

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26288008

研究課題名（和文）特徴的な立体構造を利用したタンパク質内エネルギー散逸機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of energy dissipation mechanism utilizing characteristic three-dimensional structures of proteins

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） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質中の活性部位に生じ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、タンパク質内の散逸する。われわれは、アンチストークスラマンバンド強度が余剰エネルギーの大きさを反映することを利用して、ヘムタンパク質中のエネルギー散逸過程を観測することに成功した。ミオグロビンの変異体について、アミノ酸残基単位でエネルギーの流れを観測し、タンパク質のエネルギー伝搬において、原子間接触が重要な因子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Vibrational energy flow in proteins was studied by monitoring the time-resolved anti-Stokes ultraviolet resonance Raman scattering of three myoglobin mutants in which a Trp residue substitutes a different residue near heme. The anti-Stokes Raman intensities of the Trp residue in the three mutants increased with similar rates after depositing excess energy at heme, despite the difference in distance between heme and each Trp residue along the main chain of the protein. This indicates that vibrational energy is transferred through atomic contacts between heme and the Trp residue. Distinct differences were observed in the amplitude of the band intensity change between the Trp residues at different positions, and the amplitude of the band intensity change exhibits a correlation with the extent of exposure of the Trp residue to solvent water. This correlation indicates that atomic contacts between a residue and solvent water play an important role in vibrational energy flow in a protein.

研究分野：生物物理化学

キーワード：ラマン分光法 時間分解分光法 振動エネルギー緩和

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を均一とみなすことはできず、「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。横浜市大の木寺らや 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その後検証された (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* およびミオグロビンについて行っているものの、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、ヘムタンパク質の芳香族アミノ酸残基のアンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトルを測定し、タンパク質内の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徴を説明する。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。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) エネルギー移動機構に関する研究

本研究では、共鳴ラマン分光法の長所を最大限に活かして、ミオグロビンのタンパク質内エネルギー伝搬の時空間マッピングを行った。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ことである。

図1に示すように、ミオグロビン中ヘム近傍の43、68、89位のアミノ酸残基を、それぞれトリプトファン(Trp)に置換した3種の変異体、F43W、V68WおよびL89Wを作製した。

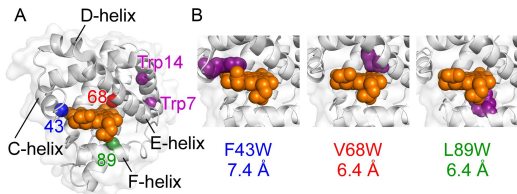


図1. 本研究に用いた3種類の変異体

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のポンパルスと230 nmのプロブパルスを得ることで、ポンプ-プロブ法(相互相関時間3.8 ps)により行った。

ヘムの光励起に伴う時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを図2に示す。3種の変異体いずれについても、光励起後アンチストークスバンドが数ピコ秒で立ち上がり、数十ピコ秒で減衰した。

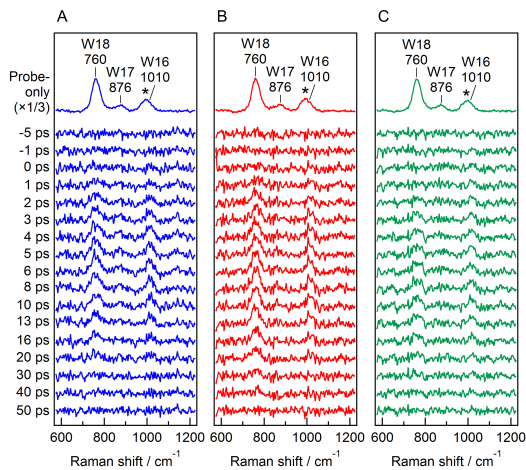


図2. ミオグロビン変異体の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトル

アンチストークスバンドの立ち上がりと減衰は、それぞれTrp残基の振動励起状態の増加と減衰に対応する。バンド強度の時間変化

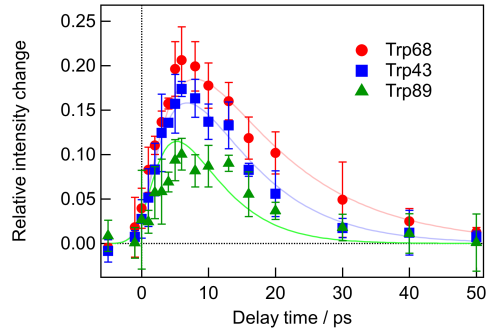
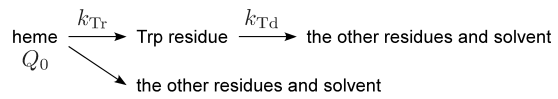


図3. ミオグロビン変異体のアンチストークスラマンバンド強度の時間変化

を解析した結果、図3に示すアンチストークスラマンバンドの時間変化は、次のスキームのモデルでうまく説明できることがわかった。



k_{Hd} : energy relaxation rate from heme

図中の実線は、2つの指数関数と、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。

3カ所のTrp残基は、ヘムから主鎖を介した距離は大きく異なる。一方、ヘムからの直接的な距離はほとんど差がない。3種の変異体間で、アンチストークスラマンバンド強度の立ち上がりはほとんど違いがなかった。この結果は、ヘムから放出された余剰エネルギーは、共有結合を介してではなく、ヘムとアミノ酸残基との原子間接触を介して伝搬していることを示している。また、Trp残基からのエネルギー放出速度(k_{Td})と溶媒露出表面積は高い相関を示すことがわかった。この結果は、溶媒である水分子がエネルギー散逸における効率の良いエネルギー受容体であることを示唆している。

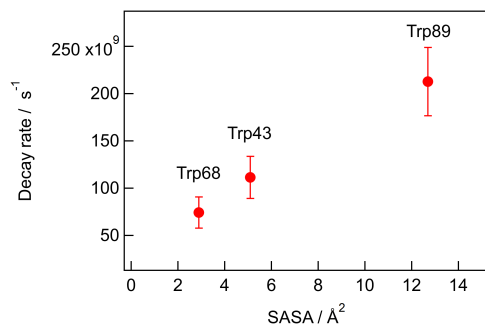


図4. Trp残基からのエネルギー放出速度と溶媒露出表面積との相関

これらの結果は、タンパク質のエネルギー伝搬において、原子間接触が重要な因子であることを示している。

(2)移動エネルギーの定量化に関する研究

我々はこれまで、Trp 残基の時間分解アンチストークスラマンスペクトルを観測し、タンパク質内のエネルギーの流れを研究してきた。しかし、過渡的なエネルギーについて定量的な議論は不十分である。そこで、過渡的なエネルギーを定量化するために、Trp 水溶液のラマンスペクトルの温度依存性を調べた。

Trp 水溶液の紫外共鳴ラマンスペクトルは、波長 230 nm のレーザー光を用いて測定した。試料の温度は、光照射部付近に設置した熱電対を用いて測定した。試料中に加えた過塩素酸イオンのバンド強度を基に、レーザー光強度のふらつきによるバンド強度の変化や自己吸収の効果を補正した。

Trp 水溶液の紫外共鳴アンチストークスラマンスペクトルには、764, 882, 1014 cm^{-1} に W18, W17, W16 バンドが観測された。スペクトルから求めた W16/W18 バンド強度比の温度依存性は、ボルツマン分布に基づく理論値でうまく説明できた。これは、バンド強度比を基に分子の温度を見積もることができることを示している。この結果に基づいて、我々が以前報告したチトクロム *c* のデータを解析すると、ヘムの励起によって Trp 残基の温度は少なくとも過渡的に 90 °C 以上に上昇していることがわかった。これは、タンパク質を等方的な媒質と近似した熱拡散方程式から予測される温度より高かった。以上の結果は、ヘムからタンパク質へのエネルギーの流れが等方的でない、あるいは Trp 残基中でエネルギーの分布が統計的でないことを示している。

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 3 件)

"Importance of Atomic Contacts in Vibrational Energy Flow in Proteins," Masato Kondoh, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani, *J. Phys. Chem. Lett.* 7, 1950–1954 (2016). 査読有
DOI: 10.1021/acs.jpcclett.6b00785

"Vibrational Energy Flow in Hemeproteins," Yasuhisa Mizutani, Naoki Fujii, Mitsuhiro Miyamoto, Misao Mizuno, and Haruto Ishikawa, in *Ultrafast Phenomena XIX*, K. Yamanouchi, et al., Editors. 2015, Springer International Publishing. p. 532-534. 査読なし

"Observing Vibrational Energy Flow in a Protein with the Spatial Resolution of a Single Amino Acid Residue", Naoki Fujii, Misao Mizuno, Haruto Ishikawa, and Yasuhisa Mizutani, *J. Phys. Chem. Lett.*, 5,

3269–3273 (2014). 査読有

DOI: 10.1021/jz501882h

[学会発表](計 11 件)

「タンパク質内エネルギー移動の定量化に向けたアンチストークスラマンスペクトルの温度依存性の観測」、山下 聡、水野 操、水谷 泰久、日本化学会第 96 春季年会、平成 29 年 3 月 16 日～19 日、横浜

"Direct Observation of Vibrational Energy Flow in Proteins by Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy," Yasuhisa Mizutani, Present and Future of Ultrafast Spectroscopy, March 14–15, 2017, Wako, Japan

"Importance of atomic contacts in vibrational energy flow in proteins," Yasuhisa Mizutani, 6th International Conference on Perspectives in Vibrational Spectroscopy, November 5-8, 2016, Golden Blossom Imperial Resorts, Lucknow, India.

"Vibrational Energy Flow in Hemeproteins," Yasuhisa Mizutani, The XXV International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS2016), August 14–19, 2016, Fortaleza, Brazil.

"Watching vibrational energy flow in proteins," Yasuhisa Mizutani, International Symposium: "Recent Progress in Molecular Spectroscopy and Dynamics", July 7–9, 2016, Fukuoka, Japan.

"Watching energy flow in proteins," Yasuhisa Mizutani, Conference on Time in Biological Systems and Beyond, March 28–29, 2016, National Tsing Hua University, Taiwan

"Temporal Raman mapping of vibrational energy flow in hemeprotein", Yasuhisa Mizutani, Pacificchem 2015, December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.

"Watching energy flow in proteins", Yasuhisa Mizutani, The Fifth Asian Spectroscopy Conference, September 29-October 2, 2015, Sydney, Australia.

「時間分解紫外共鳴アンチストークスラマン分光法で観る蛋白質内エネルギー伝達における異方性」、近藤 正人、水野 操、水谷 泰久、日本化学会第 94 春季年会、平成 27 年 3 月 27 日～30 日、船橋

「タンパク質内エネルギー散逸のラマン時空間マッピング」、水谷 泰久、第 8 回分子科学討論会、広島大学東広島キャンパス、平成 26 年 9 月 21 日～24 日。

"Temporal Raman Mapping of

Vibrational Energy Flow in Heme proteins,” Yasuhisa Mizutani, Naoki Fujii, Mitsuhiro Miyamoto, Misao Mizuno, and Haruto Ishikawa. 24th International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2014) August 10-15, 2014, Jena, Germany

〔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://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：

(4) 研究協力者

()