

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22350014

研究課題名（和文） 二次非線形分光によるタンパク質の高次構造解析

研究課題名（英文） Protein Structure Analysis by Second-order Nonlinear Spectroscopy

研究代表者

山口 祥一（YAMAGUCHI SHOICHI）

独立行政法人理化学研究所・田原分子分光研究室・専任研究員

研究者番号：60250239

研究成果の概要（和文）：

新しいタンパク質高次構造解析法によってセグメントの配向を決定出来ることを、モデルタンパク質を用いて実際に証明した。モデルタンパク質の一つの残基をシステインに変異させて、マレイミド基を有する色素分子を導入した。その色素分子の電子遷移に共鳴する二次非線形感受率をヘテロダイン検出和周波発生法によって測定した。二次非線形感受率の符号によって、ガラス表面上のモデルタンパク質の上下の向きを決定できることを示した。

研究成果の概要（英文）：

I show that a newly-developed second-order nonlinear spectroscopic technique allows me to draw topology diagrams of such proteins. Uniquely, one can determine "up" versus "down" alignment of molecules on a surface using this second-order nonlinear spectroscopy. In my novel but simple approach, an "alignment indicator" is introduced to each segment of a protein before immobilizing the protein on a glass surface, and the up versus down alignment of each segment is nonlinear-spectroscopically determined. This approach is very powerful and useful for proteins to which neither X-ray nor NMR is applicable.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

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：タンパク質，高次構造，配向，二次非線形感受率，円二色性，ヘテロダイン検出，和周波発生分光，ポリペプチド

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造を決めることは、生体内におけるタンパク質の機能発現や制御機構を解明する上で非常に重要である。一般に、タンパク質の立体構造は、X線結晶構造解析やNMRによって決定されている。X線やNMRは、タンパク質のほぼ全原子の三次元座標という、いわば“完全な”構造情報を与

える。しかし、タンパク質の構造と機能の相関を調べる時、必ずしも完全な構造情報が常に不可欠なわけではない。それは、構造と機能の相関を議論する際、しばしばリボンモデルやシリンダーモデルのような“完全ではないが見やすい”立体構造表示が多用されていることから分かる。完全ではない構造情報でも、タンパク質の研究に十分に役立つ場

合が少なくない。結晶化させ難い膜タンパク質や、分子量が巨大となるタンパク質複合体では、X線やNMRによって完全な構造情報を得ることが困難な場合がとても多い。そのような場合でも、完全ではないが役に立つ構造情報を得ることができれば、タンパク質研究において極めて有意義である。

2. 研究の目的

我々がこれまでに独自に開発した二次非線形レーザー分光を基にして、これまでとは全く発想の異なる新しいタンパク質高次構造解析法を開発する。この新方法は、X線やNMRといった“完全な”構造情報を与える既存の方法を適用することが困難な膜タンパク質や巨大タンパク質をターゲットとして、膜貫通部位のトポロジーのような“不完全ではあるが見やすい”高次構造情報の決定を目指すものである。

3. 研究の方法

HD-ESFGをタンパク質に適用するにあたり、まずタンパク質については、あるセグメントだけをHD-ESFGアクティブにする方法と、配向膜の作製法を確立する。またHD-ESFGについては、現在稼働している装置をさらに一桁以上高感度化する。以下に具体的な内容を記す。

(1) タンパク質の1セグメントをHD-ESFGアクティブにする方法

HD-ESFGは、電子遷移に共鳴する二次非線形感受率($\chi(2)$)の実部と虚部のスペクトルを与える。現有の装置では、観測波長は320 nm以上に限定されている。従って特別な発色団を持たないタンパク質は全て、HD-ESFGに対してノンアクティブである。一方で、クマリン誘導体やパラニトロアニリン誘導体は大きな $\chi(2)$ を有することを、既にHD-ESFGによって確認している。そこで、それらの誘導体をタンパク質の特定の部位に結合させることによって、その部位を含むセグメントをHD-ESFGアクティブにすることが可能となる。特定部位に結合させる方法は複数考えられるが、まず最初に試すのは、クマリンマレイミドとシステインミューテーションを組み合わせる方法である。クマリンマレイミドとは、クマリン骨格の一端にマレイミド基を付加した分子で、モレキュラープローブとして既に市場にある。マレイミド基は、チオール基と反応して共有結合を作るので、タンパク質の特定のアミノ酸残基をシステインにミューテーションすることによって、そこにクマリンを導入することが可能となる。この方法は、ネイティブに多数のシステインを含まない全てのタンパク質に適用可能であり、実際に蛍光ラベル法として広く用いられている。従って、クマリンの導入自体には技術的障壁は無いと考えられる。クマリンの疎水性と、その導入セグメントの疎水性から、両者

は図1のように互いに沿った構造をとると予想され、モデル系での分子力学計算でも予想と整合する結果を得ている。つまり、クマリンの配向をHD-ESFGで決めれば、それはそのまま近似的にセグメントの配向となる。

(2) タンパク質の配向膜の作製法

HD-ESFGによって得られる $\chi(2)$ スペクトルは、界面選択的な電子スペクトルである。その界面選択性とは、分子に特定の配向の無いバルクでは $\chi(2)$ がゼロとなり、界面ではその法線方向の異方性によって分子にある程度の配向が生じることによって $\chi(2)$ がゼロでない値をとり得る、という原理に基づいている。従って、HD-ESFGでタンパク質を測定するには、その配向膜を作製しなければならない。作製法は複数考えられるが、まず最初に試すのは、Hisタグと呼ばれるタンパク質末端に付加されたヒスチジン残基と、ニッケルの配位結合を利用して、ニッケル修飾されたガラス表面にタンパク質を特異吸着させる方法である。Hisタグは、ヒスチジンとニッケルの配位結合を利用してタンパク質の精製を行う目的で意図的に付加されたヒスチジン残基であり、遺伝子組み換え技術により多くのタンパク質に簡単に付加することができる。ニッケル修飾ガラス表面は、まずシランカップリングによってガラス表面をチオール基で修飾し、次にマレイミドニトリロ三酢酸(NTA)をチオール基と反応させNTA修飾表面とし、NTAにニッケルを配位させて用意することができる。このようにして作製されたニッケル修飾ガラス表面は、ニッケルの表面密度として1 nm²あたり1個以上の高密度を実現できると考えられ、タンパク質の大きさで表面密度の上限が決まる高密度配向タンパク質単分子膜となるはずである。

(3) HD-ESFG装置の高感度化

タンパク質単分子膜の $\chi(2)$ の大きさは、我々が報告したパラニトロアニリンのスパインコート薄膜の場合の1/10程度である。従って、HD-ESFG装置を現在よりもさらに高感度化することが是非とも必要である。現有のHD-ESFG装置の信号雑音比は、和周波信号光の強度と、入射レーザー光の安定性によって決まっている。前者については、CCDをより高感度な物に置き換えることによって、見かけ上の強度を上げることが依然として可能である。そこで、より高感度な液体窒素冷却CCDを導入して、信号雑音比の向上を図る。後者については、試料(ガラス基板)と参照(水晶基板)の両測定をなるべく早く多数回繰り返すことによって、入射レーザー光の不安定性の影響を抑えることができる。そのために、ガラスと水晶と素早く置き換える自動ステージを導入する。

4. 研究成果

新しいタンパク質高次構造解析法によって

セグメントの配向を決定出来ることを、モデルタンパク質を用いて実際に証明した。具体的には、 α ヘリックスを形成する21残基の合成ポリペプチドをモデルタンパク質として用いた。モデルタンパク質をニッケル修飾ガラス表面上に吸着させて作製した配向膜の品質は、まず円二色性分光で調べた。CDスペクトルの形状から、モデルタンパク質はきちんと α ヘリックスを形成していることを確認した。次に、ヘテロダイン検出振動和周波発生分光法(HD-VSFG)によって、アミドI領域の振動共鳴二次非線形感受率を測定し、ガラス表面上のモデルタンパク質の“上下”の向きを調べた。その結果、C末端にHisタグを導入したモデルタンパク質は上向き、N末端のものは下向きと、思った通りの配向を実現できていることを確認した。モデルタンパク質の一つの残基をシステインに変異させて、マレイミド基を有する色素分子を導入した。その色素分子の電子遷移に共鳴する二次非線形感受率を、ヘテロダイン検出電子和周波発生分光法(HD-ESFG)によって測定した。その結果、電子遷移に共鳴する二次非線形感受率の符号によって、ガラス表面上のモデルタンパク質の上下の向きを決定できることを示した。以上の結果は、より大きなタンパク質においても、ある一つのセグメントの残基を変異させて、そこに色素分子を導入してHD-ESFG測定を行なえば、そのセグメントの上下の向きを決定できることを意味している。

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 16 件)

- [1] Kazuya Shiratori, Shoichi Yamaguchi, Tahei Tahara, and Akihiro Morita, "Computational analysis of the quadrupole contribution in the second-harmonic generation spectroscopy for the water/vapor interface", *J. Chem. Phys.* **138** (2013) 064704. 査読あり
- [2] Satoshi Nihonyanagi, Jahur A. Mondal, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara, "Structure and Dynamics of Interfacial Water Studied by Heterodyne-Detected Vibrational Sum-Frequency Generation", *Ann. Rev. Phys. Chem.* **64** (2013) 579-603. 査読あり
- [3] Shoichi Yamaguchi, Achintya Kundu, Pratik Sen, and Tahei Tahara, "Quantitative estimate of the water surface pH using heterodyne-detected electronic sum frequency generation", *J. Chem. Phys.* **137** (2012) 151101. 査読あり
- [4] Prashant Chandra Singh, Satoshi Nihonyanagi, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara, "Ultrafast vibrational dynamics of water at a charged interface revealed by two-dimensional

heterodyne-detected vibrational sum frequency generation", *J. Chem. Phys.* **137** (2012) 094706. 査読あり

[5] Satoshi Nihonyanagi, Prashant Chandra Singh, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara, "Ultrafast Vibrational Dynamics of a Charged Aqueous Interface by Femtosecond Time-Resolved Heterodyne-Detected Sum Frequency Generation", *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **85** (2012) 758-760. 査読あり

[6] Jahur A. Mondal, Satoshi Nihonyanagi, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara, "Three Distinct Water Structures at a Zwitterionic Lipid/Water Interface Revealed by Heterodyne-Detected Vibrational Sum Frequency Generation", *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 7842-7850. 査読あり

[7] Shoichi Yamaguchi, Hidekazu Watanabe, Sudip Kumar Mondal, Achintya Kundu, and Tahei Tahara, "'Up' versus 'down' alignment and hydration structures of solutes at the air/water interface revealed by heterodyne-detected electronic sum frequency generation with classical molecular dynamics simulation", *J. Chem. Phys.* **135** (2011) 194705. 査読あり

[8] Satoshi Nihonyanagi, Tatsuya Ishiyama, Touk-kwan Lee, Shoichi Yamaguchi, Mischa Bonn, Akihiro Morita, and Tahei Tahara, "Unified Molecular View of Air/Water Interface Based on Experimental and Theoretical $c^{(2)}$ Spectra of Isotopically Diluted Water Surface", *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 16875-16880. 査読あり

[9] Shoichi Yamaguchi, Kazuya Shiratori, Akihiro Morita, and Tahei Tahara, "Electric quadrupole contribution to the nonresonant background of sum frequency generation at air/liquid interfaces", *J. Chem. Phys.* **134** (2011) 184705. 査読あり

[10] Shoichi Yamaguchi, Kankan Bhattacharyya, and Tahei Tahara, "Acid-Base Equilibrium at an Aqueous Interface: pH Spectrometry by Heterodyne-Detected Electronic Sum Frequency Generation", *J. Phys. Chem. C* **115** (2011) 4168-4173. 査読あり

[11] Sudip Kumar Mondal, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara, "Molecules at the Air/Water Interface Experience a More Inhomogeneous Solvation Environment than in Bulk Solvents: A Quantitative Band Shape Analysis of Interfacial Electronic Spectra Obtained by HD-ESFG", *J. Phys. Chem. C* **115** (2011) 3083-3089. 査読あり

[12] Shoichi Yamaguchi, Haruko Hosoi, Megumi Yamashita, Pratik Sen, and Tahei Tahara, "Physisorption Gives Narrower Orientational Distribution than Chemisorption on a Glass Surface: A Polarization-Sensitive Linear and Nonlinear Optical Study", *J. Phys. Chem. Lett.* **1**

(2010) 2662-2665. 査読あり

[13] Jahur A. Mondal, Satoshi Nihonyanagi, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara, "Structure and orientation of water at charged lipid monolayer/water interfaces probed by heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy", *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 10656-10657. 査読あり

[14] Satoshi Nihonyanagi, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara, "Water Hydrogen Bond Structure near Highly Charged Interfaces Is Not Like Ice", *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 6867-6869. 査読あり

[15] Hidekazu Watanabe, Shoichi Yamaguchi, Sobhan Sen, Akihiro Morita, and Tahei Tahara, "'Half hydration' at the air/water interface revealed by heterodyne-detected electronic sum frequency generation spectroscopy, polarization second harmonic generation, and molecular dynamics simulation", *J. Chem. Phys.* **132** (2010) 144701. 査読あり

[16] Pratik Sen, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara, "Ultrafast dynamics of malachite green at the air/water interface studied by femtosecond time-resolved electronic sum frequency generation (TR-ESFG): an indicator for local viscosity", *Faraday Discuss.* **145** (2010) 411-428. 査読あり

〔学会発表〕 (計 4 件)

[1] "Interface-Selective Heterodyne-Detected Second-Order Nonlinear Vibrational Spectroscopy", Shoichi Yamaguchi, *23rd International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS)*, August 12th, 2012, Bangalore, India.

[2] "Nonlinear Laser Spectroscopy for Surfaces and Interfaces of Liquids", *Oral Presentation*, Shoichi Yamaguchi, *CAS-RIKEN Frontier Science Workshop 2012*, May 26th, 2012, Oiso, Japan.

[3] "Interface-Selective Heterodyne-Detected Second-Order Nonlinear Spectroscopy", Shoichi Yamaguchi, *15th East Asian Workshop on Chemical Dynamics*, May 20th, 2011, Pohang, South Korea.

[4] "Interface-Selective Even-Order Nonlinear Spectroscopy", Shoichi Yamaguchi, *The 3rd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry*, September 14th, 2010, Lonavala, India.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 祥一 (YAMAGUCHI SHOICHI)

独立行政法人理化学研究所・田原分子分光研究室・専任研究員

研究者番号：60250239

(2) 研究分担者

細井 晴子 (HOSOI HARUKO)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：00313396