

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05758

研究課題名(和文) 過渡的な生体分子構造の急速凍結とESR研究

研究課題名(英文) Rapid freezing quench and ESR studies of biological molecules in transient states

研究代表者

松岡 秀人 (Matsuoka, Hideto)

大阪市立大学・大学院理学研究科・特任准教授

研究者番号：90414002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スピラベルを用いた距離測定に対して、近似を用いない厳密な解析手法を開発し、モデル系に適用し有用性を示した。また、構造変化を伴う生体分子としてリボスイッチ(遺伝子発現に関わるRNAの構造変化)を対象に、距離測定による構造変化の追跡を行った。高効率なスピラベル化法の提唱と、ESRによるリボスイッチの構造変化の観測に成功した。急速凍結システムを構築し、モデル系としてミオグロビンへのアジド結合反応に応用した。アジドがミオグロビン内の鉄に結合することで生じる鉄イオンの高スピンから低スピン状態への変化をESRによって追跡することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ESRを用いた構造解析のための、新しい解析手法やスピラベル化法の提唱、ならびに急速凍結システムの構築を行った。対象とした系は、リボスイッチやイオンチャンネルなど、その構造変化の観測が実際に様々な分野で注目されているものであり、本研究成果は、関連分野にインパクトを与えるものであった。また、本研究で報告した研究手法は、構造変化を伴う生体反応の分子レベルでの追跡に有用なものとして、今後も活用されるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Pulsed ESR dipolar spectroscopy (PDS) methodology was extended to cases where the high-field approximation breaks down. Equations for the dipolar coupling constant was derived. It was shown on a heme protein that a PDS method called relaxation-induced dipolar modulation enhancement is well-suited to measuring such spectra and that the experimentally obtained dipolar spectra are in full agreement with the derived equations. We introduced a spin labeling strategy based on click chemistry in solution that, in combination with enzymatic ligation, allows highly efficient labeling of complex. Conformations of the preQ1 aptamer and its dynamics were monitored by ESR and PDS in the frozen state. A rapid freezing equipment was successfully constructed, and applied to the reaction of metmyoglobin with sodium azide, which was monitored by ESR.

研究分野：物理化学

キーワード：ESR スピラベル タンパク質 核酸 構造変化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析は、タンパク質など巨大な生体分子の構造を明らかにする上で、重要な研究手法として用いられてきた。その代表例として、光合成光化学系 II 複合体に対する超高分解 X線結晶構造解析があげられる。一方で、本研究で中心的な研究手法となる電子スピン共鳴 (ESR) 法もまた、生体分子の構造や電子構造の解明に重要な役割を果たしてきた。例えば、研究代表者らは、リボ核酸 (RNA) 内の任意の場所に二つの常磁性分子を導入 (スピラベル) する新しい合成手法を提案し、RNA 内の特定の部位間の距離および相対配向について ESR により明らかにしてきた。このように、超巨大な生体分子に対して、その‘静的’構造を研究するための手法は確立されてきており、次の段階として過渡的な構造とその変化に関する研究手法の確立が期待されている。生体分子の構造研究は、生物科学や物性科学など幅広い分野で欠かすことのできない研究課題となっており、特に生体機能を示す常温での構造とダイナミクスを明らかにすることは、特に重要となってきた。電子スピン共鳴 (ESR) や X線結晶構造解析による生体分子の構造研究では、低温下におけるエネルギー極小構造に対して行われるのが一般的であり、常温における準安定状態の構造情報が失われる場合が少なくない。例えば常温において平衡状態をとる RNA が、低温下ではひとつの状態 (構造) に完全にシフトする例が知られている。RNA に限らず、常温において巨大な生体分子は、取り得る多くの構造間を自由に行き来し、構造的に揺らいでいる。常温におけるタンパク質の構造を準安定状態も含めて、いかに捕捉するかは、非常に重要な課題である。また、信号対雑音比の向上などのため、繰り返し測定 (積算) を行うのが物理化学計測において一般的であるが、積算時間よりも速いダイナミクスの追跡は困難となる。そのような背景のもと、生体機能の発現過程で時々刻々と変化する構造を、一定の時間ごとに構造ダイナミクスのスナップショットを観測する手法の確立は非常に重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 常温での生体分子の構造、および生体機能の発現過程で時々刻々と変化する中間構造を、その状態を保持したまま急速に凍結する手法を確立し、2) それによって捕捉・凍結された生体分子の過渡的な構造を ESR 法によって分子レベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究ではスピラベル化された生体試料を対象とし、その構造変化を観測するための手法を確立するため、以下のことを行う。まず、1) スピラベル間の距離を決定するために必要な解析手法の改良を行う。次に、2) 構造変化を伴うスピラベル化生体分子を対象に、構造変化の始状態と終状態の静的構造を凍結状態の ESR 観測によって決定し、それを X線結晶構造解析と比較することで、凍結が及ぼす生体分子の構造への影響について明らかにする。さらに、3) 溶液試料の噴霧ノズルと冷媒との距離などを精密に制御することで、常温での構造を保持した状態での急速凍結を実現するとともに、生体反応直後の構造変化 (中間状態) を ESR により分子レベルで追跡する。

4. 研究成果

1) 距離測定の解析手法の改良

ESR を用いた距離測定として様々な手法が知られている: pulsed electron-electron double resonance (PELDOR or DEER), double quantum coherence EPR (DQC), single-frequency technique for refocusing dipolar couplings (SIFTER), relaxation-induced dipolar modulation enhancement (RIDME)。光合成タンパクなど、金属錯体を反応中心にもつ系に対しては RIDME が最も有用な手法のひとつであるが、その解析手法は完全には確立されていない。本研究ではモデル化合物として、メトミオグロビンにスピラベル (ニトロキシドラジカル) を導入した系 (図 1) を用いて、RIDME 計測を行うとともに、解析手法の改良について研究を行った。モデル系に対して観測された RIDME 計測の結果に対して、通常解析手法 (Pake パターンからダイレクトに距離を決定する手法) によって得られた距離情報と、結晶構造解析から得られたそれを比較したところ一致せず、解析手法の改良が必要であることが明らかとなった。一般には高磁場近似の下で解析が行われるが、本研究では、近似を含まない厳密な解析手法を取り入れたプログラム (DipFit) を新たに開発し、モデル系に適用した。DipFit によって RIDME の結果を解析したところ、スピラベルとヘムの距離だけでなく相対配向も、結晶構造解析の結果を精度よく再現することができた (図 2)。本研究を通して、より汎用性の高い解析手法が確立できた。

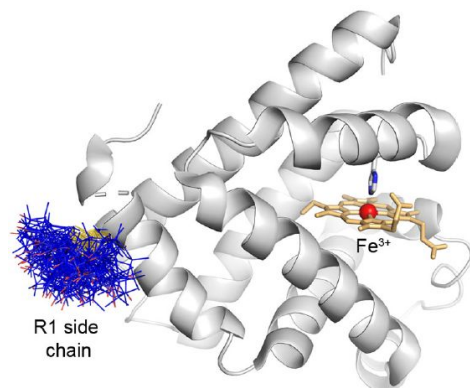


図 1 スピラベルを導入したメトミオグロンミュータント。

2) 構造変化を伴うスピラベル化生体分子の距離測定

本研究では構造変化を伴う生体分子として、まずリボスイッチ (遺伝子発現に関わる RNA の構造変化) を対象に、距離測定による構造変化の追跡を行った。具体的にはまず、34 ヌクレオチド長の preQ1 リ

ボスイッチと、81ヌクレオチド長の TPP リボスイッチに対して、溶液中での Click Chemistry を応用したスピラベル化を行った。このスピラベル化の手法は、以前我々が 16ヌクレオチド長の RNA に対して高効率なスピラベル化法として確立したもので、それをより長い RNA へも適用可能であることを本研究で明らかにした。さらに、それらリボスイッチの構造変化の始状態と終状態を凍結させ、PELDOR 法による距離測定を行った。マグネシウムイオン非存在下の preQ1 は stem-loop 構造 (conformation 1) を主にとるが、マグネシウムイオンを滴下すると pseudoknot 様構造 (conformation 2) へと変化し、さらに preQ1 を滴下することで pseudoknot 構造 (conformation 3) へと変化することが知られている。そして、それらの構造は、マグネシウムイオンおよび preQ1 の濃度に依存した平衡状態をとっている。本研究では、4、23、および 32 番目の核酸にスピラベルを導入した singly-labeled の preQ1 リボスイッチと、4 と 23 および 4 と 32 の核酸にスピラベルを導入した doubly-labeled の preQ1 リボスイッチを合成し、構造変化の平衡状態について ESR による観測を行った。汎用の ESR 計測によって、室温溶液中での構造変化を観測したところ、23 番目の核酸位置はほとんど構造変化を伴わない部位であることが明らかとなった一方で、4 と 32 番目の核酸位置はより顕著な構造変化を示す部位で、マグネシウムイオンおよび preQ1 の滴下により、conformation 1 から 2、さらに 3 へと変化していく様子が観測された。その構造変化の始状態と終状態を凍結させ、PELDOR 法による距離測定を行ったところ、図 3 に示すような距離分布を観測し、結晶構造解析とも良い一致を示した。本研究は、RNA の構造変化を ESR 法に依り初めて観測した例であり、スピラベル化と ESR を用いた距離測定が、構造変化を伴う生体分子の追跡に非常に有用な手法であることが示された。

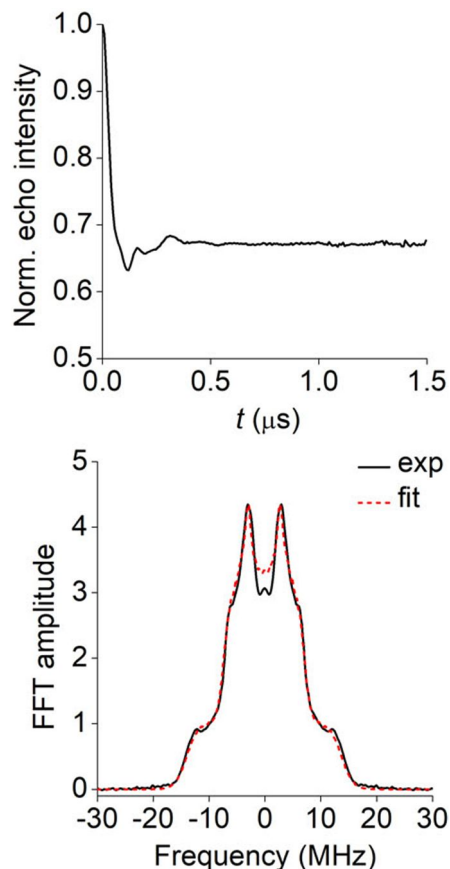


図 2 メトミオグロンミュータントの距離測定とフィッティング。

3) 生体溶液試料急速凍結法の開発と ESR 研究

本研究において、噴霧ノズル直前で溶液を混合し、それを液体窒素で冷却した金属プレートに噴霧し、急速に凍結するシステムを構築した。噴霧速度やノズルと冷却済み金属プレートとの距離など噴霧条件をコントロールすることで、凍結時間の制御を行った。構築した急速凍結システムの凍結時間を校正するため、ミオグロビンへのアジド結合反応を用いた。この反応では、アジドがミオグロビン内の鉄に結合することで、高スピン状態の鉄イオンが低スピンの鉄イオンへと変化する反応で、高スピンから低スピン状態への変化を ESR スペクトルから容易に観測することができる。実際に、最短で 82 マイクロ秒からサブミリ秒までの間、始状態 (Apo) から終状態 (Holo) まで変換する過程を観測し、急速凍結システムの時定数を決定した (図 4)。本研究ではさらに、構築した急速凍結を生体膜イオンチャンネルに適用した。ESR 法を用いた距離測定によって、リガンドとの反応に伴う構造変化を追跡したところ、サブミリ秒の時間領域で起こる構造変化に関する基礎的データを得ることができた。

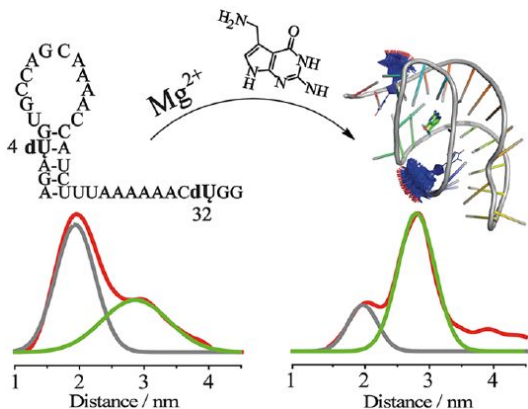


図 3 スピラベル化した 34ヌクレオチド長の preQ1 リボスイッチの構造変化と PELDOR 測定の結果。

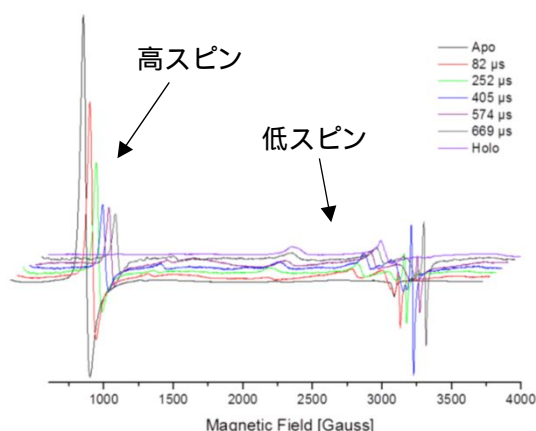


図 4 ミオグロビン-アジド反応の急速凍結による ESR 法を用いた追跡。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kerzhner Mark, Matsuoka Hideto, Wuebben Christine, Famulok Michael, Schiemann Olav	4. 巻 57
2. 論文標題 High-Yield Spin Labeling of Long RNAs for Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2923 ~ 2931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.8b00040	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 該当する
1. 著者名 Yamane Takeshi, Sugisaki Kenji, Matsuoka Hideto, Sato Kazunobu, Toyota Kazuo, Shiomi Daisuke, Takui Takeji	4. 巻 47
2. 論文標題 ESR analyses of picket fence MnII and 6th ligand coordinated FeIII porphyrins ($S = 5/2$) and a CoII(hfac) complex ($S = 3/2$) with sizable ZFS parameters revisited: a full spin Hamiltonian approach and quantum chemical calculations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 16429 ~ 16444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8DT02988A	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 Zaytseva Elena, Timofeev Ivan, Krumkacheva Olesya, Parkhomenko Dmitryi, Mazhukin Dmitrii, Sato Kazunobu, Matsuoka Hideto, Takui Takeji, Bagryanskaya Elena	4. 巻 50
2. 論文標題 EPR and DEER Characterization of New Mixed Weakly Coupled Nitroxide Triradicals for Molecular Three-Spin Qubits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 967 ~ 976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00723-019-01125-9	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 該当する
1. 著者名 Abdullin Dinar, Matsuoka Hideto, Yulikov Maxim, Fleck Nico, Klein Christoph, Spicher Sebastian, Hagelueken Gregor, Grimme Stefan, L?tzen Arne, Schiemann Olav	4. 巻 25
2. 論文標題 Pulsed EPR Dipolar Spectroscopy under the Breakdown of the High Field Approximation: The High Spin Iron(III) Case	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry. A European Journal	6. 最初と最後の頁 8820 ~ 8828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201900977	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 該当する

1. 著者名 Hideto Matsuoka, Marius Retegan, Lisa Schmitt, Sigurd Hoeger, Frank Neese, Olav Schiemann	4. 巻 139
2. 論文標題 Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance and Theoretical Investigations of Metal-Free Room-Temperature Triplet Emitters	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 12968-12975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b04561	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 該当する

1. 著者名 Takeshi Yamane, Kenji Sugisaki, Tomoki Nakagawa, Hideto Matsuoka, Takahisa Nishio, Shigemori Kinjyo, Nobuyuki Mori, Satoshi Yokoyama, Chika Kawashima, Naoki Yokokura, Kazunobu Sato, Yuki Kanzaki, Daisuke Shiomi, Kazuo Toyota, David H. Dolphin, Wei-Ching Lin, Charles A. McDowell, Makoto Tadokoro, Takeji Takui	4. 巻 19
2. 論文標題 Analyses of sizable ZFS and magnetic tensors of high spin metallocomplexes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Phys Chem Chem Phys	6. 最初と最後の頁 24769-24791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7cp03850j	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 該当する

1. 著者名 Sato Kazunobu, Hirao Rei, Timofeev Ivan, Krumkacheva Olesya, Zaytseva Elena, Rogozhnikova Olga, Tormyshev Victor M., Trukhin Dmitry, Bagryanskaya Elena, Gutmann Torsten, Klimavicius Vytautas, Buntkowsky Gerd, Sugisaki Kenji, Nakazawa Shigeaki, Matsuoka Hideto, Toyota Kazuo, Shiomi Daisuke, Takui Takeji	4. 巻 123
2. 論文標題 Trityl-Aryl-Nitroxide-Based Genuinely g-Engineered Biradicals, As Studied by Dynamic Nuclear Polarization, Multifrequency ESR/ENDOR, Arbitrary Wave Generator Pulse Microwave Waveform Spectroscopy, and Quantum Chemical Calculations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry A	6. 最初と最後の頁 7507 ~ 7517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.9b07169	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 該当する

1. 著者名 Uchida Kaiji, Cosquer Goulven, Sugisaki Kenji, Matsuoka Hideto, Sato Kazunobu, Breedlove Brian K., Yamashita Masahiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Isostructural M(ii) complexes (M = Mn, Fe, Co) with field-induced slow magnetic relaxation for Mn and Co complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 12023 ~ 12030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8dt02150c	査読の有無 無
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17件(うち招待講演 6件/うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Tobias Hett, Tobias Zbik, Hideto Matsuoka, Reinhard Seifert, Benjamin Kaupp, Olav Schiemann
2. 発表標題 PELDOR with Microsecond Time Resolution
3. 学会等名 APES-IES2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshii Yamane, Kenji Sugisaki, Hideto Matsuoka, Kazunobu Sato, Kazuo Toyota, Daisuke Shiomi, Takeji Takui
2. 発表標題 Conventional ESR Analyses of Sizable ZFS Tensors in Metal Ionic High Spin Systems in Harmony with Quantum Chemical Calculations: Applications to Some Important High Spin Metallocomplexes
3. 学会等名 APES-IES2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikuko Akimoto, Hideto Matsuoka, Takao Sekiya
2. 発表標題 Double electron-electron resonance with arbitrary-waveform pulses: application to randomly distributed electron and hole spins in a semiconductor
3. 学会等名 APES-IES2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideto Matsuoka, Hiroki Matsui, Olav Schiemann, Kenji Sugisaki
2. 発表標題 - Time-resolved EPR, Optical, and Quantum Chemical Studies of pi-conjugated phenazine derivatives
3. 学会等名 APES-IES2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 崎山 弾、巽 俊輔、杉崎 研司、松岡 秀人、佐藤 和信、豊田 和男、塩見 大輔、Sharvan Kumar、Sudhir Kumar Keshri、Yogendra Kumar、Pritam Mukhopadhyay、工位 武治
2. 発表標題 ホスホニウム基を有する安定なナフタレンジイミドの電子構造とダイナミクスの研究
3. 学会等名 SEST2019
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井大樹、杉崎研司、Olav Schiemann、佐藤和信、松岡秀人
2. 発表標題 ビリジンおよびベンゼンが縮環したフェナジンの時間分解EPRおよび発光測定
3. 学会等名 SEST2019
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡秀人、松井大樹、Olav Schiemann、杉崎研司
2. 発表標題 縮環フェナジン類における 共役ネットワークと発光の相関
3. 学会等名 SEST2019
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡 秀人、松井 大樹、Olav Schiemann
2. 発表標題 室温でりん光を示すメタルフリー有機EL発光体の電子状態とスピンダイナミクス研究
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideto Matsuoka, Marius Retegan, Lisa Schmitt, Frank Neese, Sigurd Hoeger, Olav Schiemann
2. 発表標題 Excited Triplet States of Metal-Free Emitters for OLEDs
3. 学会等名 AWEST2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideto Matsuoka, Marius Retegan, Lisa Schmitt, Sigurd Hoeger, Frank Neese, Olav Schiemann
2. 発表標題 Metal-Free Room-Temperature Triplet Emitters as Studied by Time-Resolved EPR and Quantum Chemical Calculations
3. 学会等名 The 11th Japanese-Russian workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideto Matsuoka, Marius Retegan, Lisa Schmitt, Sigurd Hoeger, Frank Neese, Olav Schiemann
2. 発表標題 Time-Resolved EPR and Theoretical Investigations of Metal-Free Dual Singlet-Triplet Emitters in OLEDs
3. 学会等名 MOLMAG2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideto Matsuoka, Marius Retegan, Lisa Schmitt, Sigurd Hoeger, Frank Neese, Olav Schiemann
2. 発表標題 Time-Resolved EPR and Theoretical Investigations of Metal-Free Triplet Emitters for Organic Light Emitting Diodes
3. 学会等名 MDMR2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideto Matsuoka, Marius Retegan, Lisa Schmitt, Wolfram Ratzke, John M. Lupton, Sigurd Hoeger, Frank Neese, Olav Schiemann
2. 発表標題 室温でりん光を示す有機EL発光物質の時間分解EPR および理論計算による研究
3. 学会等名 第11回分子科学討論会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideto Matsuoka, Marius Retegan, Lisa Schmitt, Wolfram Ratzke, John M. Lupton, Sigurd Hoeger, Frank Neese, Olav Schiemann
2. 発表標題 メタルフリー-OELD発光体の時間分解ESRおよび理論計算による研究
3. 学会等名 SEST2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideto Matsuoka, Hiroki Matsui, Olav Schiemann, Kenji Sugisaki
2. 発表標題 Correlation between p-conjugation network and luminescence of fused phenazine derivatives
3. 学会等名 EUROISMAR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡秀人、松井大樹、秋元郁子
2. 発表標題 りん光性有機EL発光体の開発に向けた フェナジン誘導体の励起状態研究
3. 学会等名 SEST2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝野祐樹、神崎祐貴、秋元郁子、松岡秀人
2. 発表標題 ナフタレンジイミド誘導体の励起状態のダイナミクス
3. 学会等名 SEST2019
4. 発表年 2019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
研究協力者	沈 建仁 (Shen Jian-Ren)		
研究協力者	Schiemann Olav (Schiemann Olav)		