様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号： １４４０１
研究種目： 基盤研究(B)
研究期間： 2011～2013
課題番号： ２３３５０００７
研究課題名（和文） タンパク質内エネルギー散逸の時空間分解観測による機構解明

研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms of energy dissipation in proteins by time- and space-resolved observation

研究代表者
水谷　泰久（Mizutani, Yasuhisa）

大阪大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：６０２７０４６９
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　15,600,000円、（間接経費）　4,680,000円

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。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に成功した。時間分解紫外共鳴ラマン分光法と部位特異的アミノ酸置換法を用いることによって、チトクロムb562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、タンパク質のエネルギー散逸の距離依存性を明らかにした。

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. Ultraviolet resonance Raman (UVRR) 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 UVRR intensity can be a direct probe of vibrational energy of residues in a protein. In this study, we observed the vibrational energy migration in cytochrome b562 and myoglobin by using anti-Stokes UVRR spectroscopy and elucidated distance dependence of the vibrational energy migration.

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： ラマン分光法　生物物理　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。なぜなら、この空間スケールにおいては媒質は均一とはみなせず、「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からである。

分子スケールでの伝導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現段階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われわれがチトクロム c について行ったものが唯一であり、散逸過程を時空間分解して観測することは、依然として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、ヘムタンパク質を利用して、エネルギー供与体と受容体の相互位置を制御した系をつくり、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、エネルギー散逸過程を調べた。

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した。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種である。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。ヘムを光励起すると無輻射遷移によって余剰エネルギーが生じ、その後余剰エネルギーは周囲のタンパク質部分へ散逸する。光励起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した。また本研究では、部位特異的アミノ酸置換法によって、芳香族アミノ酸残基の位置を変化させ、タンパク質内エネルギー散逸の距離依存性を調べた。

４．研究成果

(1) チトクロム b_{562} を用いた研究

本研究では、チトクロム b_{562}（図 1）におけるエネルギー伝達を調べた。チトクロム b_{562} は、ヘムが 4 本のαヘリックスに囲まれた単純な立体構造をもつ。この構造を利用し、αヘリックスの 1 ターン単位で Trp 残基の位置をずらした三種類の変異体を作製し、エネルギー伝達の量や速度の距離依存性を系統的に調べた。また、野生型のチトクロム b_{562} は Trp 残基を持たない。そのため、任意の位置に Trp 残基を導入することで、立体構造を大きく変えることなく Trp 一残基のみの変異体を作製できる利点を持つ。

ヘムから距離が異なる位置に Trp 残基を持つ三種類の変異体（ヘムに近いものから R98W、L14W、および I17W）を作製した。ヘムの鉄原子から各残基のα炭素までの距離は、それぞれ 5.2、10.9、および 16.2 Å である。時間分解測定は、再生増幅したチタンサファイアレーザーにより得られたパルス光を用い、波長変換により、405 nm のポンプパルスと 230 nm のプローブパルスを得ることで、ポンプ－プローブ法（相互相関時間 3.8 ps）により行った。

図 2 にチトクロム b_{562} 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を示す。左は R98W 変異体、右は L14W 変異体のスペクトルである。青色のスペクトルはプローブ光のみを照射して得られるスペクトルで、赤色のスペクトルは各遅延時間における ポンプ光照射による強度増加分を表したスペクトルである。763 cm^{-1} と 1010 cm^{-1} のバンドはそれぞれ Trp 残基由来の W18 バンド、W16 バンドである。これらはヘムの光励起に伴いバンド強度が増大し、その後減衰した。バンド強度の増加は Trp 残基へのエネルギーの流入、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。バンド強度変化の大きさは、Trp の位置がヘムに近い R98W 変異体の方が大きかった。図 3 に R98W および L14W 変異体の W18 バンドおよび W16 バンド強度の時間変化を比較したものを示す。図中の実線は、関数 $A[\exp(-t/\tau_{\mathrm{decay}})-\exp(-t/\tau_{\mathrm{rise}})]$ と、装置応答関数とをコンボリュートした関数でフィットした結果である。W18 バンド強度の増加と減少の時定数は、R98W 変異体では 2.9, 4.7 ps と、L14W 変異体では 6.0, 6.3 ps と求められた。また W16 バンドの強度増減の時定数は、R98W 変異体では 4.0, 4.3 ps、L14W 変異体では 5.9, 6.4 ps であった。I17W 変異体のスペクトルでも、W18 および W16 バンドで強度変化は観測されたが、R98W や L14W のそれに比べて弱かった。

アンチストークスバンド強度は、Trp 残基の位置がヘムに近い R98W 変異体で最も大きく、L14W、I17W 変異体の順で小さくなった。これは、エネルギー源のヘムに近いほど残基あたりのエネルギー伝達量が大きいことを意味する。また、L14W 変異体のバンド強度の増加速度は、R98W 変異体のそれに比べ、W16、W18 バンドともに遅かった。こ

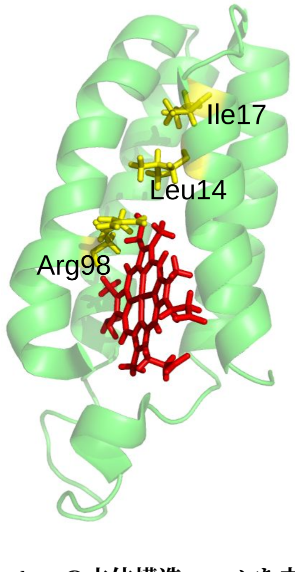

図 1. Cyt b_{562} の立体構造。ヘムを赤色、Trp 残基を導入する前のアミノ酸残基(Arg98, Leu14, Ile17)をそれぞれ黄色で示している。（PDB, 1QPU）

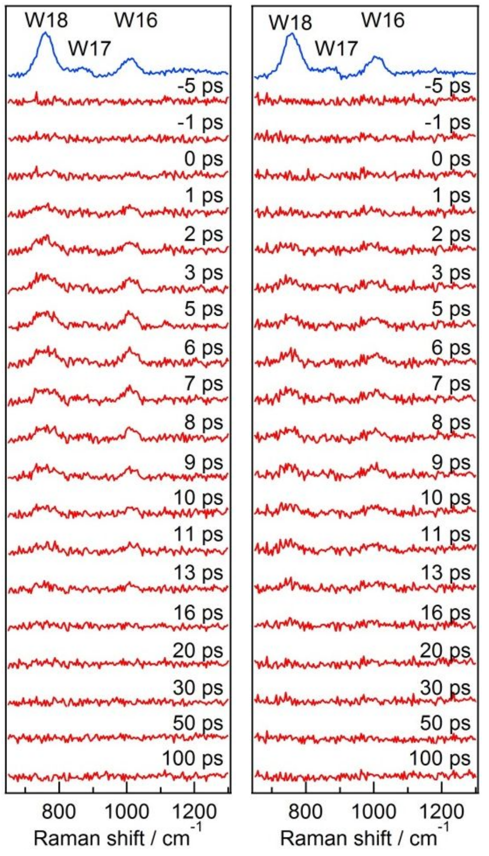

図 2. 変異体 Cyt b_{562} の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトル。（左）R98W 変異体、（右）L14W 変異体。

れは、ヘムからの距離が離れていることによって、エネルギー伝達により長い時間がかかるためであると考えられる。また、ミオグロビンにおいては、バンド強度の増加と減少の時定数は、ヘムから 6.2 Å 離れた残基について 3.0, 9.6 ps、11.8 Å 離れた残基について 4.0, 19.2 ps と求められている。距離が近いもの同士で、ミオグロビンとチトクロム b_{562} の時定数を比較すると、増加の時定数は近いが、減少の時定数はチトクロム b_{562} の方が半分程度に小さい。この違いはエネルギー流出が残基周囲の環境に依存することを反映し、興味深い。

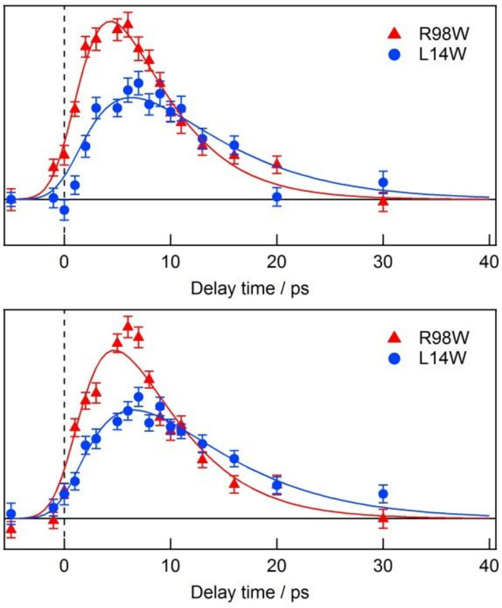

図 3. R98W および L14W 変異体のバンド強度変化の比較。
（上）W18 バンド、（下）W16 バンド。

⑵ ミオグロビンを用いた研究

ミオグロビンはヘムを含む安定な球状タンパク質である。われわれは部位特異的アミノ酸置換法によって、異なった位置に Trp 残基を一残基のみ含むミオグロビン変異体を作製し、チトクロム b_{562} と同様にヘムからのエネルギー散逸を調べた。ミオグロビンを図 4A の挿入図に示す球でモデル化し、熱拡散方程式に基づいて過渡的温度の時間・空間依存性を調べた。その計算結果を図 4A に示す。また図 4B に示すように、三種類の変異体の測定結果と、熱拡散方程式から得られた値とを比較すると、同一のパラメーターでは再現することはできなかった。これはナノメートル前後のミクロな範囲でのエネルギー伝達を考える際、一般的な熱拡散の考え方では、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 Å の空間

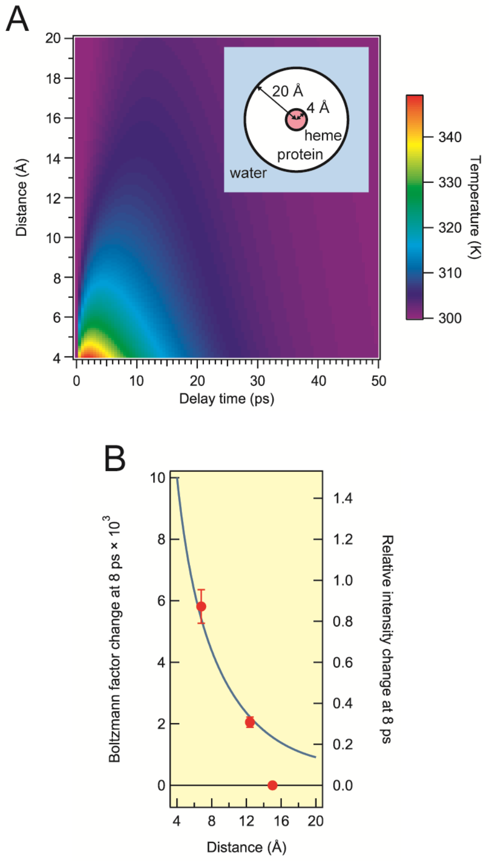

図 4. （A）熱拡散方程式から得られたヘムタンパク質中の過渡的温度の時間・空間依存性。挿入図に、用いたヘムタンパク質のモデルを示す。（B）A の結果から計算されたボルツマン因子とアンチストークスバンド強度の比較（光励起後 8 ps 後）。

スケールで調べたものである。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。

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 1 件）

"Direct observation of vibrational energy flow in cytochrome *c*", Naoki Fujii, Misao Mizuno, and <u>Yasuhisa Mizutani</u>, J. Phys. Chem. B, 115, 13057–13064 (2011).査読有

〔学会発表〕（計 10 件）

①宮本光紘、「時間分解アンチストークス共鳴ラマン分光法によるタンパク質内振動エネルギー伝達の距離依存性の観測」、第 7 回分子科学討論会　2013 年 9 月 24 日～27 日京都

②<u>水谷泰久</u>、「時間分解共鳴ラマン分光法でタンパク質に起きていることを観る」（学術賞受賞講演）、日本化学会第 93 春季年会、立

命館大学　びわこ・くさつキャンパス、2013年3月22日〜25日.

③ Yasuhisa Mizutani, "Propagations of displacement and energy in proteins", Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics, August 5-9, 2013, Telluride, Colorado, USA.

④Yasuhisa Mizutani, "Vibrational energy flow in hemeproteins", 23rd International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2012), August 12-17, 2012, Bangalore, India.

⑤ Yasuhisa Mizutani, "Watching energy flow in hemeproteins", Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics, August 1-5, 2011, Telluride, Colorado, USA

⑥Yasuhisa Mizutani, "Watching ultrafast protein dynamics by time-resolved visible and ultraviolet resonance Raman spectroscopy", October 21, 2011, National Chiao Tung University, Hsinchu, Taiwan

⑦水谷泰久、「タンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピング」、分子研研究会「実験と理論による高次分子システムの機能発現の分子論的理解」、2011年11月1日、2日、岡崎コンファレンスセンター

⑧水谷泰久、「タンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピング」、シンポジウム「分子アンサンブル2011」、2011年11月10〜12日、理化学研究所

⑨水谷泰久、「時間分解振動分光法で観えるもの、そして考えるもの」、大阪大学蛋白質研究所セミナー「タンパク質科学の未来を語る：実験・理論研究者の対話」、2011年11月21日、22日、大阪大学会館講堂

⑩藤井直樹、タンパク質内エネルギー散逸の時空間分解観測：ヒーター分子からの距離依存性、第5回分子科学討論会　2011年9月20日〜23日　札幌

〔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
(　　　)

研究者番号：