

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26287094

研究課題名(和文) 外部電場の印加によるタンパク質の動的変化の解明

研究課題名(英文) Studies on the dynamics of protein structure induced by an external electric field

研究代表者

中林 孝和 (Nakabayashi, Takakazu)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30311195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：外部電場の印加に対する生体分子の応答機構を明らかにすることを目的として、電場印加に伴う赤外吸収スペクトル変化を測定するシステム製作などを行った。赤外吸収の電場効果では、溶液中の分子の電場効果を観測することができ、 10^{-6} オーダの微小電場変化を検出することができる。溶液中における脂肪酸の赤外吸収スペクトルの電場効果を測定し、C=O伸縮およびC-H伸縮振動バンドにおいて、シュタルク効果に起因する電場印加によるスペクトルのブロードニングを観測することができた。得られた変化をもとに、各振動の非調和性を議論することができる。

研究成果の概要(英文)：We have constructed the systems to clarify the response mechanism of biomolecules to the application of an external electric field. The constructed IR electroabsorption system was optimized to observe the electric field effect of molecules in solution state with a very small change of a magnitude of 10^{-6} . We have measured the electric field effects on the IR absorption spectra of fatty acids in solution state and observed the broadening of the spectra in the C=O stretching and C-H stretching bands region, which is due to the so-called Stark shift. The anharmonicity of each vibration mode can be discussed based on the magnitude of the observed broadening.

研究分野：生物物理化学

キーワード：電場効果 赤外吸収スペクトル 脂肪酸 Step-Scan FT-IR

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質のフォールディング・アンフォールディング反応は、近年その重要性がさらに認識されている研究分野の一つである。タンパク質は、一次構造に従ってアミノ酸がつながるだけでは機能を発現することができず、フォールディングされて正しい高次構造を獲得することが必要である。この高次構造はアミノ酸配列のみでは予測することが難しく、遺伝子操作によってタンパク質を合成しても、機能が発現しない場合がある。また BSE などのタンパク質のコンフォメーション病を解明するためには、高次構造の形成機構の理解が必須となる。

(2) タンパク質の構造変化・アンフォールディング反応は、温度、pH、化学物質のみではなく、外部電場の印加によっても誘起されることが提案されている。外部電場の印加によるポリペプチドの Helix-Coil 転移などが報告されており、タンパク質内およびタンパク質と周囲の環境との静電的な相互作用が、立体構造形成において重要な役割を果たしている。細胞内におけるタンパク質の高次構造形成機構は、静電的相互作用により、試験管内とは異なるのではないかと考えられ、構造形成と静電的相互作用の関係は、理論分野においても着目されている。しかし、外部電場効果の実験的研究は電気伝導率の測定などが中心であり、電場印加に伴う構造変化およびダイナミクスの分子レベルでの詳細は全くわかっていない。

(3) さらに、タンパク質の電場応答機構の解明は、ナノ秒パルス高電場を用いた細胞内状態の診断・治療にも展開することができる。近年、細胞や生体組織にナノ秒パルス電場を印加し、細胞内環境を変化させる研究が注目を集めている。特にナノ秒パルス高電場の印加によって、がん細胞の死滅や、細胞膜を殆ど傷つけることなく、細胞内のイオン濃度などの細胞内部の状態が変化することが報告されている。細胞膜に穴を開けるなどの損傷がないために、がん細胞の死滅・疾病の治療などへの応用が期待されている。しかし、ナノ秒パルス高電場によって細胞内環境が変化する機構は全くわかっていない。ナノ秒パルス高電場による細胞内部の状態変化は、細胞内にある様々な生体分子の電場誘起変化が原因の一つであると考えられ、「膜やタンパク質の化学構造が外部電場の印加によってどのように変化するのか」を構造化学や物理化学の立場から理解することは、生体応答機構の理解において極めて重要である。そのために、分子の電場応答機構を測定することによって、ナノ秒パルス高電場による細胞内状態の変化の機構の解明にもつながることができる。

2. 研究の目的

(1) 細胞外でのタンパク質の電場効果を明らかにすることを目的として、タンパク質の分

子構造を理解する有効な手法の一つである赤外吸収分光法と高電場印加システムを組み合わせ、赤外吸収スペクトルの外部電場効果(電場変調赤外吸収スペクトル)測定システムを製作し、応用することを目指す。特に、ナノ秒パルス高電場の印加に伴う赤外吸収スペクトル変化の時間分解測定が行えるように設定する。さらに密度汎関数法などの理論計算を用いて、タンパク質の構造と振動スペクトルを対応させる。

(2) 電極間内で培養された細胞にナノ秒パルス高電場を実際に印加し、ナノ秒パルス高電場による細胞内の蛍光タンパク質、または自家蛍光を発するタンパク質などの変化について、蛍光および蛍光寿命イメージングを用いて検討する。高感度に観測するための顕微システムの改良も行う。赤外吸収の結果を用いて考察し、細胞内外におけるタンパク質の電場誘起変化について、統一的な理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) (電場印加セル) 赤外吸収スペクトルの外部電場効果の測定において、低温ガラスなどの固体中に分子を分散させた測定は数多く報告されている。しかし、液体中で観測した例は少なく、測定法は確立されていない。生体分子の電場効果を観測するためには、液体の状態での測定することが重要であり、専用の測定セルの製作をはじめに行った。製作した電場変調セルを Fig. 1 に示す。研究協力者の平松弘嗣博士の文献¹を参考にしている。

赤外透過材料として P 型ドーブシリコン板(抵抗率: 10-20 Ωcm)を用い、2 枚のシリコン板にてスペーサーを挟みこみ、その中で溶液試料が循環する構成とする。2 枚のシリコン板は真鍮製のセルホルダーによって挟みこまれる。真鍮部分に電場を印加し、赤外吸収の電場効果の測定を行う。

電場効果の測定では、電極間に電流が流れないことが最も重要である。本構成では、試料側表面は酸化処理を施し SiO_2 絶縁膜でコーティングしている。シリコン板と真鍮の接触面は、電気抵抗を小さくするためインジウム-ガリウム合金 (75.5:24.5%) を塗布している。印加電場は、最大で約 0.45 MV cm^{-1} で



Fig. 1. 電場印加用溶液セル。(左) シリコン板を真鍮セルホルダーに接着した図。(右) 真鍮セルホルダーを挟み合わせた図。

あった。

(2) (電場変調赤外吸収測定システム) Step-Scan 型 FT-IR (Blaker 製)を新たに購入し、電場変調赤外吸収測定システムの製作を行った。初めに電場印加(ON)から非印加(OFF)の差スペクトル(電場変調赤外吸収スペクトル)の測定を行い、電場による微小変化の高感度検出を目指した。現有のファンクションジェネレーター(FG)と高速電圧増幅器を用いて試料に印加する矩形波電場を発生させ、さらに FG からの TTL パルスを用いて、FT-IR との同期をとるように設定した。FT-IR の干渉計の移動鏡が停止している間に、電場 ON および OFF での透過赤外光を光起電力型 MCT 検出器によって検出する。次に FT-IR の干渉計の移動鏡を次の停止位置(サンプリング位置)まで移動し、同様の測定を行う。すべてのサンプリング位置で測定を行い、電場 ON および OFF での値をそれぞれ集めることによって、ON と OFF の透過赤外光強度のスペクトルを得ることができる。また、電極ユニットを FT-IR に設置し、試料室が密閉された状態で電場印加できるように改良した。試料室には、試料回転ステージ、赤外偏光子も導入している。

電場変調赤外吸収スペクトルの取得は、SNIFTIRS (Subtractively Normalized Interfacial FT-IR spectroscopy)方式を用いた²。SNIFTIRS では、透過光強度の比の対数を計算することで、電場変調赤外吸収スペクトルを得ることができ、バックグラウンド測定を行う必要がない。ON と OFF の測定時間の間隔を 50 μ s と非常に狭めることで、 10^{-6} オーダーの吸光度の微小変化を測定することに成功した(研究成果の項を参照)。以降、簡単のために電場変調赤外吸収を IR-EA と表記する。

時間分解測定では、現有の高速パルスジェネレーター(AVTECH 製)をナノ秒パルス電場源とし、移動鏡が停止している間に、パルス電場を試料に印加し、透過赤外光強度を得る。この測定を様々な遅延時間(電場印加と測定開始までの時間)に対して実行することによって、時間分解測定を行う。その後、次のサンプリング位置まで移動し、同様の測定を行う。すべてのサンプリング位置において時間分解測定を行った後、同じ遅延時間で測定されたデータを取りだし、時間分解赤外吸収スペクトルを得ることができる。本申請期間内では、時間分解 IR-EA スペクトルの測定までは行うことはできなかったが、マイクロ秒以下の時間分解能で時間分解赤外吸収測定が可能であることを確認した。

(3) (細胞内のタンパク質の電場効果) 細胞内のタンパク質の電場効果の測定では、培養された細胞を金電極で挟み、電場 ON および OFF での蛍光の変化を測定した。蛍光寿命イメージング測定では、時間相関光子計数法による蛍光減衰曲線および蛍光寿命画像測定を行う配置とした。さらに、高速のオシロスコープとナノ秒パルス電場発生器とを組み

合わせることによって、パルス電場印加に伴う蛍光強度の不可逆変化をサブミリ秒の時間分解能で観測するシステムを製作した。測定する培養細胞は HeLa 細胞を用いている。本申請期間内では、蛍光寿命イメージングを用いた電場効果の検討までを行うことができなかった。

4. 研究成果

(1) (脂肪酸の IR-EA スペクトル) IR-EA スペクトルでは、振動遷移に伴う電気的特性の変化(シュタルク効果)、電場による分子配向および構造の変化などを観測することができる。本研究でははじめに、配向変化およびシュタルク効果の高感度検出を目的として、基本的な脂肪酸の IR-EA スペクトルの測定を行った。シュタルク効果は、電場印加に伴う分子のエネルギー準位の微小変化であり、得られたパラメータを用いて、生体分子内の官能基周囲の極性環境(局所電場)が定量的に見積もられている³。ランダム配向における IR-EA スペクトル($\Delta A(\nu)$)は、赤外吸収スペクトルのゼロ次微分、1 次微分、2 次微分の線形結合で表すことができる³。

$$\Delta A(\nu) = (fF^2)[A' A(\nu) + B' \nu \left\{ \frac{d(A(\nu)/\nu)}{d\nu} + C' \nu \left\{ \frac{d^2(A(\nu)/\nu)}{d\nu^2} \right\} \right\}] \quad (1)$$

F は印加電場、 f は実際に分子が感じる電場の補正項となる。ゼロ次微分の項(A')は振動モードの遷移分極率変化および分子の電場による配向変化を表し 1 次微分の項(B')は電場による配向変化および振動励起に伴う分子分極率の変化などに依存する。2 次微分の項(C')は、式(2)のように振動励起に伴う双極子モーメントの変化($\Delta\mu$)に対応し、非調和定数などの情報が得られる。

$$C' = \frac{|\Delta\mu|^2 [5 + (3\cos^2 \chi - 1)(3\cos^2 \eta - 1)]}{30h^2 c^2} \quad (2)$$

χ は外部電場ベクトルと入射光電場ベクトルのなす角、 η は $\Delta\mu$ と遷移双極子モーメントのなす角である。

液体状態にあるオレイン酸の C=O 伸縮振動領域と C-H 伸縮振動領域の IR-EA スペクトルを Fig. 2A と 2B にそれぞれ示す。IR-EA の吸光度は 10^{-6} であり、本システムを用いて 10^{-6} オーダーの微小な電場変化まで観測できることがわかる。C=O 伸縮および C-H 伸縮振動バンドそれぞれにおいて、IR-EA の吸光度は電場の 2 乗に比例し、式(1)を再現していることを確認した。

C=O 伸縮バンドの IR-EA スペクトルは、吸収スペクトルの 2 次微分の寄与が支配的であり、振動励起に伴う双極子モーメントの寄与が大きいことがわかる。鎖長の短いノナン酸についても、2 次微分の寄与が大きな C=O 伸縮バンドの IR-EA スペクトルを得ることがで

きた。実際に両脂肪酸の C=O 伸縮バンドの IR-EA スペクトルにおいて、赤外吸収スペクトルのゼロ次、一次、二次微分の線形結合にて再現した(式(1)を参照)。ゼロ次、一次微分の係数は、値が小さいために、明瞭な電場強度依存性は得られなかったが、二次微分の係数は電場の 2 乗に比例し、得られた係数より、オレイン酸とノナン酸の C=O 伸縮バンドの $|\Delta\mu|$ 値は、ともに $0.04\text{--}0.05\text{ D/f}$ と見積もられ、両脂肪酸において顕著な差はなかった。

CH 伸縮バンドについては、バンド分解を行い、メチルおよびメチレンの対称、逆対称伸縮振動などそれぞれの振動での値を求めた。CH₂ 逆対称伸縮振動の $|\Delta\mu|$ 値は、両脂肪酸ともに $0.02\text{--}0.03\text{ D/f}$ と見積もられた。

$|\Delta\mu|$ 値は非調和性を反映しており、両脂肪酸において非調和性に大きな違いはないことがわかる。また、電荷の偏りの大きさに反して、C=O 伸縮と CH₂ 逆対称伸縮の $|\Delta\mu|$ についても、それほど大きな違いはなかった。CH₂ 逆対称伸縮の非調和定数が C=O 伸縮よりも大きいことが予想され、倍音測定などを用いて、非調和定数の違いについて現在検討している。本研究成果について、原著論文として現在とりまとめを行っている。

今後の展開として、シリコンではなくゲルマニウム板をセル材料として用い、測定波数範囲の拡大を行った。また極微量電流による熱効果が定量性を低下させており、絶縁材の検討を行っている。実際のタンパク質に適用するために、アルコールや水の赤外吸収の電場効果の実験も行っているが、上述の極微量電流による熱効果によって、定量的な段階には未だ至っていない。イオン液体を用いた IR-EA の測定、およびタンパク質薄膜などの

実験も検討している。

(2) 細胞内のタンパク質の電場効果について、電場印加前後の差のみではなく、ナノ秒パルス電場の印加に伴う構造・環境変化の進行ダイナミクスを直接観測することを目的として、不可逆過程を時間分解で観測する顕微蛍光システムの製作を行った。光電子増倍管と 500 MHz のオシロスコープを組み合わせ、数 100 ms の時間分解能で観測するシステムを製作した。このシステムを Ca²⁺ 検出試薬によって染色された HeLa 細胞に応用し、ナノ秒パルス電場の印加に伴う細胞内の Ca²⁺ 濃度の増加過程を観測することができた。細胞内にある蛍光タンパク質の外部電場効果などに応用することを計画している。

(3) タンパク質の二次構造を決定するペプチド結合面同士の二面角について、赤外吸収スペクトルを用いて解析する方法を提案した。ペプチドの連続した二残基を ¹³C=¹⁸O に同位体ラベルを行うことによって、ペプチドのアミド I 赤外吸収バンドはダブルレットとなる。このダブルレットの振動数差と強度比から、二面角を見積もることができる。実際に二面角を見積もられているペプチドに対して、二残基のラベル化を行い、実測のアミド I バンドのダブルレット値と理論計算との比較を行った。理論計算では振動解析に用いられる GF 行列法をもとに行い、非対角項については、遷移双極子相互作用を取り入れている。外部電場の印加に伴うペプチドの構造変化について、本手法は有効であると考えられる。

(4) 赤外吸収と同じ振動分光法であるラマン分光法を用いた生体分子の電場効果についても検討した。タングステンワイヤーを用いた金電極内にタンパク質微結晶を置き、顕微ラマンシステムを用いて電場効果を観測した。リゾチームなどの基本的なタンパク質について、電場印加に伴うスペクトル変化を観測することができた。定量性の向上のために、微結晶ではなく単結晶でラマンスペクトルの電場効果を観測するシステムを検討している。

引用文献

1. H. Hiramatsu, et al., *Appl. Spectrosc.* **2004**, 58, 355.
2. S. Pons, et al., *J. Electroanal. Chem.* **1984**, 160, 63.
3. S. D Fried, et al., *Science* **2014**, 346, 1510.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

Takakazu Nakabayashi,

Application of Spectroscopic and

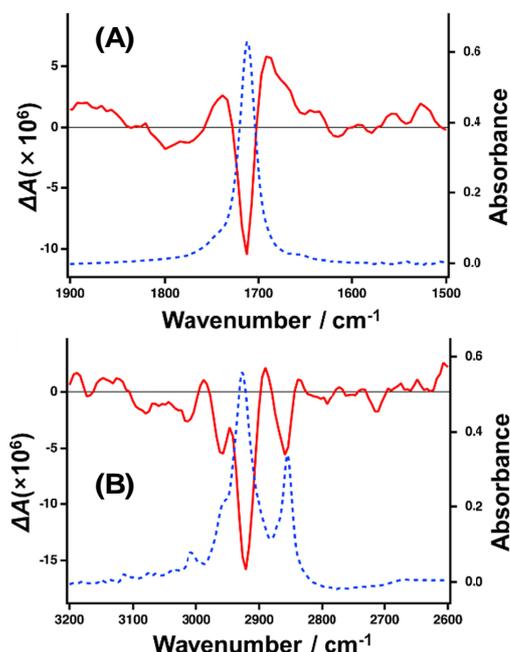


Fig. 2. オレイン酸の(A) C=O 伸縮振動領域と(B) C-H 伸縮振動領域の IR-EA スペクトル (赤実線: IR-EA スペクトル、青点線: IR スペクトル)。

Photochemical techniques to Nanomedicine
(Invited talk),
10th Anniversary International Symposium
on Nanomedicine,
2016. 11. 24-26, Tsukuba (AIST)

堀井 湧介, 平松 弘嗣, 中林 孝和,
ナノ秒パルス電場による細胞内応答の
顕微ラマン・蛍光分光法を用いたその場
観測,
第 54 回日本生物物理学会,
2016. 11. 25-27,
つくば (つくば国際会議場)

中林孝和,
分子科学的手法を用いた細胞・
タンパク質計測 (招待講演),
最先端計測とライフサイエンスの
近未来, 2016. 11. 12,
仙台 (東北大学)

小林 祐輝, 蓮沼 直樹, 平松 弘嗣,
中林 孝和,
Step-Scan FT-IR を用いた赤外電場吸収
測定システムの開発,
第 10 回分子科学討論会 2016. 09. 13-15,
神戸 (神戸ファッションマート)

中林孝和,
光分子科学的手法を用いた細胞計測・
制御の展開 (招待講演),
第 38 回日本光医学・光生物学会,
2016. 07. 22-23,
京都 (京都リサーチサイエンスホール)

Takakazu Nakabayashi,
Application of Molecular Spectroscopy to
Biological Sciences (Invited talk),
Recent Progress in Molecular Spectroscopy
and Dynamics,
2016. 07. 07-09, Fukuoka (Kyushu Univ.)

平松 弘嗣, 岡部 仁美, 中林 孝和,
二面角解析のための連続 2 残基 ^{13}C , ^{18}O
ラベル赤外吸収分光法の開発,
第 43 回生体分子科学討論会,
2016. 06. 24-25, 名古屋 (名古屋大学)

平松 弘嗣, 岡部 仁美, 中林 孝和,
連続 2 残基 ^{13}C = ^{18}O ラベルによるヘリッ
クス主鎖構造二面角解析,
第 9 回分子科学討論会 2015. 09. 16-19,
東京 (東京工業大学)

中林孝和,
分子科学の細胞内への展開 (招待講演),
森野 Discussion, 2015. 08. 31,
東京 (東京大学)

磯卓磨, 平松弘嗣, 齋藤隆寛, 中林 孝和,

ラマン分光法を用いた生体分子の高感
度測定技術の発展,
平成 27 年度日本分光学会年次講演会,
2015. 06. 01-03,
東京 (東京工業大学)

〔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〕

(公開講座) (計 1 件)

中林孝和
光を用いた最新の研究成果の紹介
仙台西ロータリークラブ特別講演
2015. 11. 20, 仙台 (ウェスティンホテル)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中林 孝和 (NAKABAYASHI, Takakazu)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 30311195

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小杉 健太郎 (KOSUGI, Kentaroh)
福岡教育大学・理科教育講座・准教授
研究者番号: 70380376

(4)研究協力者

平松 弘嗣 (HIRAMATSU, Hirotsugu)
台湾交通大学・応用化学科・助理教授

梶本 真司 (KAJIMOTO, Shinji)
東北大学・大学院薬学研究科・講師

黒井 邦巧 (KUROI, Kunisato)
東北大学・大学院薬学研究科・助教