

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20350007

研究課題名（和文） タンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピング

研究課題名（英文） Spatiotemporal mapping of energy dissipation in proteins

研究代表者

水谷 泰久 (MIZUTANI YASUHISA)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60270469

研究成果の概要（和文）：タンパク質中の活性部位に発生した余剰エネルギーは、活性部位から周囲のタンパク質部分へと伝わり、タンパク質内を散逸する。タンパク質内のエネルギー散逸過程を実験的に観測することは難しく、その機構は現在のところほとんどわかっていない。われわれはアンチストークスラマンバンド強度が分子の余剰エネルギーの大きさを反映することを利用して、エネルギー散逸過程を観測することを試みた。その結果、チトクロム c およびミオグロビンについて、アミノ酸残基単位でエネルギーの流れをとらえることに初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：Excess energy generated in an active site in proteins transferred to and dissipates in the protein moiety. No direct observation of the energy migration within protein moiety has not been reported because it is difficult to perform the observation. Ultraviolet resonance Raman (UVR) spectroscopy can selectively monitor Raman bands of aromatic amino acid residues, such as tryptophan, tyrosine and phenylalanine. Anti-Stokes Raman intensity reflects the population in vibrationally excited states. Therefore, anti-Stokes UVR intensity can be a direct probe of vibrational energy of residues in a protein. In this study, we succeeded in observing the vibrational energy migration in photoexcited heme proteins by using anti-Stokes UVR spectroscopy

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：エネルギー移動、共鳴ラマン分光法、時間分解分光法

1. 研究開始当初の背景

熱伝導は、最も基本的な物理化学過程のひとつである。一般にバルクのスケールにおいては、熱伝導はフォノンの概念を用いて理解されている。しかし、分子のスケールの現

象に対して、このような熱拡散の概念を適用することはできない。このスケールにおいては、「熱伝導」は振動モードを経由した分子内・分子間エネルギー移動として取り扱う必要がある。

分子スケールでの伝播過程として重要なもののひとつに化学反応における余剰エネルギーの散逸過程がある。液相中の反応においては、余剰エネルギーが反応分子および溶媒分子の自由度のなかで反応性モードと非反応性モードにどのように分布しているかが反応速度や反応経路を決定する鍵となる。したがって、タンパク質で起きる化学反応、特に光化学反応（光異性化、光誘起電子移動、光解離反応）などの超高速反応の理解のためには、タンパク質内のエネルギー散逸機構の解明が必須である。活性部位や発色団で起きる化学反応に対して、反応余剰エネルギーがタンパク質の中をどのような経路で、どのような機構で散逸するかは现阶段ではほとんどわかっていない。また、タンパク質内のエネルギー散逸の理解は、多自由度を有する分子であるタンパク質の物理的実体を理解するうえでも重要である。これらの問題の理解のためには、エネルギーの散逸過程を部位特異的かつ実時間で定量的に観測する実験研究が求められている。

2. 研究の目的

われわれのグループは、ピコ秒時間分解可視共鳴ラマン分光法を用いて、タンパク質中のヘムのアンチストークスラマンスペクトルを測定し、振動エネルギー緩和を観測することに成功した (Y. Mizutani and T. Kitagawa, *Science* 278, 443-446 (1997))。これは、ヘムタンパク質の反応に伴うヘムのエネルギー緩和を初めて観測したものとして意義深い。その後、この研究はタンパク質の理論研究者の興味を触発し、これが契機となりヘムタンパク質のエネルギー緩和に関する多くの理論研究が報告された。横市大の木寺らや Princeton University の Austin らはエネルギー緩和の理論モデルを提唱した (K. Moritsugu et al., *Phys. Rev. Lett.*, 85, 3970-3973 (2000); A. Xie et al., *Phys. Rev. Lett.*, 84, 5435-5438 (2000))。また、名大の長岡らや Boston University の Straub らは、ヘムプロピオン酸基がヘムのエネルギー緩和に重要な経路になっているというモデルを提案し、(I. Okazaki et al., *Chem. Phys. Lett.*, 337, 151-157 (2001); L. Bu and J. E. Straub, *J. Phys. Chem. B*, 107, 10634-10639 (2003))。このモデルはわれわれによって最近検証された (M. Koyama et al., *Chem. Phys. Lett.*, 430, 404-408 (2006); Y. Gao et al., *Chem. Phys. Lett.*, 429, 239-243 (2006))。以上のように、ヘムからのエネルギー放出過程に関してはその機構が明らかになりつつある。一方、ヘムからタンパク質部分に放出されたエネルギーが、タンパク質内をどのように散逸するかを調べた実験研究は皆無であり、散逸過程を時空間分

解して観測することは、実験研究のチャレンジングな課題として残されている。本研究課題では、アミノ酸残基の時間分解アンチストークスラマンスペクトル測定によって、タンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピングに挑戦する。

3. 研究の方法

本研究では、タンパク質内のエネルギー散逸機構を明らかにするために、時間分解共鳴ラマン分光法を用いてタンパク質の各部位の振動励起状態を選択的に観測する。ここで共鳴ラマン分光法の特色を説明する。共鳴ラマン分光法は、ラマン散乱の励起に分子の吸収帯に波長を合わせることによって、散乱光強度が 10^4 - 10^6 倍強くなるという現象を利用した振動分光法の一つである。散乱光の強度増大は電子遷移に関わる分子団のみに起きるので、巨大な分子を測定対象としていても、特定の一部の振動スペクトルのみを選択的に観測することができる。タンパク質は、220-300 nm の領域に芳香族アミノ酸残基に由来する吸収帯をもつ。したがって、220-300 nm の紫外光を用いると、芳香族アミノ酸残基の共鳴ラマンスペクトルが選択的に得られる。また、アンチストークスラマン散乱光の発生は振動励起状態に特有の現象であるので、その強度から振動励起分布、すなわち残基がもつ余剰エネルギーの大きさを求めることができる。さらに、光化学反応後の共鳴ラマンスペクトルを時間分解測定することによって、この測定をタンパク質の各部位に対して行えば、エネルギーの流入・流出を実時間測定することができる。赤外分光法では、水の吸収のため、広い振動数領域でスペクトルを測定することは難しいのに対して、共鳴ラマン分光法ではそのような問題はない。本研究では、共鳴効果によってタンパク質の局所的な情報がシャープに得られる、アンチストークスバンド強度から振動励起状態に関する情報が得られる、という共鳴ラマン分光法の長所を最大限に活かして研究を展開する。

4. 研究成果

(1) 酸化形チトクロム c を用いた研究

まず、本手法によってアミノ酸残基の振動励起状態が観測できるかのテスト測定として、ヘムタンパク質のひとつであるチトクロム c を用いて、タンパク質中エネルギー散逸の直接観測を試みた。チトクロム c を選んだ理由は、トリプトファン残基が一つのみであり、タンパク質内で一つの残基を選択的に観測できること、また、酸化形チトクロム c は光反応をほとんど起こさないことが知られているためである。

酸化形チトクロム c のアンチストーク

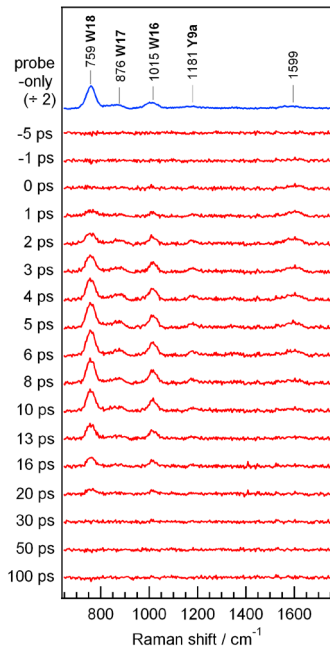


図 1. 酸化形チトクロム c の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトル。一番上のスペクトルは、プローブ光のみで測定したアンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトルを 1/11 の強度で表示したものである。その他のスペクトルは、時間分解差スペクトルである。

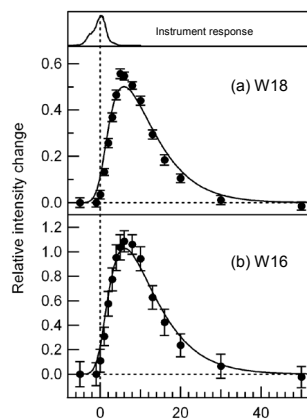


図 2. バンドの面積強度の時間変化。(a)W18 バンド、(b)W16 バンド。ドットは、各遅延時間のバンド強度を表す。遅延時間・5 から 50 ps のものを表示してある。縦軸の強度は、プローブ光のみで測定したスペクトルのラマンバンドに対する、時間分解差スペクトルのラマンバンドの増加量を表す。

ス時間分解紫外共鳴ラマン (UVRR) 測定の結果を図 1 に示す。図 1 のスペクトルは、時間分解スペクトルからプローブ光のみで測定したスペクトルを差し引いた差スペクトルである。差スペクトルの計算は、内部強度標準として入れた硫酸イオンのバンド強度を基準にして行った。スペクトルには強いバンドが、 756 cm^{-1} と 1009 cm^{-1} に観測され

た。これらはともにトリプトファン残基によるもので、それぞれ W18 と W16 バンドに帰属できる。図 2 に、W18 バンド強度の時間変化を示す。W18 バンド強度の増大と減少の時定数はそれぞれ、 $5.6 \pm 1.4 \text{ ps}$ と、 $5.6 \pm 1.4 \text{ ps}$ と求められた。W18 バンド強度の増大は、ヘムからトリプトファン残基への振動エネルギーの流入に、W18 バンド強度の減少は、トリプトファン残基から周囲のアミノ酸残基への振動エネルギーの流出に対応していると考えられる。また、時間分解アンチストークス可視共鳴ラマンスペクトルにおいて、ヘムのアンチストークスラマンバンド (v_4 バンド) 強度の変化が観測された。 v_4 バンド強度の減少の時定数は、 $1.5 \pm 0.1 \text{ ps}$ と求められた。 v_4 バンド強度の減少は、ヘムの振動エネルギー緩和過程に対応していると考えられる。

以上のように、時間分解アンチストークス UVRR 測定によって、タンパク質内のエネルギー移動をとらえることに初めて成功した。チトクロム c のトリプトファン残基は、ヘムのプロピオン酸基に隣接しているため、ヘムから直接エネルギーを受け取る可能性が高いと考えられる。しかしながら、今回求められたヘムのバンド (v_4 バンド) 強度の減少の時定数 ($1.5 \pm 0.1 \text{ ps}$) と、トリプトファン残基のバンド (W18 バンド) 強度の増大の時定数 ($5.6 \pm 1.4 \text{ ps}$) は一致しなかった。このことから、 v_4 モードのエネルギーが直接 W18 モードに伝わっているのではなく、別のモード、すなわち、ヘムの v_4 以外のモードあるいは、トリプトファン残基の W18 以外のモードを介して、W18 モードに伝わっていると考えられる。デオキシ形ミオグロビンについては、溶媒 (水) へのエネルギー散逸が水の温度上昇として観測されている (T. Lian, et al. *J. Phys. Chem.* 98, 11648-11656 (1994))。溶媒の温度上昇には二つの成分があり、速い成分の時定数は $7.5 \pm 1.5 \text{ ps}$ 、遅い成分は、およそ 20 ps と求められている。チトクロム c とミオグロビンは、いずれも球状タンパク質で、大きさも同程度であることから、チトクロム c の場合も近い値の時定数で水へのエネルギー散逸が起きると考えられる。トリプトファンからのエネルギー流出の時定数として得られた 5.6 ps という値は、水の温度上昇の時定数より小さく、ヘム→タンパク質→水と、エネルギーが伝搬していることと矛盾しない。

(2) メト形ミオグロビンを用いた研究

チトクロム c を用いたテスト測定から、本手法の有用性が実証された。そこで次に、ミオグロビン変異体を用いた、エネルギー散逸の時空間マッピングを試みた。ミオグロビンを用いた理由は、ヘムの光励起に対して安

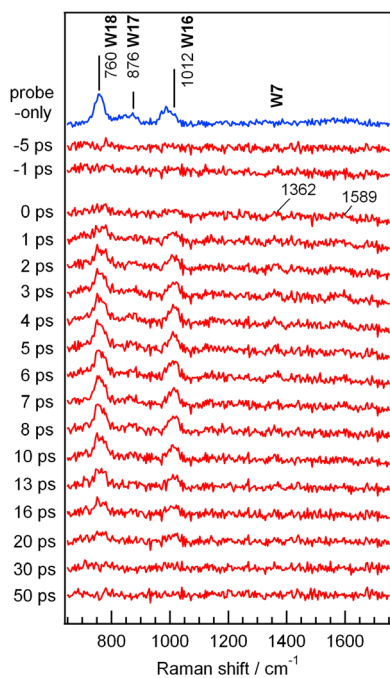


図 3. V68W 変異体の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトル。一番上のスペクトルは、プローブ光のみで測定したアンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトルを(a)ではそのままの強度で表示したものである。その他のスペクトルは、時間分解差スペクトルである。

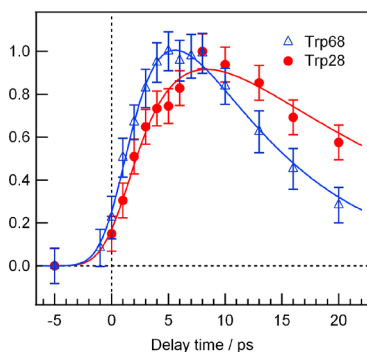


図 4. Trp68 と Trp28 の W18 バンドの面積強度変化の比較。縦軸の強度は、それぞれの強度変化において、最も強い値で規格化した値である。

定であること、変異体も含めタンパク質の立体構造が X 線結晶構造解析から詳細に調べられていること、大腸菌中の発現によって比較的大量にタンパク質試料が調製可能であるためである。

試料には、立体構造が詳細に調べられているマッコウクジラ由来のミオグロビンを用いた。このミオグロビンにはトリプトファンが 2 残基含まれているため、まずこれらをラマン散乱強度の弱いチロシン、フェニルアラニンに置換した変異体を作製した。その際、大腸菌での発現量が著しく低下したため、ベクターの交換、培養条件の最適化を行った。

これによって、収量を約 10 倍に改善することができた。この変異体にトリプトファン残基を 1 残基導入し、ヘムからトリプトファン残基への振動エネルギー移動を、トリプトファン残基の時間分解アンチストークス共鳴ラマンスペクトルによって観測した。ヘムから同じ方向で、かつ距離の異なった位置にトリプトファンを導入した変異体 2 種、V68W および I28W 変異体、を作製し、ヘムからのエネルギー伝搬について、距離依存性を調べた（ヘムからトリプトファン残基までの距離は、それぞれ約 6 および 12 オングストロームである）。変異体の作成には、はじめに Trp 残基を含まないミオグロビン変異体 (W7Y/W14F) のプラスミドを作成した。これをテンプレートにして、68 番目のバリンあるいは 28 番目のイソロイシンを Trp 残基に置換し、Trp 残基を一つだけ含むミオグロビン変異体を作成した。それぞれ V68W、I28W 変異体と記す。それぞれの変異体の Trp 残基は、ヘムからの方向が同じで、I28W 変異体の Trp 残基の方が約 2 倍ヘムとの距離が離れている。

変異体 (V68W) の時間分解アンチストークス UVRR スペクトルを図 3 に示す。図 4 は、760 cm^{-1} にみられる W18 バンド強度の時間変化を示している。縦軸の強度は、V68W 変異体の 5 ps でのバンド強度で規格化したものである。バンド強度の増加は、Trp 残基へのエネルギーの流入に、バンド強度の減少は、Trp 残基からのエネルギーの流出に対応していると考えられる。図中の実線は、関数 $A[\exp(-t/\tau_{\text{rise}}) - \exp(-t/\tau_{\text{decay}})]$ と、装置応答関数とをコンボリュートした関数をあてはめた結果である。バンド強度の増加と減少の時定数は、V68W 変異体では 3.0 ps、9.6 ps と、I28W 変異体では 4.0 ps、19 ps と、求められた。また、28 番目の位置には、68 番目の位置の約 1/3 のエネルギーが到達していることが分かった。熱源からの距離が離れると、観測サイトでのエネルギーの伝達速度が遅くなるということ、および余剰エネルギー量が低下するということは、熱拡散の考え方と矛盾しない。しかし、二種類の変異体の測定結果それぞれに、熱拡散方程式から得られた関数を当てはめると、同一のパラメーターでは表現できなかった。これはナノメートル前後のマイクロな範囲でのエネルギー伝達を考える際、一般的な熱拡散方程式では、その挙動を適切に表現できないことを示唆している。

本研究は、反応サイトと観測サイトの相対位置を固定し、エネルギーの移動を直接観測した最初の例である。この観測の成功によって、本研究の手法が、エネルギー伝達の解明に極めて有効であることを示すことができた。

(1)、(2)で述べた成果は、それぞれ投稿論文として現在まとめている段階である。

研究者番号：

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)

[学会発表] (計 5 件)

① 藤井直樹、Direct observation of vibrational energy migration within protein moiety by using time-resolved anti-Stokes ultraviolet resonance Raman spectroscopy、Pacifichem 2010, 平成 22 年 12 月 17 日, Honolulu, Hawaii, USA

②水谷泰久、Elucidation of ultrafast protein dynamics by picosecond time-resolved visible and ultraviolet resonance Raman spectroscopy、Pacifichem 2010, 平成 22 年 12 月 16 日, Honolulu, Hawaii, USA

③藤井直樹、「タンパク質中エネルギー散逸の直接観測：チトクロム c を用いた研究」、第 3 回分子科学討論会 平成 21 年 9 月 24 日、名古屋大学 (名古屋)

④水谷泰久、Primary protein responses of after ligand dissociation and chromophore isomerization: time-resolved resonance Raman studies、Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics、2 平成 21 年 8 月 5 日、Telluride, Colorado, USA

⑤ 藤井直樹、Direct observation of vibrational energy migration within protein of photoexcited cytochrome c、特定領域研究「分子高次機能解明のための分子科学」第 3 回公開シンポジウム 平成 21 年 6 月 4 日、東京工業大学 (東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/mizutani/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 泰久 (MIZUTANI YASUHISA)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60270469

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()