

令和元年6月14日現在

機関番号：33702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14684

研究課題名(和文)ミリ波帯パッシブサーモグラフィを応用したタンパク質構造変化エントロピー測定

研究課題名(英文) Measurement of the entropy of protein structural changes using the millimeter-wave passive thermography

研究代表者

岸上 明生 (Kishigami, Akio)

岐阜女子大学・家政学部・教授

研究者番号：40261177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低温で非侵襲的に熱エネルギー吸収量を測定できるミリ波帯パッシブ顕微鏡システムを使って、200K付近においてBSA溶液の測定を試みた。測定結果は、ある熱吸収状態から別の熱吸収状態への遷移を示唆した。高い効率性、特異性、正確さを備えるタンパク質の機能を明らかにすることは、熱的に変動して揺らいでいるタンパク質構造内の規則的なダイナミクスを明らかにすることである。タンパク質ダイナミクスの熱力学パラメーターは、タンパク質の熱量測定によって得られる。研究結果は、タンパク質構造の主要な遷移に伴う熱エネルギー吸収の変化を観察できたと考えられるので、タンパク質熱量測定の新しい方法になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的な意義は、黒体輻射現象のプランク則を原理とするミリ波放射を応用した装置と低温トラップ法を組み合わせた新規な考案に基づいて、凍ったタンパク質水溶液からタンパク質熱放射だけの検出を実施したことである。また、タンパク質機能の解析に必要なタンパク質熱量測定をおこなう場合、熱変化を直接測定するDSCやITCは、熱伝導と熱平衡状態が必要なために測定に時間を要する。一方、van 't Hoff則を利用する分光測定法は、近似的値しか得られない。しかし、非侵襲的で2元画像化が可能なミリ波パッシブ顕微鏡システムは、既存の問題を越えて、多検体を同時に短時間で測定する装置への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We attempted to measure BSA solution at around 200 K using a passive millimeter-wave microscope system that can measure thermal energy absorption non-invasively at low temperatures. The measurement results suggested a transition from one heat absorption state to another. To reveal the function of a protein with high efficiency, specificity and accuracy is to reveal the dynamics within the thermally fluctuating protein structure. Thermodynamic parameters of protein dynamics are obtained by protein calorimetry. The research results are expected to be a new method of protein calorimetry since it is considered that the change of thermal energy absorption accompanying the major transition of protein structure could be observed.

研究分野：動物生理学

キーワード：thermodynamics protein millimeter-wave

1. 研究開始当初の背景

生物が生きていく上で、エネルギーを必要とする。生物のエネルギー消費は、生体高分子の構造変化に相当すると考えられる。生体高分子の中でも、タンパク質は、細胞の生理機能に直接関係する分子であり、その構造変化は、重要である。近年、タンパク質の立体構造が明らかにされるようになり、機能と具体的な構造に基づいた機能の考察が行われるようになってきている。タンパク質の機能を明らかにする上で、立体構造のダイナミクスも解明する必要がある。タンパク質の柔軟な構造は、ミリ秒からピコ秒までの幅広い時間スケールの中で、熱的に変動した動き（ゆらぎ）を示す。タンパク質働きは、高い効率と特異性と正確さを備えている。したがって、タンパク質の構造ダイナミクスは、単にランダムな動きの集まりではなくて、規則的な構造変化の集まりであると予想される。多くの生物物理学的実験やコンピュータ・シミュレーションによる研究は、タンパク質の機能と規則的な構造変化を関連付ける結果を報告している。ゆらぎのダイナミクスを考える上で、エンタルピーやエントロピーを含む自由エネルギーによって表現される熱力学に関する情報（熱力学パラメーター）が必要になる。タンパク質ダイナミクスの熱力学パラメーターは、タンパク質の熱量測定によって明らかにできる。熱量測定技術の中で、熱変化を直接測定する示差走査熱量測定法（DSC）と等温滴定熱量測定法（ITC）が主要な2つの方法である。どちらの装置でも、温度測定時に、測定対象の物体と接触する必要があり、測定に熱伝導および熱平衡状態を達成するまでの時間を必要とする。NMR装置などの分光測定方法では、van't Hoffの関係式からエンタルピーと熱容量の変化を推定できる。この場合、反応エンタルピーは一定であるという仮定の下で、van't Hoff 方程式は2つの温度の間で積分する。しかし、ほとんどの場合、反応エンタルピーは変化するため、得られる値は、近似値となる。これらの問題点を抱えているにもかかわらず、熱量測定で得られた熱力学パラメーターは、タンパク質ダイナミクスの理解に寄与している。したがって、すでに成熟した技術である熱量測定方法の問題点をさらに改良することは、生命機能の解明を進める上で重要な技術開発である。

シュテファン=ボルツマンの法則およびプランクの法則は、物体の温度と放出エネルギーとの関係をプランク輻射として明らかにしている。物体から熱放射される電磁波のエネルギーを検出する放射熱画像は、プランクの法則に基づいて物体の放射率に因って物体温度を推測させる。一般の温度計による温度測定では、熱伝導によって測定対象と温度計とが同じ温度になる必要があるのと違い、非接触で短時間に温度測定が可能となる。

赤外線領域の熱放射を検出する熱画像装置が、一般的である。図1は、プランクの法則から計算した黒体温度の関数を示す。図1に示すように、波長 $10\ \mu\text{m}$ の赤外線のパワーは、300K 以下で劇的に減少する。この減少のために、赤外線パッシブ放射サーモグラフィーでは、約 230K 以下の低温領域の測定ができない。一方、図1に示すように、ミリ波（波長 6 mm）の熱放射の強度は、数Kまでの温度に比例する。したがって、ミリ波放射を利用する熱画像装置は、室温を下回る温度領域において赤外線熱画像装置より優れた性能を発揮する。ところが、従来の光学系を用いた熱放射イメージング・システムによってミリ波放射を利用した熱画像を作成する場合は、回折効果により動作周波数の波長によって装置の空間分解能が決まってしまう。このため、赤外線サーモグラフィーよりも広い測定範囲を必要とする。つまり、十分な広さの範囲を確保するのに十分な量の試料が準備されなければならない。しかし、新規に開発した細いスリットを持つ測定プローブによって近接場光を検出し、回折限界以下のサブ波長空間分解能を有するミリ波領域におけるパッシブ・イメージングの測定は、比較的少量の試料準備で測定を可能にする。荻戸の開発したパッシブ・ミリ波顕微鏡は、室温から 160K までの温度範囲で熱イメージングを可能にする。また、ミリ波帯電磁波の特徴として、水は、固体の状態でもミリ波領域をほとんど放射しないので、パッシブ・ミリ波顕微鏡システムで氷中の物体を測定するとき、物体からの熱放射のみが検出される。

タンパク質の酵素作用やシグナル伝達のような生理機能をもたらす多くの立体構造変化は、生理的温度でマイクロ秒からミリ秒の遅い時間スケールである。タンパク質中の大規模なアミノ酸群の集団運動の中で、遅いタイムスケールの揺らぎ運動がタンパク質機能において重要である。タンパク質ゆらぎのすべての運動は熱エネルギーによって活性化されるため、十分に低い温度（一般的な集団運動のほとんどで 200K 未満）では、熱エネルギー不足で個々の運動が停止し、タンパク質の機能を妨げる。パッシブ・ミリ波顕微鏡システムは、凍結したタンパク質溶液中のタンパク質の熱放射変化の様子を観察できると期待される。

2. 研究の目的

細胞内情報伝達系では、Gタンパク質やリン酸化反応で ATP や GTP が消費されるが、なぜ、情報伝達にエネルギーを必要とするのかは明

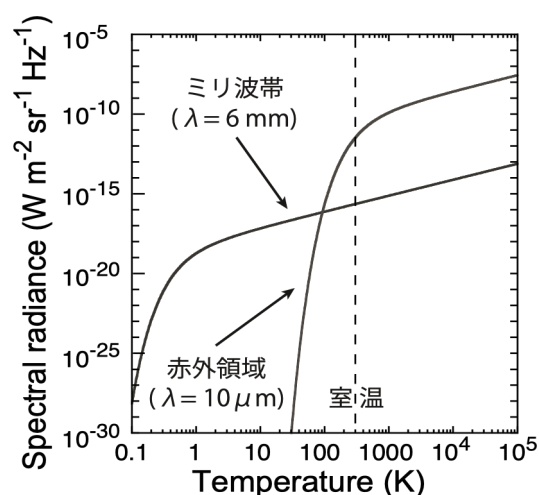


図1 プランク法則による温度と熱放射輝

らかではない。情報伝達系における GTP や ATP の分解エネルギーは、分子間相互作用の変化になるタンパク質構造変化で利用されると推測される。タンパク質の構造変化に伴うエネルギーの変化量は、ゆらぎのエントロピー変化量に相当するため、タンパク質分子内の部分構造変化に伴って熱容量も変化する。例えば、G タンパク質の構造変化に伴った熱吸収量の測定を実施し、熱容量の変化を分析できれば、GTP 加水分解エネルギーがどのように利用できるのかを明らかにできる。このような解析は、細胞内情報伝達系のネットワーク全体でどの程度のエネルギーが必要になるかを考える基盤となる。本研究では、非侵襲性で凍った試料の熱放射情報を高精度に測定する特徴を持つミリ波帯パッシブサーモグラフィと低温トラップ法を組み合わせた実験系を構築し、タンパク質の構造変化に伴うエントロピー変化を定量できる新しい測定方法の確立を目指す。物体の熱放射率と吸収率は等しいので、測定結果から熱吸収量変化を分析することができる。新規の測定方法は、タンパク質のいくつかの緩和過程に応じた構造エントロピーのエネルギー量を決定する新しい研究領域の創出につながると期待される。

3. 研究の方法

水中のタンパク質サンプルから放出される熱放射における熱力学的側面を観察するために、50 GHz (6 mm 波長) で動作するパッシブ・ミリ波顕微鏡システムを使用した。図 2 は、実験装置の概略図である。この研究のために新たに開発されたテーパースリット・プローブを使用する近接場センサーとして使用した。スリットの開口部は、4.8 mm × 150 μm である。プローブ

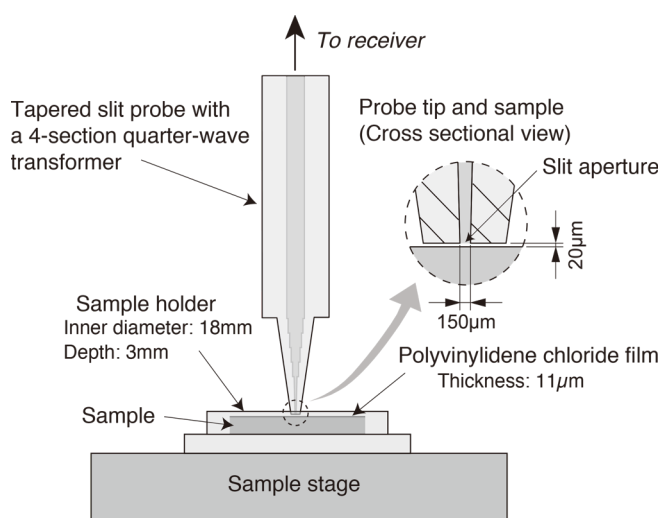


図 2 測定プローブと試料の配置の概略図

の先端をサンプルのすぐ近くに置いた。アルミニウム試料ホルダーを純水または試料溶液 (BSA 溶液) で満たし、銅製試料ステージ上に配置した。この試料ステージに対して、冷却剤として液体窒素を用いた後、オン/オフまたは比例積分微分モード温度制御装置付きの温度ヒーターの保温によって温度制御した。ステージの温度は、サンプルの真下に組み込まれた熱電対で測定した。試料表面を厚さ 11 μm のポリ塩化ビニリデンフィルムで覆った。測定中、圧電変換器およびレーザー変位センサーを使用して、プローブと試料との間隔を 20 μm に維持するように調整した。試料から熱的に放出されたミリ波放射は、スリットアパーチャを介してプローブ導波路内で伝播波に変換

され、図 3 に示す受信機によって検出された。図 2 に示す実験装置および図 3 に示す受信機の一部をアクリル樹脂製のチャンバーに入れた。試料表面に結露が生じるのを防ぐために、チャンバーは、乾燥窒素ガスで満たした。測定システムは光学除震台に設置した。

Dicke スイッチモードで動作する信号受信機の概略を図 3 に示す。受信機への入力は、プローブと終端との間の PIN ダイオードスイッチによって 1 kHz の繰り返し周波数で切り替えられた。スイッチの出力ポートは、直列に接続された 2 つのアイソレータを介して低雑音増幅器 (LNA)

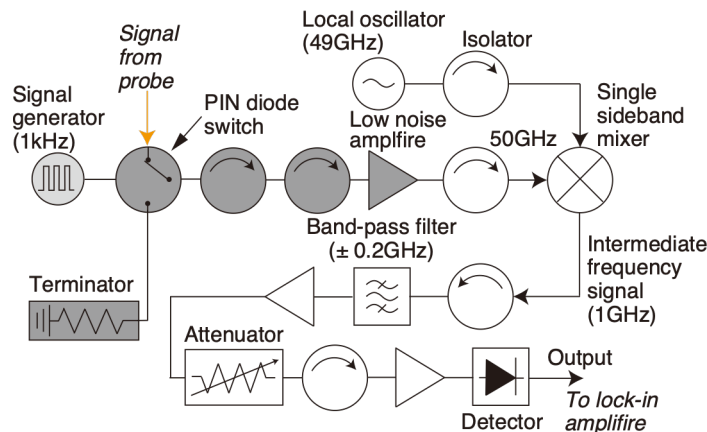


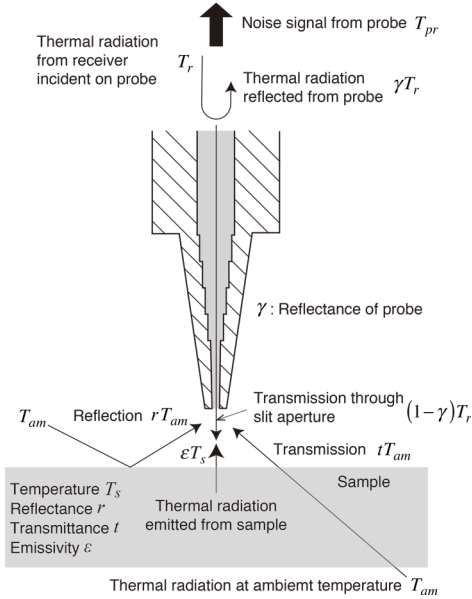
図 3 信号受信機の概略図

に接続されていた。LNA の出力は、単側波帯ミキサによって 1 GHz の中心周波数を有する中間周波数 (IF) 信号にダウンコンバートされる。IF 帯域幅は 0.4 GHz である。IF 信号を増幅し、次いでダイオード検出器を用いて検出した。プローブと終端が接続されたときの検出器からの出力間の電圧差は、ロックインアンプを使用して測定された。図 3 に示す受容体のシアン色成分をチャンバーの内側に配置した。ロックインアンプの時定数は 3 秒であった。

4. 研究成果

4-1. 放射率測定理論

タンパク質水溶液の測定信号から放射率を求めるのに必要な信号処理方法の理論を構築した。物体に入射する電磁波エネルギーは、それが物体によって吸収されるか（吸収率： α ）、物体から反射されるか（反射率： γ ）、そして物体を透過するか（透過率： t ）に分けられる。これらの量の関係は式(1)の形で成り立つ。



$$\alpha + r + t = 1 \quad (1)$$

このとき物体の放射率 (ε) は、式(2)になる。

$$\varepsilon = \alpha = 1 - (r + t), \quad (2)$$

式(2)の放射率によって、測定されたエネルギーから対象物の物理的温度を決定する。

図4は、測定プローブから来るノイズ信号から物体の温度が計算する方法を示す。試料の温度は、物理的パラメータ T_s 、 γ 、 t 、および ε によって決められる。エネルギー保存則とキルヒホッフの法則により、式(2)の γ 、 t 、 ε の合計は1になる。プローブから来るノイズ信号の温度 T_{pr} は、次の式(3)のように計算される。

$$T_{pr} = \gamma T_r + (1 - \gamma) \{ \varepsilon T_s + (1 - \varepsilon) T_{am} \} \quad (3)$$

図3 測定プローブと温度の関係

式(3)右辺の第1項は、受信機の熱反射を示す。

第2項は、スリットに入りプローブ導波路を通

ってきた試料の熱放射と試料表面で反射された周囲の熱放射を示す。プローブ接続時の受信機

の出力信号 S_{pr} と終端接続時の出力信号 S_{term} は、式(4)と(5)になる。

$$S_{pr} \propto (T_{pr} + T_{sys}) kGB \quad (4)$$

$$S_{term} \propto (T_r + T_{sys}) kGB \quad (5)$$

k は、ボルツマン定数、 G は、受信機の入出力比、 B は、受信機の帯域幅、 T_{sys} は、システム雑音温度である。ロックイン・アンプの出力 S は、 S_{pr} と S_{term} の差として、式(6)になる。

$$S \propto S_{pr} - S_{term} = -(1 - \gamma) T_r + (1 - \gamma) \{ \varepsilon T_s + (1 - \varepsilon) T_{am} \} \quad (6)$$

プローブ・試料間でミスマッチがない出力信号 S_f は、プローブの透過率 $(1 - \gamma)$ で S を割った式(7)で得られる。

$$S_f = \frac{S}{1 - \gamma} \propto -T_r + \varepsilon T_s + (1 - \varepsilon) T_{am} \quad (7)$$

BSA 溶液を試料としたときの出力信号 S_{f_BSA} は、式(8)になる。氷を試料としたときの出力信号 S_{f_ice} は、式(9)になる。

$$S_{f_BSA} = \frac{S_{BSA}}{1 - \gamma_{BSA}} \propto -T_r + \varepsilon T_s + (1 - \varepsilon) T_{am} \quad (8)$$

$$S_{f_ice} = \frac{S_{ice}}{1 - \gamma_{ice}} \propto -T_r + T_{am} \quad (9)$$

固体状態の水の放射率は、無視できるので、ミスマッチの影響は受けない。したがって、式(8)の ε は、BSA の放射率になる。 γ_{BSA} と γ_{ice} は、それぞれの反射率である。BSA 溶液の信号強度から氷の信号強度を引くと BSA の信号強度が得られる。

$$S_{f_BSA} - S_{f_ice} \propto \varepsilon (T_s - T_{am}) \quad (10)$$

式(10)は、 T_{am} が、 T_s の変化に一定であるか、 T_s に比例する時、温度に対する $S_{f_BSA} - S_{f_ice}$ の傾きが BSA の放射率を与えることを示す。

4-2. BSA 溶液の測定

熱量測定研究が報告されている BSA を試料に選択して、凍結したタンパク質溶液に加温操作したときの試料温度上昇過程の測定を行うために、1) 専用の測定チャンバーの作成、2) パッシブ・ミリ波頭微鏡システムの最適化の検討、3) 測定操作手順の最適化を検討をおこなった結果、冷却凍結した BSA タンパク質溶液を加温操作したときの試料の温度上昇過程の測定に成功した。

図4のような測定結果を得られるような測定実施の装置設置条件や測定手順を確立した。

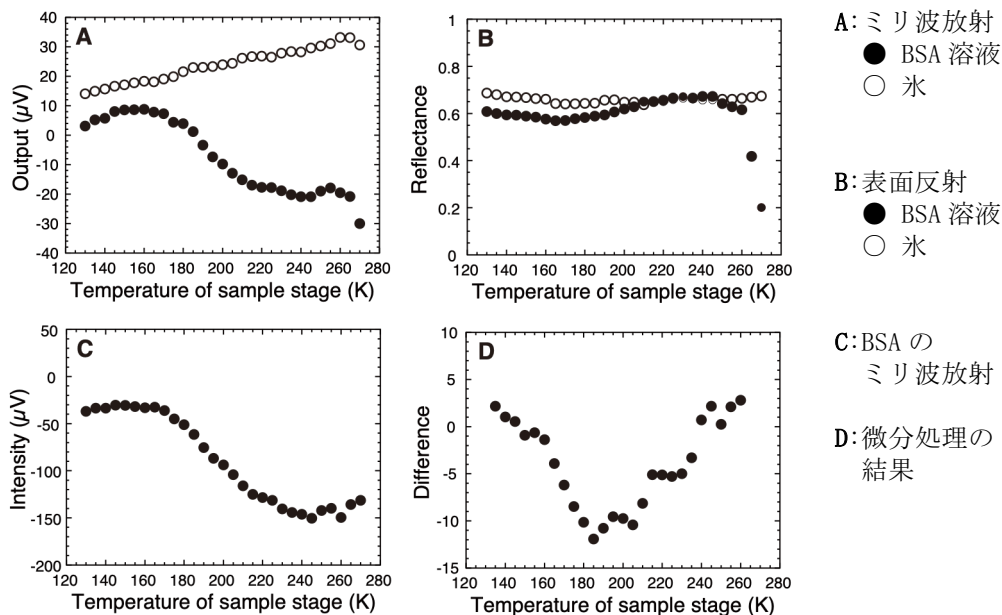


図4 測定の結果

図4Aは、試料ホルダーに水あるいは20% BSA水溶液を入れて測定したとき、試料ステージの温度に対して測定システムの出力信号である電圧を示す。図4A縦軸について、環境温度に保たれた無反射終端からの信号よりもプローブから受信した信号が大きいとき、正の値になる。水の信号は試料ステージの温度に比例してわずかに増加するが、BSA溶液の信号は全く異なるパターンを示す。測定感度の違いを補正するために、式(7)~(9)に示すように、ミスマッチの影響のない出力信号を計算するために必要な反射率を測定した結果が、図4Bである。反射率が0の場合は、ミスマッチのないことを意味する。BSAの放射率情報を抽出するために出力を処理する前に、プローブと各サンプルとの間のミスマッチの影響がない出力信号は、式(7)~(9)に示すように計算される。ミスマッチの違いが測定感度の違いを引き起こすため、これを補正する必要がある。図4Aと図4Bの測定結果から式(10)で示すように計算で補正したBSA由来の信号を、図4Cに示す。BSAの信号強度は、130~170 Kと230~270 Kの温度範囲で、温度に比例した増加を示し、170~230 Kの範囲で減少するパターンを示した。上記の結果を説明する最も単純なモデルは、ある平衡状態から放射率の異なる別の平衡状態への変移が考えられる。図4Dは、図5Cの信号強度について温度に対する微分値を計算した結果である。170~230 Kまでの温度範囲で、放物線を示し、その最小値は約190 Kである。この最小値は、BSA水溶液のガラス転移温度として文献報告された値に対応する(Biophys. J. (2006) 90, 3732-3738, J. Phys. Chem. B (2009) 113, 14448-14456)。図4Cの170~230 Kの信号は、2つの構造中間体間の遷移に対応し、最小値は遷移に対するエネルギー障壁または活性化エネルギーを示すと考えられる。

4-3. 放射率の決定

既知の放射率を有する電波吸収体(放射率;0.79)のデータを利用して、BSAの放射率を決定した。図5の白丸がBSAの測定データであり、170K未満のデータと230~270 Kのデータについて、計算した近似直線をそれぞれ示す。電波吸収体のデータは、黒三角で示す。電波吸収体の全データは、近似直線に高い適合性を示す。電波吸収体の近似直線の傾きと放射率の相関値を求め

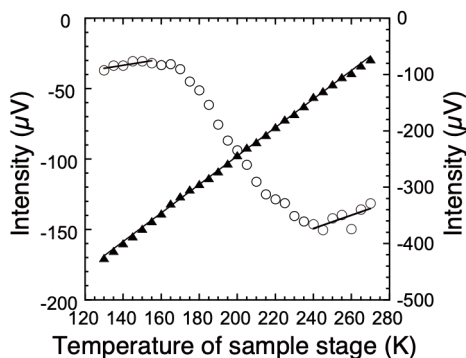


図5 BSA構造中間体の放射率の推定略図

て、BSAの170K未満のデータの近似直線の傾きや230~270 Kのデータの近似直線の傾きから、それぞれの放射率を決定した。170K未満の中間体の放射率は、0.05であり、230~270 Kの中間体の放射率は、0.10となった。2つの放射率が2倍の関係になる結果は、BSAの熱量測定研究でガラス転移の前後で5 kJK⁻¹mol⁻¹の熱容量が10 kJK⁻¹ mol⁻¹の値に変化する報告と一致する。物体の放射率は、吸収率に等しいので、BSAのエネルギー吸収量の変化を測定できたと考えられる。測定の再現性は確認した。また、10%、15%、20%の濃度のBSA溶液の測定を実施し、予想されるとおりの濃度依存性を確認した。

4-4. まとめ

パッシブ・ミリ波顕微鏡システムを用いた測定方法は、タンパク質の機能に重要な構造変化について必要な構造エントロピーのエネルギー量を決定する手段になる可能性を示唆する。非侵襲的で2次元画像化が可能なパッシブ・ミリ波顕微鏡システムは、従来の測定法の問題点を解決して、多検体を同時に短時間で測定する装置への応用が期待される。本研究で構築した測定システムがタンパク質熱量測定に使える新しい方法であると提案する研究成果をまとめて、国際会議で口頭発表し、国際学術雑誌で研究論文として出版した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

1. M. Ishino, A. Kishigami, H. Kudo, J. Bae, T. Nozokido : Observation of Protein Thermodynamics in Ice by Passive Millimeter-Wave Microscopy. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves* **40**, 585-594, (2019) 責任著者 査読あり
DOI : 10.1007/s10762-019-00585-1

2. A. Kishigami, T. Nozokido : Measurement of Protein Conformational Fluctuation in Ice by Passive Millimeter-Wave Microscopy. 2018 43rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz) (2018) Conference Proceedings 責任著者 査読あり DOI : 10.1109/IRMMW-THz.2018.8509927

〔学会発表〕(計 4件)

① 国際学会など

1. A. Kishigami, T. Nozokido : 2018 43rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz) (Nagoya) 2018年9月11日

② 国内学会など

2. 岸上明生 : スルメイカ視細胞内の c GMP 代謝酵素 日本動物学会第 89 回大会 (札幌) 2018年9月14日

3. 岸上明生 : スルメイカ感桿型視細胞の微絨毛における PLC のカルシウム・カルモジュリン依存的なアクチン繊維離脱 日本動物学会第 88 回大会 (富山) 2017年9月23日

4. 岸上明生 : スルメイカ視細胞の PLC は、Calmodulin と F-actin に結合する。第 19 回日本光生物学協会年会 (東京) 2016年7月28日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 荻戸 立夫

ローマ字氏名 : Tatsuo Nozokido

所属研究機関名 : 富山大学・

部局名 : 大学院理工学研究部 (工学)

職名 : 准教授

研究者番号 (8桁) : 00261149

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。