

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：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550019

研究課題名(和文)近赤外励起ラマン円偏光二色性分光を用いた生体関連分子の構造解析手法の確立

研究課題名(英文)Applications of Near-Infrared Raman Optical Activity to Biological Samples

研究代表者

海野 雅司(Unno, Masashi)

佐賀大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50255428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の大きな目的は申請者らが開発してきたラマン円偏光二色性分光装置を高感度化し、これをさまざまな系に応用してその有用性を実証することである。本手法は円二色性分光のラマン分光版で、通常のラマン分光に比べて極めて多くの構造情報を提供する。特に、本研究では近赤外光励起のラマン円偏光二色性分光法をさまざまな光受容タンパク質に応用し、発色団の捻れ構造に関する微細な情報が得られることを明らかにした。最近、発色団分子の捻れなどの構造的な歪みが酵素活性等に重要であることを示唆する研究が報告されてきており、本手法はタンパク質の機能を分子構造レベルで解明するうえで極めて重要な情報を与えると期待された。

研究成果の概要(英文)：Many biological cofactors, such as light-absorbing chromophores in photoreceptors, are intrinsically planar molecules. A protein environment, however, causes structural distortions of the cofactor, and such structural changes can lead to a modulation of chemical properties of the cofactor to maximize its biological activity. We recently applied the near-infrared ROA to bacteriorhodopsin and photoactive yellow protein. These studies demonstrated that the near-infrared excitation allows us to measure the ROA spectra of a chromophore within a protein environment. Furthermore, calculations of the ROA spectra utilizing DFT provide detailed structural information, such as data about out-of-plane distortions of the chromophore. These findings extend the applicability of ROA to many biological cofactors.

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：分子分光 振動分光 生物物理 光受容タンパク質 量子化学計算

1. 研究開始当初の背景

自然界には補欠分子を活性中心としてもつ色素蛋白質が数多く存在する。例えばヘム蛋白質はさまざまな機能を発現するため鉄ポルフィン錯体であるヘムを活性部位としてもっている。また光受容蛋白質では発色団と呼ばれる有機化合物を光の検出に使っており、光吸収によって引き起こされた発色団の構造変化が蛋白質の構造変化を引き起こして信号伝達などの機能を実現している。このような補欠分子の多くは π 電子系を有した化合物で、本来は平面構造である。しかし、蛋白質中では歪んだ非平面構造となり、この構造の歪みが蛋白質の機能と密接な関係をもつことが示されてきた。例えば、光受容蛋白質では発色団の吸収波長制御や光物理・光化学的な性質などに関与していることが示されている。

上記のように補欠分子の構造歪みの重要性は指摘されてきたが、その実験的な検出は容易ではない。例えば、X線結晶回折では1.5 Å程度の高分解能構造でも正確に面外方向の歪みを検出することはできない。そこで我々は非平面構造への歪みに関する構造情報が期待できる分光手段として、ラマン円偏光二色性分光またはラマン光学活性分光 (Raman Optical Activity, ROA) と呼ばれる手法に注目した。振動円二色性分光 (Vibrational Circular Dichroism, VCD) と同様、ROAは補欠分子の構造やコンフォメーションを鋭敏に反映すると期待される。紫外可視光を用いた電子円二色性分光 (いわゆるCD) に比べてROAやVCDスペクトルでは多くの振動バンドから構成されており、個々のバンドが有益な構造マーカーとなり得るのが大きな利点である。このためROAは蛋白質や糖鎖などのさまざまな生体関連分子に応用されてきた。しかし、従来開発されてきたROA分光装置のほとんどは可視レーザー光を励起光源として用いているため、多くの色素蛋白質では蛍光や試料の光損傷などのため応用できなかった。

2. 研究の目的

そこで我々は色素蛋白質でも光吸収を示さない近赤外光を励起光としたROA分光装置を開発し、いくつかの光受容蛋白質に応用した。その結果、蛋白質中に含まれる発色団のROAスペクトルを測定できた。更に量子化学計算を用いた解析から、観測したROAスペクトルは発色団の面外方向への歪みを反映していることがわかった。

3. 研究の方法

分子にエネルギー $h\nu_L$ (ν_L は振動数)の光を照射すると散乱光の一部はエネルギーを変えて振動数 (ν_S) のラマン散乱光となる。このとき、入射光 (ν_L) と散乱光 (ν_S) の振動数の差 $\nu_L - \nu_S$ が分子固有の振動数に対応する。従って試料に照射したレーザー光からのラ

マン散乱光を観測し、その振動数と強度を調べることで分子振動に関する知見が得られる。

ROAでは入射光として右回りおよび左回りに円偏光したレーザー光を用いてラマン散乱光を観測する。これらの和 $I^R + I^L$ は通常のラマンスペクトルに対応するが、これらの差 $I^R - I^L$ がROAスペクトルとなる。キラルでない分子では $I^R - I^L = 0$ となるが、キラルな分子では I^R と I^L の強度がわずかに異なり $I^R - I^L \neq 0$ となる。ところがROA信号 $I^R - I^L$ はラマン信号強度 $I^R + I^L$ の 10^{-3} 以下と極めて小さく、その測定は容易ではない。しかし鏡像異性体ではROAスペクトルの符号が反転して区別でき、生体関連分子の多くはキラルであることから通常のラマン分光よりも高次の構造情報が期待できる。

既存のROA分光装置のほとんどは可視光 (532 nm など) を励起光源として用いている。しかし、可視部に電子吸収帯をもつ色素蛋白質への応用を可能にするため、我々は近赤外光励起 (785 nm) のROA分光装置を自作した。上記のようにROAスペクトルは入射光を左右円偏光に変調して測定したラマン散乱光を観測し、その差 $I^R - I^L$ から得ることができる。この方法は入射円偏光方式 (Incident Circular Polarization, ICP) と呼ばれ、我々の装置ではこのICP方式を採用した。一方、無偏光の入射光を照射して観測されるラマン散乱光の左右円偏光の強度差を観測する散乱円偏光方式 (Scattered Circular Polarization, SCP) でも同様のROAスペクトルが得られることがわかっており、市販の可視光励起ROA分光装置ではこのSCP方式が採用されている。このようにROAスペクトルの測定原理は簡単であるが、偽信号のないROAスペクトルの測定は容易ではない。例えば、完全な円偏光を発生させるのは難しく、試料セルを構成するガラス板のわずかな歪みなどによってもレーザー光やラマン散乱光の偏光特性は変化する。このため、我々の装置を含め、最近のROA装置では偽信号を軽減する補正機構を導入している。

ROAスペクトルには分子構造に関するさまざまな情報が含まれている。しかし、得られたスペクトルから構造情報を引き出すためには、量子化学計算によるROAスペクトルのシミュレーションが必要である。現在、Gaussian09のような汎用的な量子化学計算パッケージを使うことでROAスペクトルを計算することができる。我々の研究では密度汎関数理論 (Density Functional Theory, DFT) を用い、標準的なB3LYPと呼ばれる汎関数を用いた。また基底関数にも標準的な6-31+G**を用いた。

4. 研究成果

我々は785 nm励起のROA分光装置を開発し、さまざまな色素蛋白質へ応用した。ここではバクテリオロドプシン (BR) とイエロー

プロテイン (Photoactive Yellow Protein, PYP) の 2 つの光受容蛋白質への応用例について報告する。

BR と PYP の電子吸収スペクトルは 560 nm と 450 nm 付近に発色団に由来する吸収極大を示す。レーザー光の波長がこれらの電子吸収帯にある場合、発色団のラマンバンドの強度が他の蛋白質部分や溶媒に比べて著しく ($10^3 - 10^5$ 倍) 増大する。これは共鳴ラマン効果と呼ばれ、蛋白質中に存在する発色団や反応中間体、特定のアミノ酸残基の振動スペクトルを選択的に観測できる。また信号の増大効果により、低濃度の試料のラマンスペクトルを低レーザー光強度で測定することができる。しかし試料からの蛍光が競合するとラマンスペクトルの測定が困難になり、また光損傷や光副反応などの影響を受けやすいという欠点もある。一方、電子吸収帯よりもやや長波長側の励起光によるラマン散乱を前期共鳴ラマン散乱と呼び、ある程度の共鳴ラマン効果が得られる。この前期共鳴ラマン散乱では高濃度の試料と高レーザー光強度の励起光源が必要であるが、発色団のラマンスペクトルを選択的 (優先的) に測定でき、光損傷や光副反応などの影響もない。そこで、我々は前期共鳴ラマン効果が期待できる 785 nm の励起光を用いて、BR と PYP の ROA スペクトルを測定した。

BR は高度好塩菌に存在する光駆動プロトンポンプで、視物質のロドプシンと同様に 7 回膜貫通型構造をもっている。発色団はレチナールで、Lys216 とプロトン化シッフ塩基を形成している。BR は明順応状態 (BR_{568}) と暗順応状態 (BR_{560}) と呼ばれる 2 つの状態を示す。 BR_{568} のレチナールは all-trans 型であるが、 BR_{560} は all-trans 型の BR_{568} と 13-cis 型の BR_{548} の 2 つの異性体が共存する状態である。 BR_{560} と BR_{568} のラマンおよび ROA スペクトルを比較したところ、 BR_{560} と BR_{568} のラマンスペクトルは比較的類似しているが、ROA スペクトルには大きな違いが見られた。 BR_{560} では 1200 および 1530 cm^{-1} 付近に顕著な負の ROA バンドが観測されたが、 BR_{568} の生成に伴って信号強度が減少し、符号が反転した。この結果から近赤外励起 ROA 分光を用いることで蛋白質中に存在する発色団の ROA スペクトルを測定でき、観測した ROA スペクトルがレチナール発色団の異性化に伴う構造変化に極めて敏感であることがわかった。

PYP は紅色光合成細菌が示す負の走光性に関与する青色光センサー蛋白質だと考えられている。発色団は p-クマル酸で、Cys69 とチオールエステル結合を形成している。発色団は暗状態において trans 型であり、フェノール部位が脱プロトン化した陰イオンとなっている。この暗状態 PYP の近赤外励起ラマンおよび ROA スペクトルを測定した。次に実測の ROA スペクトルから発色団の構造に関する知見を得るため、密度汎関数理論 (DFT) による解析を行った。その結果、ROA スペク

トルは発色団の面外方向への歪みに極めて敏感なことがわかった。更に計算スペクトルを実測スペクトルと比較すると、結晶構造と同程度の歪みを考慮したモデルが主な ROA バンドの特徴を再現できた。以上の結果から、ROA スペクトルの測定と DFT 計算によるシミュレーションを併用することで、発色団の歪みだけでなく、歪みの方向を検出できることがわかった。

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 10 件)

(1) Urago, H., Suga, T., Hirata, T., Kodama, H., Unno, M. Raman Optical Activity of a Cyclic Dipeptide Analyzed by Quantum Chemical Calculations Combined with Molecular Dynamics Simulations, 査読有, J. Phys. Chem. B 印刷中

(2) Furuya, Y., Zhao, W., Unno, M., Mohuchi, T. The electrochemical properties of low-crystallinity TiO₂(B)-carbon composite as an anode material in lithium-ion battery, 査読有, Electrochim. Acta 印刷中

(3) 海野雅司, ラマン光学活性による色素蛋白質の構造解析, 査読有, 生物物理 54, 39-42. (2014)

(4) Furuya, Y., Zhao, W., Iida, T., Unno, M., & Noguchi, H. Influence of Preparation Temperature of Precursor on the Thermal Stability of TiO₂(B) and its Electrochemical Property as an Anode Material in the Lithium-Ion Battery, 査読有, Electrochemistry 82, 7-13 (2014)

(5) Kubota, K., Shingae, T., Foster, N. D., Kumauchi, M., Hoff, W. D. & Unno, M. Active Site Structure of Photoactive Yellow Protein with a Locked Chromophore Analogue Revealed by Near-Infrared Raman Optical Activity, 査読有, J. Phys. Chem. Lett. 4, 3031-3038 (2013)

(6) Shingae, T., Kubota, K., Kumauchi, M., Tokunaga, F. & Unno, M. Raman Optical Activity Probing Structural Deformations of the 4-Hydroxycinnamyl Chromophore in Photoactive Yellow Protein, 査読有, J. Phys. Chem. Lett. 4, 1322-1327 (2013)

(7) Unno, M., Kikukawa, T., Kumauchi, M., & Kamo, N. Exploring the active site structure of a photoreceptor protein by Raman optical activity, 査読, J. Phys.

Chem. B 117, 1321-1325 (2013)

(8) Unno, M., Tsukiji, Y., Kubota, K., & Masuda, S. N-terminal truncation does not affect the location of a conserved tryptophan in the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*, 査読有, J. Phys. Chem. B 116, 8974-8980 (2012)

(9) Tateishi, Y., Abe, T., Tamogami, J., Nakao, Y., Kikukawa, T., Kamo, N., & Unno, M. Spectroscopic Evidence for the Formation of an N Intermediate during the Photocycle of Sensory Rhodopsin II (Phoborhodopsin) from *Natronobacterium pharaonis*, 査読有, Biochemistry 50, 2135-2143 (2011).

(10) Nakao, Y., Kikukawa, T., Shimonol, K., Tamogami, J., Kimitsuki, N., Nara, T., Unno, M., Ihara, K., & Kamo, N. Photochemistry of a Putative New Class of Sensory Rhodopsin (SRIII) coded by xop2 of *Haloarcula marismortui*, 査読有, J. Photochem. Photobiol. B 102, 45-54 (2011)

[学会発表] (計20件)

(1) 日本化学会第94春季年会(2014)、名古屋、2014.3.27-30、口頭、アラニンペプチドを用いたポリ(L-プロリン) II由来のラマン円偏光二色性スペクトルの解析、○古田雅和、海野雅司、江口貴大

(2) 1st International Picobiology Institute Symposium, Picometer- to Micrometer-Level Structural Analyses for Studies on Functional Mechanisms of Proteins, Hyogo, 2014.1.7-8, poster, Protonation state of the linear tetrapyrrole chromophore in cyanobacteriochrome RcaE revealed by resonance Raman spectroscopy, Osoegawa, S., Hirose, Y., Ikeuchi, M., Unno, M.

(3) 1st International Picobiology Institute Symposium, Picometer- to Micrometer-Level Structural Analyses for Studies on Functional Mechanisms of Proteins, Hyogo, 2014.1.7-8, poster, Raman optical activity spectra of poly(L-proline) II helix in alanine peptides, Furuta, M., Eguchi, T., Unno, M.

(4) 1st International Picobiology Institute Symposium, Picometer- to Micrometer-Level Structural Analyses for Studies on Functional Mechanisms of Proteins, Hyogo, 2014.1.7-8, Oral, Active site structure of photoactive yellow protein with a locked chromophore analogue

revealed by near infrared Raman optical activity, Shingae, T., Kubota, K., Foster, N. D., Kumauchi, M., Hoff, W., Unno, M.

(5) 13th Kyushu-Seibu/Pusan-Kyeongnam Joint Symposium on High Polymers (16th) and Fibers (14th) in Saga, Saga, 2013.11.9, ポスター, Raman Optical Activity Spectra of Poly(L-proline) II Helix in Alanine Peptides, Furuta, M., Eguchi, T., Unno, M.

(6) 第51回日本生物物理学会年会、京都、2013.10.28-30、ポスター、共鳴ラマン分光法によるシアノバクテリオクローム RcaE がもつ開環テトラピロール発色団のプロトン化状態の解析、小副川晋介、広瀬侑、池内昌彦、海野雅司

(7) 第51回日本生物物理学会年会、京都、2013.10.28-30、ポスター、近赤外ラマン円偏光二色性分光による光受容タンパク質の活性部位構造解析、新ヶ江貴仁、久保田健介、Foster, N. D.、熊内雅人、Hoff, W. D.、海野雅司

(8) 7th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Kobe, 2013.8.25-30, ポスター, Active Site Structure of Photoactive Yellow Protein with a Locked Chromophore Analog Revealed by Near Infrared Raman Optical Activity, Shingae, T., Kubota, K., Foster, N. D., Kumauchi, M., Hoff, W. D., Unno, M.

(9) 7th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Kobe, 2013.8.25-30, 招待講演, Raman optical activity probes structural deformations of the chromophore within a protein environment, UNNO, M.

(10) 2nd International Symposium on Host Compounds for Separation and Functionality in Saga, Saga, 2013.7.12, 招待講演, Raman Optical Activity Probes Structural Deformations of the Chromophore in a Photoreceptor Protein, Masashi Unno

(11) 第40回 生体分子科学討論会、吹田、2013.6.7-8、講演、近赤外ラマン円偏光二色性分光を用いた光受容タンパク質の活性部位構造解析-発色団アナログを再構成した Photoactive Yellow Protein への応用、○新ヶ江貴仁、久保田健介、FOSTER N. D.、熊内雅人、HOFF Wouter、海野雅司

(12) 2012年 日本化学会西日本大会、佐賀、2012.11.10、ポスター、近赤外励起ラマン円偏光二色性分光と円二色性分光を用いた光

受容タンパク質における活性部位の構造解析、○新ヶ江貴仁、久保田健介、熊内雅人、HOFF Wouter、海野雅司

(13) 2012年 日本化学会西日本大会、佐賀、2012. 11. 10、ポスター、ラマン円偏光二色分光によるジペプチドのコンフォメーション解析、○浦郷寛康、菅虎雄、兒玉浩明、海野雅司

(14) 2012年 光化学討論会、東京、2012. 9. 14、招待講演、海野雅司、Exploring the active site structure of a photoreceptor protein by Raman optical activity

(15) 第50回日本生物物理学会年会、名古屋、2012. 9. 22-24、講演、N末アミノ酸残基の有無は AppA BLUF ドメインの保存された トリプトファン残基の位置に影響しない、○海野雅司、築地祐樹、久保田健介、増田真二

(16) 第39回 生体分子科学討論会、仙台、2012. 6. 8-9、講演、近赤外励起ラマン円偏光二色性分光と円二色性分光を用いた Photoactive Yellow Protein における活性部位の構造解析、○新ヶ江貴仁、久保田健介、熊内雅人、HOFF Wouter、海野雅司

(17) 日本化学会第92春季年会、横浜、2012. 3. 27、講演、環状ジペプチドのラマン円偏光二色性スペクトルの測定と解析、○浦郷寛康、菅虎雄、兒玉浩明、海野雅司

(18) 日本化学会第92春季年会、日吉、2012. 3. 27、講演、近赤外ラマン円偏光二色性分光法による Photoactive Yellow Protein の構造解析、○新ヶ江貴仁、久保田健介、熊内雅人、HOFF Wouter、海野雅司

(19) 第5回アジア・オセアニア光生物学会議、奈良、2011. 7. 29-8. 1、招待講演 Exploring the active site structure of photoactive yellow protein by Raman optical activity、海野雅司

(20) 第49回日本生物物理学会年会、姫路、2011. 9. 16-18、講演、ラマン円偏光二色性分光法による photoactive yellow protein の活性部位の構造解析、○新ヶ江貴仁、久保田健介、熊内雅人、徳永史生、海野雅司

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://biophysics.chem.saga-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野 雅司 (UNNO, Masashi)

佐賀大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：50255428

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

加茂 直樹 (KAMO, Naoki)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：10001976

増田 真二 (MASUDA, Shinji)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：30373369