

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号： 14401  
 研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2009 年度 ~ 2011 年度  
 課題番号： 21740230  
 研究課題名 (和文) レーザー光を導入した NMR 測定装置を用いた蛋白質ダイナミクス測定  
 研究課題名 (英文) The analysis of protein dynamics by using NMR with induced laser  
 研究代表者 濱田 格雄  
 (HAMADA NORIO)  
 大阪大学産学連携本部特任講師  
 研究者番号： 80379148

## 研究成果の概要 (和文)：

目的とする光受容蛋白質の動きに合わせた形でのレーザー同期の NMR 測定には成功しなかった。しかし、NMR 装置への光導入には成功し、光スイッチング分子の測定などで成果を挙げた。光受容蛋白質のモデル化合物測定では、分子内水素結合の重要性を明らかにした。蛋白質測定では、現在も研究を継続中である。NMR 装置更新に伴い現在使用不可能であるが、大阪大学理学研究科の協力を得て光導入した形での NMR 測定が可能になった。

## 研究成果の概要 (英文)：

We developed NMR system installed laser light at Osaka university. This NMR system was characterized the properties of molecules such as light-switching and light-active ones. In the research of Photoactive Yellow Protein (PYP, blue light photoreceptor protein) active-center model compounds, we reported that the intramolecular hydrogen bonds played an important role in its photoreaction and color regulation. In the investigations of light-switching molecules, we have assigned the signals related to light-induced conformational changes from obtained NMR data. Based on these results, we tried to apply the measurement of photoreceptor protein in order to research light-induced conformational changes. We also planned to install infrared laser lights into the NMR equipment in order to analyze the protein dynamics by inducing the perturbation of specified vibrational modes with IR laser. However, in this time, the light-induced conformational changes of photoreceptor protein were not able to be analyzed by this system and we couldn't develop the proper IR laser and installation system. Now we have continued to measure photoreceptor proteins and analyzed data.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000 円	450,000 円	1,950,000 円
2010 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
2011 年度	900,000 円	270,000 円	1,170,000 円
年度			
年度			
総計	3,400,000 円	1,020,000 円	4,420,000 円

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・物性 I

キーワード：光物性、NMR、レーザー、分光、構造変化

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、光受容蛋白質を用い、光反応による構造変化ならびに反応制御機構の解明を主題において研究を進めてきた。光でスイッ

チオン・オフできる光受容蛋白質は、反応の開始点を観測者側で制御できることからこれまで X 線時分割測定のような構造解析やラマン散乱・赤外分光といった各種振動分

光法に用いられてきている。近年では、X線結晶構造解析でも用いられ、多くの報告がある。ここでよく議論されるのが、溶液構造と結晶構造の違いであるが、これは現在まで特にこれといった結論には至っていない。

特に本申請研究に使用する Photoactive Yellow Protein (PYP) は、各種分光により振動モードのアサイン、さらには、蛋白質の光反応過程の検討が進んでいる蛋白質である。過去に結晶構造解析により、光定常状態の構造も報告されているが、現在ではこの構造は否定的にとられている。申請者らの研究グループでは、溶液中での構造解析を目指し、暗状態の構造と変異体を用いた光定常状態の NMR のデータ取得には成功している。しかし、光定常状態では、シグナルが減るだけでなく、ブロードニングを起こしていることから構造解析には至っていない。これとは別に我々の申請グループでは、PYP の光反応開始部分である発色団周りを含んだモデル化合物の合成にも成功しており、より詳細な光反応過程の検討が可能であるだけでなく、光スイッチングデバイスの開発も視野に入れ研究を進めている。

これらを発展させるべく申請者らのグループは、これまでも光の NMR 装置への導入を行ってきた。今回、VBL が保有する可視、近赤外帯において 30 フェムト秒幅の極超短パルス同期して発生する 2 台のパラメトリック増幅器を備えた 1kHz 繰り返し再生増幅チタンサファイヤレーザーシステム、さらには、現在 VBL で開発中の高強度テラヘルツ発生装置からの NMR への光導入を検討し、光反応制御の可能性を模索することを目的として申請に至った。

## 2. 研究の目的

NMR 測定への光導入そのものは、これまでも行われてきている。特に光定常状態での測定は報告例では、最近、蛍光蛋白質 Dronpa を用いた Ar レーザー光導入による光定常状態での構造解析が報告された。しかし、NMR 測定において X 線で見られるような高い時間分解能は現状では実現不可能なため光反応追跡、構造変化測定といった興味深い現象に対する取り組みは、X 線構造解析に比べると遅れを取っている。そこで本申請では、時間分解測定を将来的に夢みながら、レーザー光と同期を取った NMR 測定系の構築を掲げ、光制御下で蛋白質の残基レベルでの  $T_1$ 、 $T_2$  寿命測定を行い、各残基の揺らぎが、蛋白質の構造変化に与える影響の変化を見たい。特に高強度の近赤外光や THz 波は近年急速にレーザー技術の進展と共に伸びてきた領域であり、蛋白質に適用した例はまだ少ない。さらに蛋白質のダイナミクスに関係しているとされている低振動モードにあたる THz 波による測定は実施例自体が少なく、データ

解析には、シュミレーションを含めた多面的なデータ取得が求められる新領域といえる。今後、蛋白質に対して「局所的に」摂動を加えてその変化過程を見るという研究手法が重要となってくると申請者は考えている。レーザーが得意とする指向性・選択性を蛋白質に共鳴させ再度 NMR 測定により特定する手法を開発したい。

それにはまず前段階として、光定常状態や光構造変化が誘引されることが分かっている低分子から出発して、NMR での測定限界を明らかにするところから始める。その上で、光受容蛋白質を用い、光による構造変化の測定を行い、構造変化がどのようなものかのアサインを目指す。さらに、構造変化後の構造がどのようなものかを明らかにすべく、データの大量取得を目指す。現状では、光スイッチング分子の構造変化アサインまではできており、これら分子の詳細構造解析から研究を始める。また光受容蛋白質についても、光定常状態における測定には成功しており、低分子の結果を検討し、蛋白質のシグナルのアサインがどこまで可能か検討する。蛋白質の構造変化については、これまでもあまり知見がないため、ここで研究が終わる可能性がある。本申請では、将来的な計画として、並行して赤外導入の話も進め、蛋白質ダイナミクス研究へとつなげる道筋をつけたいと考えている。よって本申請では、NMR 装置としてレーザーと完全に同期を取れたシステムとして完成することを目指すだけでなく、赤外光導入も目指す。これらのことが実現できれば、将来的に光反応制御しながらの測定というものの検討が可能になるものと考えている。

## 3. 研究の方法

ステップとして三段階を考えている。まず第一ステップとして NMR への光導入を進める。ファイバーによる可視光導入には我々のグループでは既に成功しており、この手法をさらに発展させミラーを駆使し最終的には、ファイバーを用いずに光を導入できないか検討を行う。レーザー導入の評価には、光スイッチングデバイスとして開発された化合物を用いる。これら化合物は光異性化により水素結合が切断されるもの、形成されるものの二種類がある。光反応は一過性で、さらに NMR のケミカルシフトのみならず赤外吸収測定などの各種分光による情報が揃っているサンプルである。このサンプルを用いて、導入されたレーザー光を評価し、最適化する。次に第二ステップとして、光受容蛋白質を用いた光導入 NMR 測定を行う。この段階でレーザーとの同期が取れるかどうか、データの精度はどの程度でるのかの評価を行う。この第二ステップが最も時間を要するだけでなく、今後の実験を行う上での測定限界も規定す

るものとなるため、最も重要なステップとなる。特に、データ精度により、蛋白質の残基レベルでの解析の精度が決まるため、このステップには、何よりも時間と労力をかけ進めたい。この段階で十分なデータの蓄積ができれば、今後への大きな成果へ結びつくものと考えている。

第三ステップでは、可視光のみならずさまざまな光の導入の可能性を検討する。これは今後の装置開発の可能性を検討するもので、特に赤外領域の光導入を行うことにより蛋白質の特定振動モードへの影響を考慮することができ、蛋白質ダイナミクス測定への足掛かりを示すものとなる。

#### 4. 研究成果

本格的なレーザーとの同期を取った形での測定の準備段階で終了してしまった。ファイバー導入を用いた光照射による測定は可能となった。また低分子あるいはポリマーであるが、光反応測定を行うことにより、化合物の物性あるいは光特性を特定することはできた。これらは論文あるいは学会発表の成果として報告することができた（下図1）。

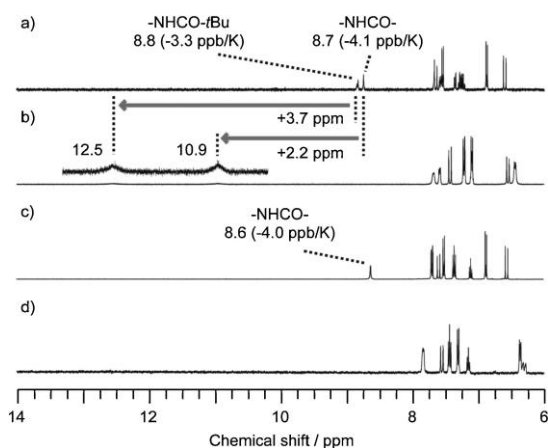


図1. PYPのモデル化合物のプロトン化状態の特定(a)が、プロトン化状態、b)が脱プロトン化状態)

また、分光グループさらには有機合成グループとの共同研究を進め、特に光受容蛋白質であるPYP (Photoactive Yellow Protein) の光異性化から始まる構造変化過程を新しい超高速のラマン分光法による結果を得た。しかし、この測定でもNMRを用いた測定への応用につなげることはできなかった。

また有機合成グループとの共同研究では、包接化合物を用いて、エネルギー転送により物質の距離を推定する測定を行った。これには分光実験のみならずNMR測定も行った。特に、蛍光寿命測定による物性評価とNMR測定による状態推定を行い新規材料開発に向けた物性評価を行った。このことにより包接状態により、蛍光寿命が変化することNMRでもはっきりとそれが確認されることが分かり、物性評価ができることを明ら

かにした。この実験の発展版として、紫外光導入による構造変化誘引を利用して、分子を放出されるよう設計された分子の測定も計画されたが、残念ながら紫外光導入には成功せず、光定常状態のNMR測定は実現されなかった。

さらにこれら実験を発展させる意味で光スイッチング分子でも特に光スイッチングにより物性に变化を誘引し、他の分子と相互作用できる分子を設計し、実験を行ったが、この実験においてNMRデータから有用な結果を引き出すことはできなかった。これは反応が一樣に引き起こせなかったことと相互作用が平衡状態の中行われていることによるものと考えられたが、今のところ有効な対策には至っていない。また可視吸収スペクトル測定や円二色性(CD)スペクトル測定などで光構造変化が確認された光スイッチング分子についても同様の測定を行ったのだが、構造特定には至っていない。この分子は、ヘリックスコイル転移を想定して設計された分子であり、光導入後のコイル状態構造が、ある程度ランダムな構造を取っていることによるものと考えている。このようにこれら結果から、NMR測定の時間限界ならびに平衡など交換反応による測定限界が、ある程度理解できる状態にまで、測定系を組み上げることができた。また光反応時の測定の時間限界も見えつつある。

初年度、昨年度と研究を続けてきた、光によるスイッチング化合物については、可視領域での光スイッチングには成功したわけだが、赤外制御を目指した研究では、想定していた強い赤外発生ができず、NMR測定以前の分光測定による光反応の確認ができないままである。しかし、現在赤外発生の開発には成功しており、この測定については、引き続き行っている。光受容蛋白質測定についても継続して測定を行っているだけでなく、数種類の光受容蛋白質を試すことでデータと経験の蓄積を行っている最中である。

さらに、蛋白質測定においては、反応中心のみのラベリングを行い、反応中心のみの構造を取り出すことも現在進行中であり、低分子で培ってきたデータ処理を応用している。しかし、ここでも低分子ほどの精度でデータを得ることはまだできておらず、特に立体構造特定に必要な距離情報データであるNOEのデータが不足しており、立体構造決定には至っていない。現在さらなるデータ取得に向けて、新たな測定を検討している最中である。またこの技術は、下で述べるLOVについても検討しており、NMRが得意とする水素結合の組み換えなどの詳細な化学反応の追跡へとつなげていきたいと考えている。

NMRの装置そのものは当初VBLでの研究を模索していたが、プローブの不具合により、

Varian (当時、現在は、Agilent) のあるアメリカでの半年におよぶ修理など不運に遭ったこともあり、VBL での開発を一時中断し、本学理学研究科を中心に開発・測定を進めた。その結果、理学研究科において光導入可能なプローブを開発し、使用可能な状態となった。しかし、これは JEOL 社製であり、装置の老朽化に伴い、本年をもって装置入れ替えのため NMR 装置ごと廃棄され交換されることとなっている。現在、このノウハウを VBL に導入することを進めている最中である。さらに、この件については、さらに Agilent とも協議中であり、現在進行中である。Agilent については、昨年度から本学の産学連携プロジェクトの目玉としてテクノアライアンス棟に Agilent のバイオサイエンス部門が入居し、大学内の研究者との連携を深めており、さまざまなプログラムを進行中でもある。また理学部でも、化学専攻の村田教授による ERATO プロジェクトが進行中であり、NMR を取り巻く環境は、人さらには物資・装置面でも非常に恵まれているとあってよい。これら関係各所と連携を取り合いながら現在も測定系の開発等々を進めている。

また測定対象の光受容蛋白質については、PYP 以外を検討した結果、同じく青色光を受容する光受容蛋白質である LOV を用いる実験を検討しており、本学理学研究科宇宙・地球科学専攻の久富准教授との共同研究を開始しており、大腸菌での大量培養系を用いた、発色団の交換反応には成功した。

さらに申請者が研究代表となり久富准教授が研究分担者として 2012 年度基盤 C への採択も決定したことから、本格的に測定することとなった。これまでこの若手 B で得られた成果をさらに発展させていくべく NMR を中心として研究を進める予定である。ちなみに LOV は、phototropin の LOV については、構造解析が進んでおり、結晶構造のみならず、近年、溶液においても暗状態のみならず、光定常状態における構造が報告されてしまった。これは LOV が生物種によって違いはあるものの、光による構造変化した中間体構造状態の寿命が数十分と非常に長いものが多く、構造解析の測定にも適応可能あることによる。今回実験に用いている LOV は生物種が違い中間体構造の寿命面で違いあるだけでなく、機能部分でも若干違うものであり、構造変化で共通な部分と共通でない部分があり、これら既存のデータを利用することで、さらに詳細な検討が可能になると考えている。さらに我々が用いる LOV は、光によって構造変化するだけでなく、そのことによって DNA との結合が予想されており、蛋白質-DNA の相互作用解析といった新しい視点からも研究が進めることができる蛋白質であり、さらに NMR を駆使したいと考えてい

る。

## 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 4 件)

- ① Y. Takashima, Y. Fukui, M. Otsubo, N. Hamada, H. Yamaguchi, H. Yamamoto, A. Harada “Emission Properties of Cyclodextrin Dimers Linked with Perylenediimide - Effect of Cyclodextrin Tumbling.” *Polymer Journal*, 査読有, 44, 2012, 278-285. DOI: 10.1038/pj.2011.128
- ② K. Sakamoto, Y. Takashima, N. Hamada, H. Ichida, H. Yamaguchi, H. Yamamoto, A. Harada “Selective Photoinduced Energy Transfer from a Thiophene Rotaxane to Acceptor.” *Organic Letters*, 査読有, 13(4), 2011, 672-675. DOI: 10.1021/ol102912g
- ③ K. Okamoto, N. Hamada, T. Sumi, T. Okamura, K. Ueyama, H. Yamamoto “Investigation of the effect of the NH...OC hydrogen bond from Cys69 to PYP chromophore using novel active-center model compound.” *Chemistry Letters*, 査読有, Vol.38(5), 2009, 456-457. DOI: 10.1246/cl.2009.456.
- ④ K. Okamoto, N. Hamada, T. Okamura, K. Ueyama, H. Yamamoto “Color regulation and stabilization of chromophore by Cys69 in photoactive yellow protein active center. *Organic Biomolecular Chemistry*, 査読有, 7(18), 2009, 3782-3791. DOI: 10.1039/B905835D

[学会発表] (計 3 件)

- ① 中村亮介、濱田格雄、兼松泰男、阿部健太、吉澤雅幸「光受容蛋白質における光異性化構造ダイナミクスの研究」物理学会 (第 67 回年次大会)、2012 年 3 月 24 日、関西学院大学
- ② 西邨翔太、青田浩幸、松本昭、兼松泰男、市田秀樹、濱田格雄「飛石型共役系ポリマーの合成と光エネルギー変換システムへの応用 (41)」第 60 回高分子子討論会、2011 年 9 月 30 日、岡山大学
- ③ 市田秀樹、中村亮介、濱田格雄、兼松泰男「Pump-Dump-蛍光スペクトルにおける Red-edge dumping [III]」日本物理学会、2009 年 9 月 27 日、熊本大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱田 格雄 (Hamada Norio)

大阪大学・産学連携本部・特任講師

研究者番号：80379148