

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03891

研究課題名(和文) 超高強度コヒーレントテラヘルツ光による生体高分子コンフォメーション制御への挑戦

研究課題名(英文) Challenge of controlling conformation of proteins using intense THz-radiations

研究代表者

野竹 孝志 (Notake, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究センター・研究員

研究者番号：70413995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は生命活動を維持する為に極めて重要な役割を担っているが、タンパク質が発現する生体機能はペプチド結合ではなく、3次元的な立体構造(コンフォメーション)に強く依存する。タンパク質がコンフォメーションを形成・変化させる際には巨視的な協同運動である、低周波振動モードが関与していると考えられている。本研究では高強度コヒーレントテラヘルツ光による低周波振動モードの強励振による制御を目指した。

アルブミンタンパクに対して高強度テラヘルツ光を照射し、蛍光及び円偏光二色性計測によりコンフォメーション変化を調べた結果、初期実験においてその変化を示唆するデータが得られた。今後より厳密な検証に取り組む。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質のコンフォメーションは、タンパク質が発現する固有の生体機能と直接関係しており、極めて重要な研究対象である。本研究が成功すれば、アルツハイマーや筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病などのコンフォメーション病と呼ばれる様々な神経性難病の原因究明や治療法の開発に役立つ事は間違いない。更に、タンパク質のコンフォメーション状態と機能の関係理解の深化や、全く新しい機能を有するタンパク質の開発等にも貢献すると考えられ、医療や生命科学の分野に革新的な成果をもたらす事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Proteins play an important role extremely to sustain vital activities. Because their biological functions strongly depend on conformation structure, development of control methods for protein conformation has become important and hot topic recently. Low frequency collective mode is thought to be an essential vibration when proteins change their conformation under thermal energy fluctuation and their vibrational frequencies are present in terahertz region. Therefore, there is a possibility that terahertz wave can excite the low frequency collective mode and influence the conformational structure. We investigated an effect of terahertz wave irradiation to BSA samples. slight spectrum differences in circular dichroism and fluorescence were observed for irradiated and unirradiated samples. In order to measure effects of terahertz wave irradiation to proteins more directly and clearly, real time fluorescence measurement system is under development.

研究分野：テラヘルツ光学

キーワード：タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質等の生体高分子は、生命活動を維持する為に極めて重要な役割を担っているが、タンパク質が発現する生体機能は1次構造であるペプチド結合ではなく、3次元的な立体構造(コンフォメーション)に強く依存する。従来の生物学的アプローチでは、これらコンフォメーション構造とタンパク質が発現する機能の関係を明らかにすることが主題であり、積極的にコンフォメーションを制御してその機能変化を調べたり、新たな機能が発現させるといった研究は殆ど行われていない。

タンパク質がコンフォメーションを形成・変化させる際には、タンパク質のほぼ全ての分子が関与する巨視的な協同運動である、低周波振動モードが関与していると考えられている[1-3]。こうした低周波振動モードの振動はテラヘルツ (THz) 周波数帯領域に存在しており、本研究ではこの点に着目し、高強度コヒーレントテラヘルツ光による制御を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、近年、我々のグループが開発した超高強度かつ周波数可変なコヒーレントテラヘルツ光源を用いて、タンパク質のコンフォメーション形成に本質的役割を担っている低周波協同振動モードを共鳴的に強励振し、熱揺らぎを超えてタンパク質のコンフォメーション遷移を誘起し、更にはその制御に挑戦する事である。また、高強度テラヘルツ光の大振幅電場は、コンフォメーション遷移やその安定性を支配している分子間ポテンシャル構造を劇的に歪ませる事も期待できる。これらの効果を通じて、コヒーレントな高強度テラヘルツ光照射により、タンパク質のコンフォメーションに影響を与えられる可能性は充分にある。

### 3. 研究の方法

本研究においては、まず初めに既存テラヘルツ光源の最適化を目指した。シミュレーション等によるとタンパク質の多くの低周波協同振動モードは、0.3~2 THz 辺りの低周波数領域に存在していると考えられている。当研究チームが開発した光注入型高強度テラヘルツパラメトリック光源の周波数可変範囲は1~3 THz 程度であり、この既存光源をベースとして、発生可能な周波数帯をより低周波側に拡張する事で、本研究の目的の為に最適化する。その為にマイクロチップレーザーからの励起光と、外部共振器半導体レーザーからの注入光エネルギーを増幅器を用いて増幅し、既存光源に比べてパワー密度は保持したまま、ビーム径を拡大してニオブ酸リチウム結晶へ入射する。これにより結晶内における励起光と注入光、波長の長いサブテラヘルツ光との相互作用体積が増大し、低周波側のテラヘルツ出力増大が期待できる。

また、テラヘルツ光照射により、本当にタンパク質のコンフォメーション変化に影響を与えることが可能であるかも理論的に検討し、その条件を明確にする事を目指した。こうした光源の最適化及び理論的な検討を行った上で、実際にタンパク質試料を用意し、高強度テラヘルツ光照射実験を行い、蛍光計測や紫外円偏光二色性計測などによりコンフォメーション変化の有無を調べる。

### 4. 研究成果

まず光源を最適化するために、マイクロチップレーザーからの励起光を YAG 増幅器を用いて 10mJ/pulse まで増幅した。また、外部共振器半導体レーザーからの注入光エネルギーも Yb ファイバー増幅器を用いて最大 5W まで増幅し、励起光、注入光ともにパワー密度は保持したまま、ビーム径を拡大してニオブ酸リチウム結晶へ入射した。これにより結晶内における励起光と注入光、波長の長い低周波数テラヘルツ光との相互作用体積が増大し、低周波領域の出力が 10 程増大する事を確認した。

次に実験的検証を行う前に、簡単なモデルを仮定して我々のテラヘルツ光源によりコンフォメーション変化誘起が本当に可能であるかの理論的検討も行った。タンパク質分子 1 mol の室温 300 K における熱エネルギー揺らぎは、例えばタンパク質分子 1 個の質量を  $5 \times 10^{-20}$  g、定圧比熱を  $1.3 \text{ JK}^{-1}\text{g}^{-1}$  と仮定すると約  $1.6 \times 10^5 \text{ J/mol}$  程度となる[4]。当然、熱揺らぎは等方的であり非選択的であるため、平均的なタンパク質系の振動、回転、ねじれ等の内部自由度を  $10^5$  程度と考えると、これらに  $1.6 \times 10^5 \text{ J/mol}$  を割り振れば、1 自由度あたり  $1.6 \text{ J/mol}$  程度の熱揺らぎである。更に現実的な実験条件として 1mg のアルブミンタンパク(分子量 66,000) を考えると、1 自由度あたり 24 nJ の熱揺らぎとなる。一方で、我々の開発したテラヘルツ光源は最大 10  $\mu\text{J}$  のパルスエネルギーを有し、かつコヒーレントで周波数可変である為、選択的な振動モード励振が可能である。従って我々の開発した高強度テラヘルツ光源を用いて、タンパク質の熱揺らぎを超えてコンフォメーション変化を誘起できる可能性は充分にあるとの結論に至った。しかしながら、現実にはテラヘルツ光によりコンフォメーションが変化したとしても、熱ゆらぎにより直ぐに緩和してしまう可能性もある。実際にタンパク質のコンフォメーション変化の時定数は、マイクロからミリ秒程度と

考えられており、照射の影響を実時間で観測する工夫が必要である。

次に、ウシ血清由来のアルブミンタンパク質を用いて実際にテラヘルツ光照射実験を行った。テラヘルツ光は水の吸収が極めて強いために、通常の水環境下での実験ではタンパク質に吸収される前にテラヘルツ光がかなり減衰してしまうと考えられる。そのために凍結乾燥したアルブミン粉末試料を使用した(図1)。凍結乾燥試料であっても内部の結合水はほとんど残っており、タンパク質は結合水を利用してコンフォメーション変化を起こす事は可能であると考えられる。これらアルブミンタンパク質に対して高強度テラヘルツ光を照射したサンプルと照射しないサンプルに対して、蛍光計測および円偏光二色性計測によりコンフォメーションの変化を調べた。これらの結果を図2(a),(b)にそれぞれ示す。テラヘルツ光照射により蛍光強度のクエンチが観測されており、アルブミンの蛍光特性は、構成アミノ酸であるトリプトファン残基近傍分子群の状態を反映していると考え、蛍光スペクトルの変化はコンフォメーション変化を反映している可能性がある。また、円二色性信号にも強度変化が観測された。照射により強度が減少していることから、二次構造であるアルファヘリックスが減少、或いはベータシート以外の他の構造へ変化した可能性が示唆される。これらの実験においては、テラヘルツ光の照射平均パワーはわずか25 $\mu$ Wであることから、熱的影響とは考えにくい。しがしながらスペクトルの周波数シフト等は観測できておらず、テラヘルツ光照射により明確にコンフォメーションが変化したとも断言できない。そこでテラヘルツ光照射の影響をよりダイレクトに調べるために、蛍光信号を実時間計測するシステムを現在開発中である。また、アルブミンよりも分子量の小さいコピキチンなどを対象とすることも有益であると考えられ、今後も研究を続ける。



図1. 粉末アルブミン試料

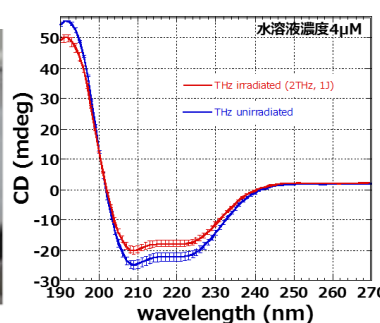


図2. 蛍光スペクトル

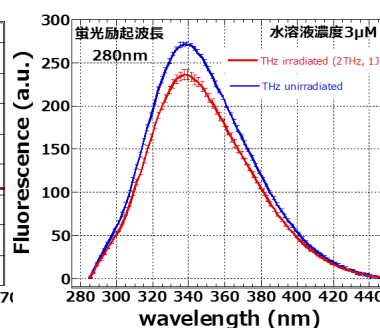


図3. 円二色性スペクトル

#### <引用文献>

- [1]. K. Moritsugu, O. Miyashita, and A. Kidera, Phys. Rev. Lett. 85, 3970 (2000).
- [2]. Aihua Xie, Alexander F. G. et al., Phys. Rev. Lett., 018102, 88, No.1 (2002).
- [3]. O. P. Cherkasova, V. I. Fedorov, et al., Optics and Spectroscopy, vol.107, No.4, pp.534-537 (2009).
- [4]. 永山国昭、生体分子の内部運動、蛋白質核酸酵素別冊 No.28 (1985).

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計3件)

1. Takashi Notake, Kaori Kamata, Tomokazu Iyoda, Chiko Otani, Hiroaki Minamide “Expression of Various Polarization Effects by using Spirulina-Templated Metal Micro-Coils at Terahertz Frequency Region”, JJAP, vol. 58, 032007 (2019). 査読有
2. CYRIL BERNERD, PATRICIA SEGONDS, JÉRÔME DEBRAY, TAKASHI NOTAKE, MIO KOYAMA, HIROAKI MINAMIDE, HIROMASA ITO, AND BENOÎT BOULANGER “Quadratic nonlinear optical properties of the organic N-benzyl-2-methyl-4-nitroaniline (BNA) biaxial crystal” Optics Letters. **43**, No. 8 pp.1818-1821 (2018). 査読有
3. 小山美緒, 野竹孝志, 伊藤弘昌, 南出泰亜, “非位相整合第二高調波発生による光学結晶の品質計測と非線形係数相対評価”, レーザー研究, **45**, No.12, pp.773-778, (2017). 査読有

##### [学会発表](計3件)

- [1]. T. Notake, T. Iyoda, K. Kamata, Chiko Otani and Hiroaki Minamide, “THz near-field microscope measurement of spirulina-templated metal micro-coils”, 19th East Asia Sub-millimeter-wave Receiver technology workshop, 11-13, Dec. 2018, Nishinomiya, Japan.

- [2]. T. Notake and H. Minamide, “Nonlinear organic materials of DAST and BNA developing THz-wave region”, Invited talk, 3rd International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (ICEAN), 30th October - 2nd November 2018. Newcastle, Australia.
- [3]. Takashi Notake, Kouji Nawata, Yu Tokizane, Yuma Takida, Zhengli Han, Mio Koyama, Hiroaki Minamide, “Development of Mueller Stokes Polarimeter Toward Detailed Analysis of Complicate Polarizing Devices in Terahertz Frequency Region”, Proceeding of 41st International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz waves, (2016).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号 (8 桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。