

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14175

研究課題名（和文）全内部反射過渡回折格子装置の構築と脂質二重膜中のロドプシンのイオン輸送過程の観測

研究課題名（英文）Development of total internal reflection transient grating system to monitor ion pump dynamics of rhodopsin in a lipid bilayer

研究代表者

近藤 正人（Kondoh, Masato）

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：20611221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：全内部反射プローブ方式の過渡回折格子（TG）法の適用により、脂質二重膜中でのロドプシンの構造変化やイオン輸送過程を時間分解検出することを目標に、装置構築のレベルから研究した。まず、全内部反射TG装置を立ち上げ、その試料部を改善した。次に、より単純な膜中の系として、石英プリズムと水溶液界面のリン脂質DMPC支持膜中のスチルベンを対象に全内部反射TG測定を行い、その分子拡散を調べた。その結果、膜中のスチルベンが二つの異なる拡散係数を示すことを見出した。この事実は、DMPC膜中に低粘性および高粘性の二つの環境があることを示している。膜の不均一構造を実験的に支持する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜は、光合成や物質輸送などの生化学過程の場である。膜の構造や膜中での分子の動きを観測し、明らかにすることは、現代の分子科学の重要な課題の一つである。本研究では、固体と溶液の界面に保持した脂質二重膜の系に、界面敏感な過渡回折格子法を適用するという着想に基づき、膜中での分子拡散測定を行った。この測定を通して、膜の不均一構造を実験的に支持する意義深い結果を得た。また、膜タンパク質の構造や動きを生理環境に近い膜中で観測するための方法論の基礎を構築できた。このことが、学術的に意義深い。

研究成果の概要（英文）：A method based on the transient grating (TG) technique with total internal reflection geometry for probe light (TIR-TG) has been developed to detect conformational and ion transportation dynamics of rhodopsin proteins in a lipid bilayer membrane. In this study, we constructed a TIR-TG apparatus and applied it to diffusion coefficient measurements of stilbene in a dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) lipid bilayer membrane at a silica/water interface. As a result, we found that the stilbene molecules in the DMPC bilayer membrane show two different diffusion coefficients. This result indicates that the DMPC membrane is an inhomogeneous environment that can be described with two different effective viscosities.

研究分野：分子分光学

キーワード：過渡回折格子法 分子拡散 脂質二重膜 固液界面

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体分子が刺激を受けてから実際に機能するまでの過程を分子レベルで解明することは、現代の分子科学の重要な目標である。このためには、タンパク質が刺激を受けた後に示す構造変化や標的分子との分子間反応を捉える必要がある。しかし、タンパク質の様な巨大分子において、刺激を受けた部位から離れた部分で起きる構造変化や分子間反応を時間分解検出することは、光吸収や発光法等の従来の分光法では困難な場合が多い。こうした“Spectral silent”な過程を観る有力な方法として、過渡回折格子 (TG) 法を用いた検出法が提案されている。TG 法では、光励起により試料溶液に空間的な濃度変調を作り、これに誘起された屈折率の変調をプローブ光の回折により検出する。回折光 (TG 信号) の強度は試料に誘起された屈折率変化 (吸収変化 + 体積変化) の二乗に比例する。TG 信号は濃度変調が分子拡散により緩和することで消失するため、その時間変化から拡散係数の高感度検出も可能である。分子体積や拡散係数の変化を通して、タンパク質が示す“Spectral silent”な過程を検出できることが TG 法の最大の利点であり、この利点を生かした研究が多くなされてきた。

TG 法は有力であるが、問題点も残されている。大きな問題点は、膜のような透明でない試料の測定に適用することがほぼ不可能なことである。試料溶液が不透明だと、試料からの散乱光と TG 光の干渉が問題となり、信頼できる測定ができない。これは、ロドプシンや光合成中心などの膜タンパク質を測るときに問題となる。膜タンパク質が実際に働く環境は生体膜中である。そのため、膜タンパク質の研究は、脂質二重膜に再構成した試料を準備することで生理条件に近い環境を再現し、その懸濁液を対象に行われることが多い。だが、TG 法では試料からの散乱光が問題となるため、懸濁液中での測定は非常に難しい。もし、TG 法を膜の系に適用できれば、その利点を生かして、膜タンパク質における“Spectral silent”な過程を、生理環境に近い膜中で研究できると期待される。だが、上述の問題点から、TG 法を膜の系に適用する試みはこれまでにほとんど行われてこなかった。

### 2. 研究の目的

膜タンパク質の構造変化や分子間反応を生理条件に近い環境で観測するための新しい実験方法を構築すること、および、構築した方法を脂質二重膜中のロドプシンの系に適用し、その構造変化やイオン輸送過程の時間分解検出を実現することを目的とした。これらの実現のため、本研究では、固液界面に脂質二重膜を保持した試料 (支持膜) を準備し、ここにプローブ光全内部反射 (TIR) 配置を採用した界面敏感な TG 法を適用することを着想し、装置構築のレベルから取り組んだ。着想のポイントは、支持膜の利用により試料を界面近傍に局在させ、TIR 配置で界面近傍だけを観ることである。これにより、信号強度を保ちつつも、従来の透過配置での TG 測定で問題であった水溶液相からの散乱光を大きく減らすことを実現する。

### 3. 研究の方法

#### (1) TIR-TG 装置の立ち上げ

シリカ製の台形プリズムとテフロン製の液溜め部からなるプリズムセルを設計・制作し、これを現有の TG 装置の試料部に導入することで、プローブ光 TIR 配置での TG 信号の測定も可能な TIR-TG 装置へと拡張した。装置の概要を図 1 に示す。二本の励起パルスレーザー光 (266 nm, 10 ns) を台形プリズムの上底面から入射させ、下底面 (試料溶液と接する面) で交差させた。これにより、過渡回折格子 (TG) を試料に生じさせた。プローブ連続レーザー光 (828.5 nm) は二つに分け、一つはプリズムの上底面から試料に入射させた。この際、試料溶液の透過側に生じた回折光をプローブ光透過配置の TG 信号として検出した。もう一つは、プリズムの斜面から全内部反射条件を満たす角度で試料に入射させ、この際生じた回折光をプローブ光 TIR 配置の TG 信号として検出した。装置の光軸調整は、液晶分子、N-(4-メトキシベンジリデン)-4-ブチルアニリン (MBBA) の TG 信号をガイドに行った。

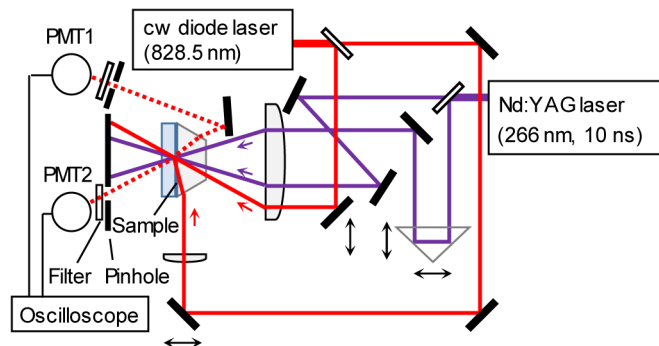


図 1 本研究で構築した TIR-TG 装置の概要

## (2) リン脂質支持膜中の分子拡散測定

本着想の実証実験として、膜中のロドプシンの系よりも単純な膜の系を対象に TG 測定を行った。対象としたのは、シリカプリズムと水溶液界面に、*trans*-スチルベンを導入したリン脂質 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC: 図 2) を保持させた支持膜である。試料は、次のようにベシクルフュージョン法で準備した。まず、DMPC と *trans*-スチルベンを

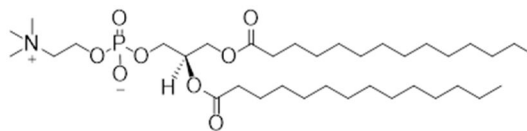


図 2 リン脂質 DMPC の構造

モル比 1:1 でクロロホルムに溶かした後、この溶液を真空デシケータ中で一晩乾燥させ、脂質フィルムを得た。ここに純水を加え、超音波洗浄処理を 2 時間行った。得られた懸濁液をプリズムセルの液溜めに注ぎ、32°C で 15 分間静置した。以上の操作で、シリカプリズムと水の界面に目的の支持膜を得た。静置の操作は、装置の光軸調整を行った後、セルを装置に設置した状態で行った。調整後にプリズムを装置から取り外さないことで、光路を崩さずに試料を設置した。

## 4. 研究成果

### (1) TIR-TG 装置の構築と試料部の改善

研究方法の項目で述べたように、現有の TG 装置を TIR-TG 装置へと拡張した。実用に耐えうる装置構築のために最も重要だったことは、専用のプリズムセルの設計であった。セルに取り入れた最大の工夫は、一つのプリズムセルに光軸調整専用の参照試料部と測定試料部の二つの試料部を分割して持たせたことである。課題開始後、TIR-TG 装置の光軸調整が当初想定していた以上に厳格であり、信号検出のためには光軸調整専用の試料 (MBBA) を用いて調整することが不可欠であることが分かった。はじめに試作したプリズムセルには、試料部を一つしか持たせていなかった。そのため、立ち上げた直後の装置で試料の測定を行う際には、光軸調整専用の試料で調整した後、セルを装置から取り外し、測定したい試料に交換した後に再びセルを設置して調整する必要があった。このように、実際に試料の測定を開始するまでに長い時間を要する問題があった。分割型のセルを導入したことで、このセルの光軸調整用の部分で TIR-TG 信号を検出した後、試料用の部分に並進ステージで切り替えることが可能となった。これにより、試料の測定開始までに要する時間を大幅に短縮することができ、実用に耐えうる装置を構築できた。また、この取り組みの中で、対象とする膜試料を準備する際にも、装置からセルを取り外さずに行えるよう工夫が必要なることが分かった。この問題は、ベシクルフュージョン法を採用し、セルを装置に取り付けたままで固液界面の支持膜試料を準備することで解決した。

### (2) リン脂質 DMPC 二重膜中の分子拡散測定

構築した TIR-TG 装置を、シリカプリズムと水溶液界面の基板支持二重膜中のスチルベンの系の分子拡散測定に適用した。DMPC の支持膜中のスチルベンを光励起後に観測された TIR-TG 信号を図 3 に示す。同じ試料を透過配置で測定する試みも行ったが、溶液相に残存した膜試料からの散乱光が大きな背景信号として現れ、かつ、その強度の時間変化が激しかったため、上手く測定できなかった。TIR 配置の適用により、この背景信号を抑えたことが、この試料の信号を得るための鍵だったのだと考えている。

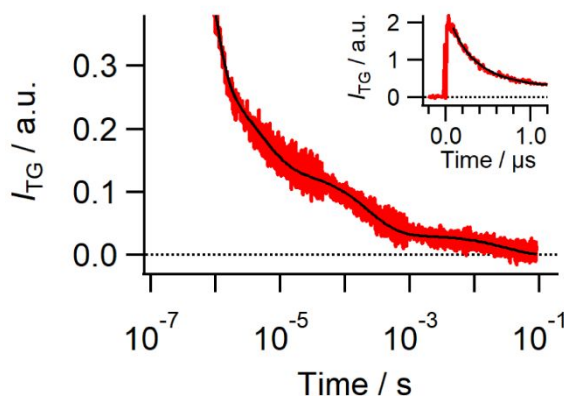


図 3 DMPC 支持膜中の *trans*-stilbene を光励起後に観られた TIR-TG 信号

観測された TIR-TG 信号は、光励起直後に立ち上がり、1 マイクロ秒以内の短い時間で減衰した後、マイクロから 10 ミリ秒の時間領域になだらかな減衰信号を示した。TG 信号には、溶媒の温度上昇による屈折率変化 (熱グレーティング) 成分と試料の光反応により生じた屈折率変化

(化学種グレーティング)成分が寄与する。信号の初めに観られた短い減衰成分を、熱グレーティング成分が試料からプリズムへの熱散逸により消失する過程に帰属した。その他の減衰成分を化学種グレーティング成分に帰属した。

化学種グレーティング成分の時間変化には、試料の反応過程を示した成分と拡散を反映した成分が含まれる。その帰属のため、様々な格子波数 ( $q$ ) で TG 測定を行った。どの  $q$  でも、その時間変化は三成分の指数関数で再現されることが分かった。これらの成分のうち、長い時間で減衰した二つの成分に対応する減衰速度  $k_{fast}$  と  $k_{slow}$  は  $q^2$  に比例していた (図 4)。このことは、これらの成分がスチルベンの拡散を反映した成分であることを示している。この  $q^2$  依存性から、DMPC 二重膜中のスチルベンの拡散係数として、二つの異なる値、 $D_{fast}=5.7(\pm 1.0)\times 10^{-10}$  および  $D_{slow}=2.7(\pm 0.5)\times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  を得た。二つの拡散係数が得られた事実は、DMPC 二重膜中に低粘性および高粘性の二つの環境があることを示唆している。このように、TIR-TG 法の適用により、透過配置の TG 法では難しかった膜中での分子拡散測定を実現した。この研究成果は、Bulletin of the Chemical Society of Japan に、BCSJ Award Article として掲載された。

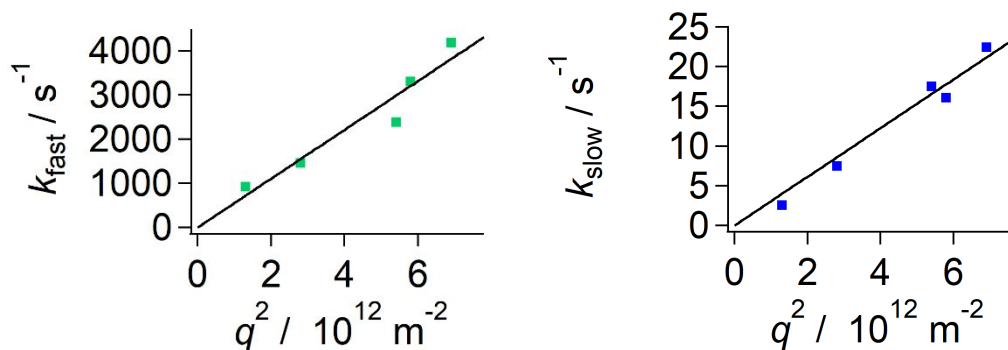


図 4 TIR-TG 信号の減衰速度の  $q^2$  依存性

### (3) ロドプシン測定に向けた取り組み

以上と並行して、ロドプシンの系に適用する試みも進めた。だが、今回構築した装置調整の手順が、この系には適用できないという問題点が見つかった。成果の項目(1)で述べたように、TIR-TG 測定の際には、光軸調整専用の液晶分子試料で調整後、測定したい試料に交換している。問題は、この液晶分子が可視領域に吸収を持たないことである。ロドプシンの TG 測定には、その発色団レチナルが吸収を示す可視領域の励起光を用いる必要がある。だが、可視領域の励起光では光軸調整用の液晶分子試料を励起できない。そのため、ロドプシン測定の実験条件で光軸調整する方法を新たに構築する必要性が生じた。現時点ではその構築に至っていない。この問題については、可視領域に吸収を持つ分子を液晶分子に混合した試料を用いることで解決できる可能性を見出しつつある。今後、この可能性を精査してロドプシンの TG 測定の実現を目指したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masato Kondoh, Hidekazu Moritani, Taka-aki Ishibashi	4. 巻 93
2. 論文標題 Observation of translational diffusion in a planer supported lipid bilayer membrane by total internal reflection-transient grating method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 671-675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masato Kondoh, Chinatsu Takizawa, Kazuki Okazawa, Dai Akase, Misako Aida, Taka-aki Ishibashi	4. 巻 389
2. 論文標題 Time-resolved infrared study of photo-induced ring-closure reaction of trans-2-hydroxychalcone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 112280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotochem.2019.112280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masato Kondoh, Akira Sakuta, Kazuki Okazawa, Dai Akase, Misako Aida, Taka-aki Ishibashi	4. 巻 123
2. 論文標題 Photo-induced ring-opening reaction of flav-3-en-2-ol monitored by time-resolved infrared spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 8499-8504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b07108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近藤正人, 本多駿斗, 東ヶ崎慶, 西村賢宣, 新井達郎, 石橋孝章
2. 発表標題 芳香族ウレア - 酢酸イオン会合体の光誘起プロトン移動の時間分解赤外分光と多変量解析
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森谷英和, 近藤正人, 石橋孝章
2. 発表標題 全内部反射過渡回折格子法による脂質二重膜中の分子拡散係数の測定
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島晃希, 近藤正人, 新井達郎, 石橋孝章
2. 発表標題 水上脂質単分子膜中におけるSHGプローブ色素AP3のHD-VSFG測定
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森谷英和, 近藤正人, 石橋孝章
2. 発表標題 固液界面における分子拡散や化学反応を測定するための全内部反射過渡回折格子装置の製作
3. 学会等名 2018年度 日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森谷英和, 近藤正人, 石橋孝章
2. 発表標題 全内部反射過渡回折格子法による固液界面近傍の分子拡散係数や反応速度定数の測定
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidekazu Moritani, Masato Kondoh, Taka-aki Ishibashi
2. 発表標題 Measurement of molecular diffusion coefficient and reaction rate constant at solid-liquid interface by total internal reflection-transient grating
3. 学会等名 MANA International Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤正人, 作田光, 岡澤一樹, 赤瀬大, 相田美砂子, 石橋孝章
2. 発表標題 時間分解赤外分光で観るヒドロキシカルコンとフラベノールのフォトクロミック反応
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本多駿斗, 近藤正人, 東ヶ崎慶, 西村賢宣, 新井達郎, 石橋孝章
2. 発表標題 時間分解赤外分光で観る芳香族ウレア-アセテートアニオン会合体の光誘起プロトン移動
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考