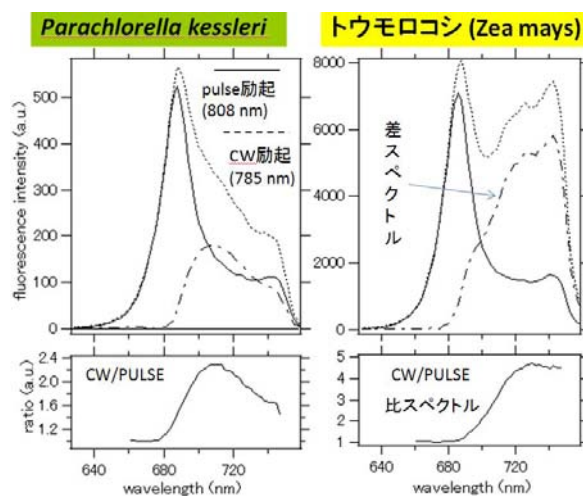
雑誌巻号: *J. Phys. Chem. B*, 115(14) 4184 - 4194, (2011)

先の論文(*Plant Cell Physiol.* 51(2) 225 - 238, (2010))で報告したように、我々は「常温では葉緑体の系 I 蛍光が見えない (非常に見えにくい)」という葉緑体研究の常識を覆すアンチストークス蛍光スペクトル法を提案し、常温の葉緑体で内部の系 I と系 II の蛍光強度分布を画像化することに世界で初めて成功した。しかし、トウモロコシの葉緑体 (葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体) で確認されたのみの現象であったため、その信号がどれだけ正確に系 I 蛍光スペクトルを表しているのかについて疑念が残されていた。本論文では、トウモロコシの葉緑体と共に緑藻の一種であるクロレラ (*Parachlorella kessleri*) においてアンチストークス蛍光スペクトルを調べた。クロレラにおいては 77K などの低温で系 I 蛍光スペクトルの極大波長が 715-725nm であると報告されており、トウモロコシなどの植物が 735-740nm に極大波長を示すのに比べ短波長である。この特徴を常温の系 I アンチストークス蛍光スペクトルが示すのか否かに着目した。

果たして、ほぼ期待通り、クロレラの場合、連続発振レーザー (785 nm) によって増大する系 I 特有成分の極大波長は 710 nm であった (図 左パネル)。トウモロコシでは葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体の両方において、系 I 特有成分の極大波長は 730 - 740 nm と得られた (図 右パネル)。先のトウモロコシに関する論文では連続発振レーザー波長は 800-820nm であったのに対し、今回は連続発振レーザーとして 785nm を用いたが、系 I 特有成分の極大波長が変わらなかった点も、この信号がラマン散乱などではなく、蛍光スペクトルであることを支持するものであった。

さらに、藻類の細胞を有機溶媒に接触させると

740nm 近辺で吸収を示すクロロフィル会合体が形成することが知られてきた。これは系 I に少数含まれる長波長吸収クロロフィルの人工的なモデルともみなせる。アンチストークス蛍光スペクトルで系 I 蛍光が強く得られる原因が系 I の長波長吸収クロロフィルであるならば、そのような人工的長波長吸収クロロフィルが形成していく過程はアンチストークス蛍光スペクトルで追跡し易いはずである。実際に、我々はアセトンに 15% 含んだ培養液にクロレラ細胞を浸すことにより 10 時間以上にわたって変化していくクロレラの蛍光スペクトルを細胞毎に調べ、アンチストークス蛍光によってクロロフィル会合体の形成が容易に観測できることを確認した。また蛍光スペクトルと共に同一細胞を顕微吸収スペクトルによっても調べ、整合的な結果を得た。これは細胞が壊れていく過程を見ることにほかならず、生理的意味は弱いですが、有機溶媒が藻類細胞に働く様子を蛍光スペクトル顕微鏡で詳しく追跡した初の観測例として、生体を扱う物理化学としての価値は十分あるだろう。長波長クロロフィル会合体は一般に単量体的クロロフィルに比べ、蛍光量子収率が低く蛍光スペクトルを得難い。しかしアンチストークス蛍光を用いるとこれが容易になる。この現象にはいくつかの応用も考えられる。例えば、色素増感太陽電池などで低エネルギーシフトして、励起状態を消失させるトラップ準位の存在をアンチストークス蛍光で鮮明に見ることができるのではないかと推察もされる。



業績紹介：時間分解紫外共鳴ラマン分光法で見る光センサーSRIIの構造変化

水野操 (阪大院理・計画研究分担者)
須藤雄気 (名大院理・公募研究代表者)
水谷泰久 (阪大院理・計画研究代表者)

論文題目: "Direct Observation of the Structural Change of Tyr174 in the Primary Reaction of Sensory Rhodopsin II."

著者: Misao Mizuno*, Yuki Sudo*, Michio Homma, and Yasuhisa Mizutani (*These authors equally contributed to this work)

雑誌巻号: *Biochemistry* **50**, 3170-3180 (2011)

生物は、有害な紫外線を避けるためのタンパク質分子を保持している。ある種の微生物は紫外線センサータンパク質、センサーロドプシン II (SRII) を持ち、運動器官であるべん毛モーターの回転方向を制御することで、紫外線から遠ざかる「負の走光性」が実現する。このように、光により情報伝達のオン・オフを制御できる特性から、～10種類程度のタンパク質分子が関わる“超高次系”情報伝達機構の解析に“分子科学的測定”が適用出来る希有な例として盛んに研究されている。これまでの解析から、SRIIの機能発現には2つのアミノ酸残基、Thr204及びTyr174の構造変化が重要であることがわかっており、両アミノ酸は変異体にするると機能を失う[1]。前者(Thr204)は、低温赤外分光法により、K中間体時の水素結合変化[2]及び発色団レチナールとの立体障害[3]が起こることがわかっている。また、本来光駆動のプロトンポンプタンパク質であるバクテリオロドプシン(BR)に、このThrを導入するとSRII様の光センサーとして機能すること[4]、導入したThr残基の構造変化がSRIIと類似したもの、すなわち水素結合変化とレチナールとの立体障害が起こること[5]からも、その重要性が明らかとなった。このように、Thr204の役割は分子レベルで明らかになりつつあるが、Tyr174については直接的な構造変化が捉えられた例は無く、Spudich 研のポストドクであった須藤の“宿題”として残された。

本研究では、大阪大学の水野・水谷両氏の助力により、TyrやTrpなどの芳香環の構造変化を直接的に捉えることの出来る時間分解紫外共鳴ラマン分光法を用い、Tyr174の構造変化を直接的に捉えることを目的とした。238nmでプローブしたTyr残基の結果を、野生型とY174F変異体で比較したところ、Y8aバンドに含

まれるTyr174が、ピコ秒領域のJ中間体で構造もしくは環境変化を起こすこと(図1)、その変化は10ピコ秒以内に緩和することがわかった。また、225nmをプローブとしたTrp残基の結果を、レチナール近傍の構造及びBRでの結果[6]と比較し、Trp76やTrp171の構造変化がJ及びK中間体で誘起されること、BRとは異なる構造変化が起こることがわかった。

今後は実際に機能が発現する、MやNなどの後期中間体や伝達タンパク質HtrIIとの複合体での解析、さらには本領域の成果として見いだした誘因応答センサー・センサーロドプシンI(SRI)[7]の解析を通じて、センサー型ロドプシンを介した光情報伝達の機能と構造変化の関連性を分子科学的に明らかにしていきたいと考えている。

* 以下須藤の感想(この領域ならではの成果を出すことができ、Spudich教授からも“Good job”とのコメントを頂きホットしている)

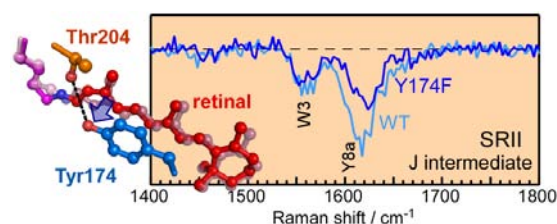


図1. 野生型SRIIとY174F変異体の時間分解ラマンスペクトルの比較。ともにY8aバンド強度の低下が見られるものの、変異体では低下量が小さく、スペクトル変化にはTyr174の寄与が大きいことがわかる。

引用文献

- [1] Y. Sudo, et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 34239-34245 (2006).
- [2] Y. Sudo, et al., *Biochemistry* **42**, 14166-14172 (2003).
- [3] Y. Sudo, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16036-16037 (2005).
- [4] Y. Sudo, and J. L. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 16129-16134 (2006).
- [5] Y. Sudo, et al., *J. Biol. Chem.* **282**, 15550-15558 (2007).
- [6] M. Mizuno, et al., *J. Phys. Chem. B* **113**, 12121-12128 (2009).
- [7] T. Kitajima-Ihara, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 23533-23541 (2008).

業績紹介：センサリーロドプシン I の新たな中間体の存在と 塩化物イオン依存的なエンタルピー変化の発見

井上圭一 (名工大院工・A03 公募研究代表者)
須藤雄気 (名大院理・A03 公募研究代表者)
神取秀樹 (名工大院工・班友)

論文題目：“Spectrally Silent Intermediates during the Photochemical Reactions of *Salinibacter* Sensory Rhodopsin I”

著者：Keiichi Inoue, Yuki Sudo, Michio Homma, and Hideki Kandori

雑誌巻号：J. Phys. Chem. B **115**, 4500-4508 (2011)

センサリーロドプシン I はセンサータイプの微生物型ロドプシンであり、緑/赤色光に向かって細胞が遊泳する正の走光性と、逆に紫外光に対して細胞が忌避応答を示す負の走光性のセンサーとして働いている。真正細菌 *Salinibacter ruber* の持つセンサリーロドプシン I (SrSRI) は A03 班須藤グループによって 2008 年に初めて単離・精製されたタンパク質であり、既知のセンサリーロドプシン I と比べ、界面活性剤中や塩の無い環境下においても高い安定性を示す事が明らかにされた[1]。これは SrSRI を用いることで様々な生理学・分光実験が可能になることを意味しており、例えば、センサリーロドプシン I の分子内部に塩化物イオン結合サイトが存在することが明らかになっている。

一方で、SrSRI の光反応ダイナミクスについてはフラッシュフォトリシス法による吸収変化が測定されたのみであり、いまだ不明な点が多い。本研究では SrSRI の光反応過程にどのようなマクロな構造変化が存在するのかを調べるため過渡回折格子法 (TG 法) を適用し、さらに塩化物イオンの有無によるダイナミクスの違いを研究した。

図 1 が今回測定された SrSRI の TG 信号である。TG 法では 2 本の励起パルスを試料上で交差することで、光の干渉縞を生成し、光強度の強いところで試料を励起する。そして光反応が起こった部分では溶液の屈折率が変化し、過渡的な回折格子として働くため、そこへ別のプローブ光を導入すると回折光が生じ、その強度変化から屈折率変化の値を決めることができる。さらには、分子拡散定数やエンタルピー変化、部分モル体積変化なども決定することができる。今回 TG 信号から可溶化された SrSRI の分子サイズを見積もったと

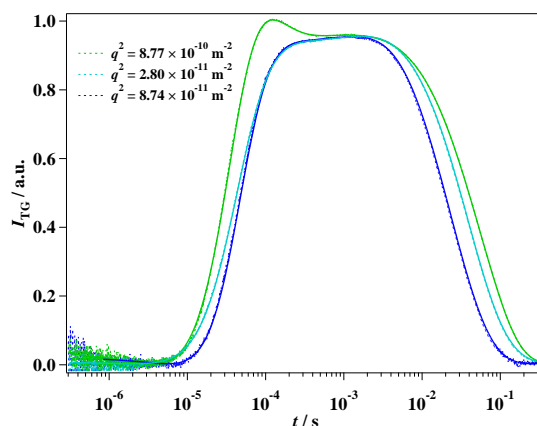


図 1. SrSRI の過渡回折格子信号

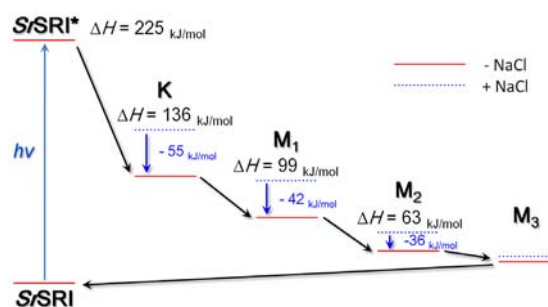


図 2. TG 法で決定された SrSRI のエンタルピー変化

ころ、約 100 分子が会合した状態にあることが分かった。これは可溶化状態のロドプシンは単量体を形成するという一般的な予想と大きく異なるものである。またさらに信号を詳細に解析したところ、始状態より吸収がブルーシフトした M 中間体には分子体積が異なる 3 つのサブ状態がある事が明らかになり、吸収変化だけではわからないマクロな構造変化過程の検出にも成功した。また TG 法は各中間体にエンタルピー変化の値を決めることができるが、SrSRI の場合、図 2 のようなエネルギー図となり、それぞれの中間体のエネルギーは塩化物イオンの脱離により大きく減少することが示された。これは SrSRI の反応速度の決定に塩化物イオンが大きな役割を持つことを示唆している。

今後はさらに赤外分光法を用いて、アミノ酸残基レベルで塩化物イオンの結合サイトの構造を調べ、より詳細な SrSRI の分子メカニズムの解明に向けて研究を行っていく予定である。

引用文献

[1] T. Kitajima-Ihara, Y. Furutani, D. Suzuki, K. Ihara, H. Kandori, M. Homma, and Y. Sudo, *J. Biol. Chem.* **283**, 23533-23541 (2008).

業績紹介：青色光センサー蛋白質の活性化に関わるチロシンの異常に強い水素結合

神取秀樹（名工大院工・班友）

論文題目："Strong Donation of the Hydrogen Bond of Tyrosine during Photoactivation of the BLUF Domain"

著者：Tatsuya Iwata, Akihide Watanabe, Mineo Iseki, Masakatsu Watanabe and Hideki Kandori

雑誌巻号：J. Phys. Chem. Letters 2, 1015-1019 (2011)

15 年前、私は講演などで「生物の光センサー機能は必ず異性化反応で開始される」と断言していた。ロドプシンはもとよりフィトクロムも PYP もすべて光異性化によって誘起された構造歪みが蛋白質の構造変化を引き起こし、それが伝達蛋白質との相互作用をもたらしていたからである。それゆえ、異性化が起こらない『フラビンを発色団とする青色光センサー蛋白質』の登場は私にとって許し難いことであり、それがフラビン蛋白質の研究を開始した直接的な動機となった。

LOV ドメインの場合、システインとフラビンとの共有結合形成が初期反応であり、我々はシステインのプロトン化状態を解明するとともに^[1]、共有結合形成によって誘起された構造歪みが蛋白質の構造変化をもたらすことを明らかにした^[2]。我々は最近、植物の光センサーとして機能するとともに DNA 修復酵素もファミリーに含む PHR ドメインの研究を開始したが、この場合の活性化反応は光誘起電子移動であり、同様に蛋白質の構造歪みが誘起されることを見出している^[3]。

これらと比較して、第三のフラビン蛋白質である BLUF ドメインの場合、発見から 10 年近くが経過したにも関わらずよくわかっていないことが多い。光を吸収すると 10 nm の長波長シフトが起こるが、不思議なことにフラビンの化学構造には変化がないのだ。超高速分光によりプロトン移動と共役した電子移動が起こることがわかったが、長波長中間体の生成までには電子もプロトンも元に戻ってしまう。一体、BLUF ドメインの光スイッチとは何だろうか？ 結晶構造と機能解析からフラビン近傍のグルタミンとチロシンが重要であることがわかったが、現在の分解能では水素原子が見えないばかりか、グルタミンの酸素と窒素の位置も確定しておらず、光反応前後でそれぞれ図のような構造が可能であった。

このような混沌とした状況のもと、すでに赤外分光解析も報告されていたが、我々は十八番（おはこ）である X-H 伸縮の解析が役に立つと信じて BLUF ドメインの研究を始めた。その結果、2800-2600 cm^{-1} の振動数領域に幅広い正の信号を観測し、長波長中間体においてこの領域に特異な振動が現れることがわかった。光合成反応中心では His の N-H 伸縮がこの振動数領域に現れることから、我々は最初 His を考えていたが、振動バンドは ¹⁵N 標識で全くシフトしなかった。一方、チロシンの標識試料が同位体効果を示したことから、幅広い正の信号はチロシンの O-H 伸縮が低波数モードとフェルミ共鳴を起こした結果と解釈した。さらに我々は、変異体を用いてこの信号がフラビン近傍のチロシンに由来することを明らかにした。

チロシンの O-H 伸縮は水素結合を形成しないと 3600 cm^{-1} 付近に現れる一方、分子内水素結合を形成すると 3200 cm^{-1} 付近にシフトする。これまでに報告がないほど低波数シフトした O-H 伸縮から、長波長中間体においてチロシンが「異常に」強い水素結合を形成することがわかった。今後、X-H 伸縮振動領域を徹底的に解析することで、BLUF ドメインの活性化における水素結合構造の変化を解明したいと考えている。

本研究は新学術領域「 π 空間」のサポートを受けて行った研究成果であるが、本内容は A01 班のメンバーにも A03 班のメンバーにも興味をもっていただけると考え、班友として紹介させていただきました。

- [1] T. Iwata et al. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11840 (2002); Y. Sato et al. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1088 (2005).
[2] T. Iwata et al. *Biochemistry* **44**, 7427 (2005); T. Koyama et al. *Biochemistry* **48**, 7621 (2009).
[3] T. Iwata et al. *Biochemistry* **49**, 8882 (2010); Y. Zhang et al. *Biochemistry* **50**, in press (2011).

