

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310071

研究課題名(和文) 蛍光偏光解消法によるナノスペース粘度計測法の開発

研究課題名(英文) Measurement of local viscosity of the hydration shell of protein by time-resolved fluorescence anisotropy spectroscopy

研究代表者

鈴木 誠 (SUZUKI, MAKOTO)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60282109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質表面に、可変リンカー長の蛍光分子を結合し、パルスレーザー励起により時間分解蛍光偏光解消測定による蛍光分子の回転相関時間 $T_c$ 測定解析を行った。アクチンのcys374にリンカーで固定した蛍光色素の回転相関時間は、水和層中にハイパーモバイル水(誘電緩和測定DRS)の多いF-actinではその少ないG-actinより短かくDRSと同様の結果を得た。さらに周波数領域蛍光分光法による正確な $T_c$ 測定法を考案した。

研究成果の概要(英文)：In this study, rotational correlation time  $T_c$  of fluorescent dye was measured to evaluate the local viscosity of the hydration region of protein surface. The  $T_c$  measured by this method was found to be in linear relation with the solvent viscosity. The CW-laser-based method revealed shorter  $T_c$  of Cy3 linked at Cys374 of actin in F-actin than around G-actin, which is consistent with the result by dielectric relaxation data. On the other hand,  $T_c$  (<1ns) of small fluorescent dye such as rhodamin 6G in water could not be measured by pulse-laser-based method without picosecond pulse width. We have designed a frequency-region fluorescent anisotropy spectroscopic method to measure  $T_c$  of small fluorescent dyes.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ ナノバイオサイエンス

キーワード：局所粘度計測 蛍光偏光解消 回転相関時間 ハイパーモバイル水 アクチンフィラメント 蛍光異方性 水和水 水和水の粘度

### 1. 研究開始当初の背景

生物学・医学の分野では、従来の細胞生物学や遺伝子工学に1分子計測技術を組み合わせ、1分子タンパク質生理学の構築に向けた研究が進展している。近年の柳田 ERATO による1分子計測技術開発、F1-ATP 分子モーターの特定領域研究等に代表されるように、ライフサイエンスの世界で1分子計測技術は日本は世界をリードする状況にある。最近進められているナノテクノロジーの基盤技術として、タンパク質をナノシステムの材料として応用する試みが多数提案されている。ナノシステムの例としてはタンパク分子でできた分子機械がある。タンパク質でできた分子モーターであるバクテリア鞭毛モーターでは、細胞膜に固定された軸受け部となるタンパク質分子表面と、回転部を構成するタンパク質分子表面の間には水が介在しており、その摺動(まさつ運動)運動がどのような性質が興味深い課題である。同様に、筋肉の収縮を引き起こすアクチンフィラメントとミオシンフィラメントは、きわめて精密に互い違いに六方格子を組んだ構造をしている。このきわめて接近したせまい空間で、アクチンフィラメントとミオシンフィラメントは相互に滑り込む運動をして力を発生する。したがって、滑り運動の場となる周囲の水の粘度は、筋肉の収縮運動の効率を高める上でもきわめて重要な因子と考えられる。このアクチンフィラメントの周りの水は、本研究の申請代表者である鈴木らにより、バルクの水より誘電緩和周波数の高い水(ハイパーモバイル水:HMW)であることが示され、すなわち粘度の低い水であろうことが示唆されている。このことは、運動のロスを減らす意味でも重要な役割を果たしていると思われる。本研究代表者である鈴木らは高分解誘電緩和分光法によりアクチンフィラメントの動的な水和状態の変化が起こることを2003年にBiophys. J.(vol.85, 3154-3161)で、2004年にBBRC(vol.322, 340-346)で報告した。ハイパーモバイル水 HMW がバルクの水より誘電緩和周波数が高いことから、アクチンフィラメント周りにはバルクの水より回転が自由な水があると結論した。この水は粘度がバルクより低いと考えられる。

### 2. 研究の目的

タンパク質表面に、可変リンカー長の蛍光分子を結合し、パルスレーザーで励起し、蛍光偏光解消を時間分解測定することにより、蛍光分子の回転相関時間を求め、対象物(ここではアクチン)表面に結合した蛍光分子を取り囲むナノボリュウムの水の粘度を測定することを目的とする。これまでの誘電緩和測定によれば、アクチンフィラメント表面にハイパーモバイル水が厚さ1nm程度存在する

ことが予想されるので、蛍光色素を結合するリンカー部の種類と長さを変えて、水和層の中から外に至る水の粘度変化を測定する。タンパク分子表面の水和層、ハイパーモバイル水層、バルク水層と重なっていると考えられる。

本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義として、タンパク分子モーターに代表されるナノシステムの運動に直接影響すると考えられるタンパク分子表面の粘度の空間分布情報を得るところにある。これまで、誘電緩和というマクロな測定法でしかわからなかったハイパーモバイル水の粘度が初めて明らかになる。タンパク分子間の粘性運動を定量的に予測可能になり、分子モーターの理解とともにナノシステムデザインにも有用な知見を提供することが期待できる。

### 3. 研究の方法

アクチン表面に接する水和層の水の粘度を測定するために、被測定タンパク質に蛍光色素を結合し、パルスレーザー励起による蛍光偏光解消の時分割測定を行い、色素の回転相関時間を測定し、水の粘度を求める。測定対象となるタンパク質への吸着作用の少ない、ポリエチレングリコール系の長さの異なるリンカーを作成する。リンカー長の最も長いときの測定値をバルクの水の粘度と比較し、リンカー長に求められる条件を得る。この一連のプロセスを遂行、改良を進め目的のナノスペース粘度計測法を開発する。

Haidekker ら(2004, 2005)が分子ローターと称して、2つの共役系を連結する-C=C-結合の周りで回転が起こる速度が、周囲の溶媒の粘度の影響を受けるとして、蛍光強度と溶媒粘度の関連を何種類かの蛍光性分子種について報告している。たとえば、下記、CCVJ の場合は、-C=C-CN の二重結合が壊れて回転し、DMABN の場合は、Phenyl-N の結合で回転が起こる。これらは、理論的にはForster-Hoffman の理論(1971)で、後にSumi ら(1991, 2001)により理解が深められ、量子収率と溶媒粘度の間の両対数軸での線形関係が示されている。この分子内の回転

(nonfluorescent twisted internal charge transfer state への遷移)を利用する方法は、蛍光強度が溶媒粘度に依存することを利用するために、もし蛍光強度が変化するほかの要因がある場合に、溶媒粘度の議論ができなくなるという実用上の大きな問題を有している。たとえば、本研究の研究対象となるハイパーモバイル水を生成する溶質として代表的なヨウ化カリウムの水溶液では、多くの場合蛍光分子の蛍光強度は大きく減衰してしまい、粘度の測定を蛍光強度変化から行うことが困難であり、別の測定法の開発が必

要になってきた。

本研究では、フレキシブルなリンカーの先にクロモフォア（色素）を固定した分子をプローブとして用いる。（図1ではクロモフォアはCy3）この色素を溶かした溶液にパルス偏光（たとえばピコ秒幅）を照射したとき、溶液内の色素の中で入射光と同じ面にあった色素分子だけが励起される。蛍光を放出するまでの時間内に色素が自由回転したとすると、多数の色素から放出される蛍光は、ある色素は速く蛍光を放出し、ある色素は遅く蛍光を放出するので、全体として入射光よりぼけた偏光となる。この偏光が時間とともに解消する過程を測定すれば、色素分子の回転相関時間をもとめることができる。

蛍光偏光解消の時分割測定は、入射側と受光側の間に角度をずらした偏光子を入れる以外は基本的に蛍光寿命測定と同じで広く行われている。たとえば、Cy3 の場合は、蛍光寿命が 0.5 ns 程度であるが、アクチンに結合すると約 2.0 ns となる。アクチン分子表面での蛍光色素の回転相関時間は、これまでに行った定常蛍光異方性と蛍光寿命の測定から約 30 ns であることが予測されている。しかし、この値は蛍光寿命より長い回転相関時間を推定したもので正確ではない。そのため、蛍光寿命の長い蛍光色素を用いるか、もしくは回転相関時間が短い小さなクロモフォアを用いる必要がある。小さなクロモフォアの場合はそれだけ蛍光寿命の短いものも使用できる。また、タンパク質表面から離れた水の中の粘度を測定するためには、リンカー長の異なる蛍光色素分子を作成して、その蛍光寿命も含めた蛍光発光特性を定量的に把握することが必要になる。リンカー部の設計も重要な因子である。水溶性でなければ、タンパク質分子表面に吸着する可能性もある。水素結合サイトが多ければ、やはり好まざるところへの吸着の可能性もある。したがって、吸着作用の少ない、ポリエチレングリコール系なども対象に考えた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 材料

##### アクチン

アクチンは、ニワトリ骨格筋より抽出・精製した。モノマーアクチン(G-actin)の溶液条件を、G-buffer (2 mM HEPES (pH 7.8), 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT), F-actin の溶液条件を F-buffer (50 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.8), and 2 mM MgCl<sub>2</sub>)とした。

##### アクチンの蛍光標識

アクチンの Cys-374 をチオール反応性蛍光色素で特異的に標識した G-actin に 0.1 M KCl, 10 mM HEPES (pH 7.8) を加えて F-actin を調製し、マレイミド化蛍光色素を加えて反応させた。反応混合液を超遠心に掛けて F-actin

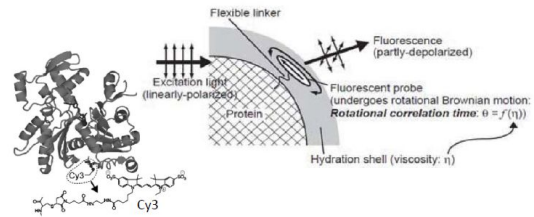


図1 アクチンに固定した蛍光色素の回転運動性から水和層の粘度を評価

を沈殿させ、F-actin の沈殿を G-buffer で懸濁して、G-buffer に対して透析した。透析内液を超遠心に掛けて、上清を回収して、蛍光標識 G-actin 試料とした。

##### マレイミド化蛍光色素の合成

アクチンの Cys-374 を特異的に蛍光標識するための、マレイミド化蛍光色素を合成した。アミノ基反応性（コハク酸イミド化）蛍光色素 (Cy3-OSu または Rhodamine 6G SE (R6G-SE)) をジアミンと反応させ、蛍光色素のアミノ化を行った。アミノ化蛍光色素に対して、マレイミド化コハク酸イミドクロスリンカを反応させて、マレイミド化蛍光色素を生成した。これらは、逆相クロマトグラフィーによって精製した。（図2）

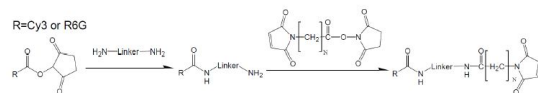


図2 マレイミド化蛍光色素の合成

##### (2) アクチンに結合した Cy3 の回転運動性計測

アクチン周囲の水の粘性の算出を行うためにアクチンに Cy3 をリンカーを介して係留した。（図1）回転ブラウン運動により Cy3 の蛍光は偏光解消する。そこで、Cy3 の定常状態蛍光異方性と蛍光寿命測定を測定し、Cy3 の回転運動性を調べた。F-actin, G-actin 各水溶液の蛍光スペクトルを図3に示す。蛍光異方性が F-actin の時の方が低いことから Cy3 の運動性が F-actin において高いことが示唆される。そのため、蛍光寿命の効果を補正

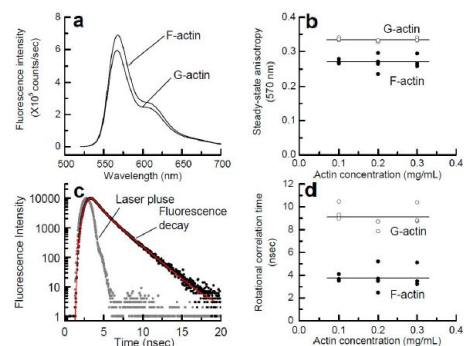


図3 Cy3の定常状態蛍光異方性と蛍光寿命測定結果。a:F-actin, G-actin 各水溶液の蛍光スペクトル, b:定常蛍光異方性, c:蛍光寿命, d:回転相関時間。

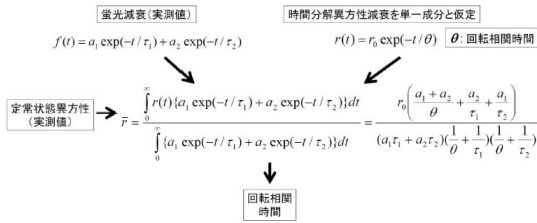


図4 蛍光色素の回転相関時間の算出

するために、単一光子計数法による測定を行った。その結果、蛍光強度の減衰は、単一光子計数法の測定から2成分で近似できた。蛍光寿命と、定常状態異方性のデータより、Cy3の回転相関時間を算出した。算出法を図4に示す。ここで蛍光強度の減衰曲線は単一指数関数を仮定した。アクチンに係留されたCy3の回転運動性と、溶媒粘性の関係を調べるために、グリセリン・G-buffer 混合液中のCy3-G-actinの蛍光異方性測定を行い、校正曲線を得た(図5)。このデータを基にして、F-actin周囲の局所粘性の算出を行った(表1)。その結果、F-actin周囲の水の局所粘性は、純水の60%と見積もられた。さらに、図6の3種の長さのリンカーをもつ rhodamin 6G系の色素を用いて、新たに導入した蛍光偏光解消測定装置 TemPro による直接の蛍光偏光解消測定を行った。蛍光偏光解消の測定結果を図7に示す。単一光子計数法によって測定したR6Gの蛍光偏光成分を、異方性減衰2成分の和でフィットした。(図8)それぞれ、R6Gの回転と、タンパク質の回転と考えられる。フィッティングによって得られた時定数を図9に示した。

R6Gの回転運動は、PEGリンカーの長さに依存している。Fast phaseの回転相関時間(図11 left)は、PEG1で遅く、PEG2-3ではほぼ同等である。また、異方性振幅も、特にF-actinでは、PEG1リンカーの場合は小さくなった。これらは、PEG1リンカーの長さのために、R6Gがタンパク質と十分な間隔を保てずに、タンパク質の立体障害により、回転運動が抑制されたためと考えられる。

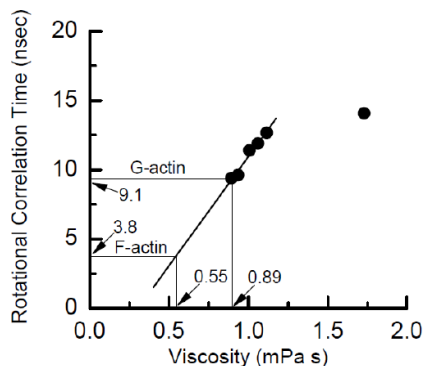


図5 蛍光分子の回転相関時間とグリセリン水溶液(溶媒)粘度の関係

表1 アクチンに固定した蛍光色素の回転運動性

|         | Anisotropy | Rotational correlation time (nsec) | Local viscosity (mPa s) |
|---------|------------|------------------------------------|-------------------------|
| F-actin | 0.270      | 3.8                                | 0.55                    |
| G-actin | 0.334      | 9.1                                | 0.89                    |

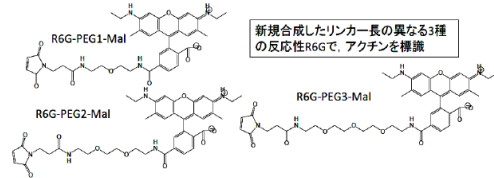


図6 作成した異なるリンカー長のRhodamin 6G系色素

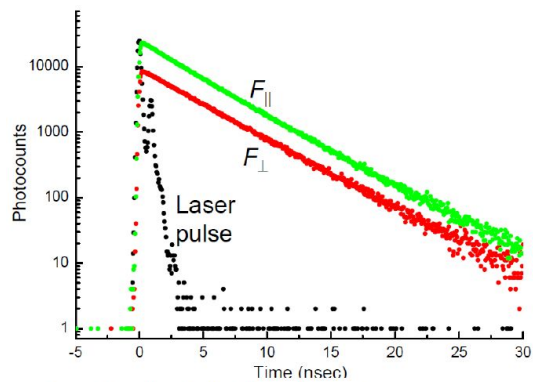


図7 蛍光偏光解消測定結果

時間分解蛍光異方性減衰のモデル関数

$$r(t) = b_1 \exp(-t/\theta_1) + b_2 \exp(-t/\theta_2), \quad r = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + 2F_{\perp}}$$

蛍光発色団の回転      タンパク質の回転

図8 蛍光異方性減衰の2指数関数近似

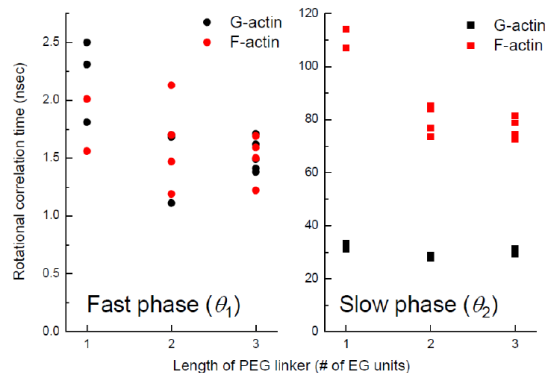


図9 G-actin, F-actinに係留した蛍光色素の異方性減衰時間. 速い減衰(左)と遅い減衰(右)

### (3) 結論

Cy3-アクチンの蛍光測定により、F-actin周囲の水和水の局所粘性は、G-actinのそれに比べて低いことを裏付ける結果を得た。これは誘電緩和分光法で2003年に著者らが行った結果を一致している。

R6G-actin の実験より, R6G の蛍光異方性減衰は, R6G 自体の回転と, actin の回転に切り分けられそうである. パルス幅のさらに短いレーザーがあればベターであるが, R6G 自体の回転相関時間算出の精度を向上させることにより, タンパク質周囲の局所粘性解析の精度の向上が期待できる.

この研究の過程で, CWレーザーの振幅を1GHz 程度の交流で変調し, 位相検波する方法で, さらに精度の高い周波数領域蛍光分光による回転異方性検出の方法も考案した. この内容は特許として申請中である.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

(1) Yuichiro Okazaki, Tetsuo Taniuchi, George Mogami, Nobuyuki Matubayasi, Makoto Suzuki: Comparative Study on the Properties of Hydration Water of Na- and K - Halide Ions by Raman OH/OD-stretching Spectroscopy and Dielectric Relaxation Data, *J. Phys. Chem. A*, 118 (2014) 2922-2930. DOI: 10.1021/jp412804d. 査読有

(2)Makoto Suzuki: What is "hypermobile" water? :detected in alkali halide, adenosine phosphate and F-actin solutions by high-resolution microwave dielectric spectroscopy, *Pure & Appl. Chem.* 86 (2014) 181-189. DOI: 10.1515/pac-2014-5024. 査読有

(3)Tetsuichi Wazawa, Shin-ichiro Yasui, Nobuyuki Morimoto, Makoto Suzuki, 1,3-Diethylurea-enhanced Mg-ATPase activity of skeletal muscle myosin with a converse effect on the sliding motility, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834 (2013) 2620-2629. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.08.003. 査読有

(4)George Mogami, Takashi Miyazaki, Tetsuichi Wazawa, Nobuyuki Matubayasi, and Makoto Suzuki, Anion-Dependence of Fast Relaxation Component in Na-, K-Halide Solutions at Low Concentrations Measured by High-Resolution Microwave Dielectric Spectroscopy, *J. Phys. Chem. A* 117 (2013) 4851-4862. DOI: 10.1021/jp4012119. 査読有

(5)Makoto Suzuki, Tetsuichi Wazawa, George Mogami, and Takao Kodama, Role of Water in Actin-Myosin Binding and Actin Polymerization: Rotational and Translational Mobility of Water Molecules, *Journal of the Physical Society of Japan, Supplement* (2012) 81, SA003(1-14). DOI: 10.1143/JPSJS.81SA.SA003. 査読有

(6)Tetsuichi Wazawa, Takashi Sagawa, Tsubasa Ogawa, Nobuyuki Morimoto, Makoto Suzuki, Hyper-mobility of water around actin filaments revealed using pulse-field gradient spin-echo 1H-NMR and fluorescence spectroscopy, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 404, 28 Jan. (2011) 985-990. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.12.096. 査読有

[学会発表](計15件)

(1)Tetsuichi Wazawa, Nobuyuki Morimoto, Makoto Suzuki, Rotational correlation time of a fluorophore tethered to actin as studied by frequency-domain fluorescence anisotropy measurements, 51st Ann. Meeting Biophys. Soc. Jpn, Kyoto, Oct. 28-30 (2013)

(2)Tetsuichi Wazawa, Shin-ichiro Yasui, Nobuyuki Morimoto, Makoto Suzuki, 1,3-Diethylurea-enhanced Mg-ATPase of skeletal muscle myosin with a converse effect on the sliding motility, 51st Ann. Meeting Biophys. Soc. Jpn, Kyoto, Oct. 28-30 (2013).

(3)Kazuki Ishimori, Yangtian Wang, Norihiko Tanno, George Mogami, Tetsuichi Wazawa, Nobuyuki Morimoto, Makoto Suzuki, Hydration properties of sodium-oligophosphates, -alkyl carboxylates and -alkyl sulfonates by dielectric relaxation spectroscopy, 51st Ann. Meeting Biophys. Soc. Jpn, Kyoto, Oct. 28-30 (2013).

(4)Asato Imao, Takahiro Watanabe, Tetsuichi Wazawa, George Mogami, Nobuyuki Morimoto, Makoto Suzuki, Hydration and partial specific volume measurements of G- and F-actin, 51st Ann. Meeting Biophys. Soc. Jpn, Kyoto, Oct. 28-30 (2013).

(5)Noriyoshi Ishida, Takahiro Watanabe, George Mogami, Tetsuichi Wazawa, Makoto Suzuki, Halide ion effect on hydration state of F-actin, 51st Ann. Meeting Biophys. Soc. Jpn, Kyoto, Oct. 28-30 (2013).

(6)鈴木 誠 マイクロ波誘電緩和分光法による有機・無機イオンおよびタンパク質の水和特性、日本分光学会テラヘルツ分光部会シンポジウム「テラヘルツ分光法の最先端 ~ ここまできたテラヘルツ時間領域分光 ~ 」2012年10月26日。(招待講演)千葉.

(7)Yuichiro Okazaki, Asato Imao, Noriyoshi Ishida, George Mogami, Tetsuichi Wazawa, Makoto Suzuki, Temperature dependence of hydration properties of F-actin by dielectric



relaxation spectroscopy, 50th Ann. Meeting of Biophys. Soc. Jpn, Nagoya, Sept. 22-24 (2012).

(8)Alato Imao, Yuichiro Okazaki, Noriyoshi Ishida, Tetsuichi Wazawa, George Mogami, Makoto Suzuki (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ), Dielectric analysis of hydration change of actin by polymerization, 50th Ann. Meeting of Biophys. Soc. Jpn, Nagoya, Sept. 22-24 (2012).

(9)Noriyoshi Ishida, Asato Imao, Yuichiro Okazaki, Tetsuichi Wazawa, George Mogami, Makoto Suzuki, Effects of halide ions on the hydration properties of F-actin, 50th Ann. Meeting of Biophys. Soc. Jpn, Nagoya, Sept. 22-24 (2012).

(10)Takuya Nakagawa, Shin-ichiro Yasui., Tetsuichi Wazawa, George Mogami, Makoto Suzuki, Cosolvent effects on the hydration state and the enzymatic activity of skeletal myosin, 50th Ann. Meeting of Biophys. Soc. Jpn, Nagoya, Sept. 22-24 (2012).

(11)Kazuki Ishimori, George Mogami, Nobuyuki Morimoto, Makoto Suzuki, Hydration study of oligophosphates by dielectric relaxation spectroscopy, 50th Ann. Meeting of Biophys. Soc. Jpn, Nagoya, Sept. 22-24 (2012).

(12)和沢鉄一, 最上謙二, 佐川貴史, 森本展行, 鈴木誠, アクチンフィラメント周囲の高い運動性を有する水と水の蛍光法による検出, 第12回日本蛋白質科学会年会, 6月20-22日名古屋, (2012).

(13)Makoto Suzuki, Overview of studies on ATP-driven proteins and asymmetry, Symposium "Asymmetry produced by water and ATP", 第49回日本生物物理学会年会, 姫路, 2011.9.16. (招待講演)

(14)鈴木誠 ATP加水分解過程におけるタンパク質表面の水の状態の変化、シンポジウム「蛋白質/水界面の熱力学とATPエネルギー」第63回コロイドおよび界面化学討論会、京都 2011年9月7日。(招待講演)

(15)Makoto Suzuki, Tetsuichi Wazawa, George Mogami, Takao Kodama, Role of water in actin-myosin binding and actin polymerization: rotational and translational mobility of water molecules, 5th Mini-Symposium on Liquids - Fundamental problems on liquids and related topics-, Okayama, June 25-26 (2011). (招待講演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

(1)名称:周波数領域蛍光測定装置

発明者:和沢鉄一、鈴木誠

権利者:国立大学法人東北大学

種類:特許願

番号:2014-001292

出願年月日:平成26年1月8日

国内外の別:国内

(2)名称:周波数領域蛍光測定装置

発明者:和沢鉄一、鈴木誠

権利者:国立大学法人東北大学

種類:特許願

番号:2013-192544

出願年月日:平成25年9月18日

国内外の別:国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.material.tohoku.ac.jp/atpwater/>

6.研究組織

(1)研究代表者

鈴木誠(SUZUKI, MAKOTO)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号:60282109

(2)研究分担者

森本展行(MORIMOTO, NOBUYUKI)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号:00313263

(3)連携研究者

和沢鉄一(WAZAWA, TETSUICHI)

東北大学・大学院工学研究科・研究支援者

研究者番号:80359851