

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13933

研究課題名(和文) 分子近接場振動分光法によるタンパク質局所ナノメートル構造ダイナミクス計測法開発

研究課題名(英文) Development of observation of protein dynamics in nanometer region around an active center using molecular near-field vibrational spectroscopy

研究代表者

水野 操 (Mizuno, Misao)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：10464257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：わたしたちは、分子近接場振動分光法をもちいてタンパク質ダイナミクスを観測する新しいプローブ開発を試みました。対称中心をもつ分子の共鳴ハイパーラマン過程では、その周辺にある分子から分子間振電相互作用によりハイパーラマン散乱が観測されることが報告されています。エチオヘムは対称中心がある分子で、ヘムタンパク質本来の活性中心であるヘムの代わりにタンパク質に再構成されます。本研究では、エチオヘム溶液において、溶媒やエチオヘムに配位しているイミダゾール分子からハイパーラマン散乱が観測されました。この結果は、タンパク質の活性中心付近の局所タンパク質構造ダイナミクス観測の新たな手法の可能性を示しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

振動分光法をもちいると、サブナノメートルの空間分解能で化学結合の微小変化を検出できます。従来の時間分解共鳴ラマン分光法によるヘムタンパク質の構造ダイナミクス観測では、プローブ部位が、ヘムとその軸配位子であるアミノ酸残基、および芳香族アミノ酸残基に限定されていました。本研究では、第三のダイナミクス観測プローブ部位としてこれまで観測ができなかったヘム周辺のアミノ酸残基の局所構造変化の時間分解計測法を開拓しました。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop a new probe to selectively observe protein dynamics using molecular near-field vibrational spectroscopy. In resonance hyper-Raman processes for centrosymmetric molecules, it was reported that hyper-Raman scattering of their surrounding molecules can be observed due to intermolecular vibronic coupling. Etioheme is a centrosymmetric molecule and can be reconstituted into hemoproteins instead of heme as an intrinsic active site. In etioheme solutions, we were able to observe hyper-Raman scattering of the surroundings, such as solvent molecules and ligated imidazole molecules. These results indicates possibilities of new methodology for measurements of local protein dynamics around the active center in proteins.

研究分野：振動分光学

キーワード：分子近接場振動分光法 共鳴ハイパーラマン散乱 分子の対称性 ヘム

1. 研究開始当初の背景

タンパク質ダイナミクス観測では、これまでに共鳴ラマン分光法により、補欠分子族や芳香族アミノ酸残基の振動バンドをプローブとして観測する実験研究が行われているが、それ以外の部位では直接観測が困難であった。2006年に、対称中心をもつβ-カロテンの電子遷移が、近接する溶媒分子のハイパーラマン散乱強度を著しく増大させる現象が初めて報告された (Shimada, et al. *J. Raman Spectrosc.* 2006; *J. Chem. Phys.* 2008)。ハイパーラマン散乱は、エネルギー ω_i の入射光に対し、エネルギー $2\omega_i - \Omega$ の散乱光が発生する非線形ラマン散乱である。β-カロテンの共鳴ハイパーラマン散乱は、低エネルギー側にある二つの電子励起状態間の振電相互作用により発生する。このとき、溶媒分子のハイパーラマン散乱も、溶質-溶媒分子間振電相互作用により強度が増大し観測される。この現象は、「分子近接場効果」と呼ばれている (図1)。これを利用すれば、これまでサイレントだったタンパク質内部の分子運動について新たな観測手法を創成できると考えた。

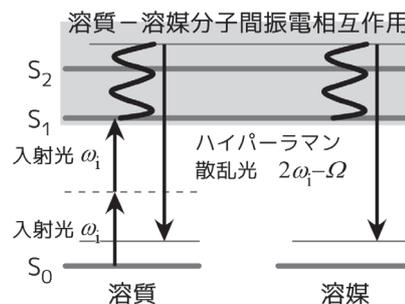


図1. 分子近接場効果. 例として、2光子許容 (1光子禁制) の $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移、1光子許容 (2光子禁制) の $S_0 \rightarrow S_2$ 遷移の場合を示す. 波線は振電相互作用.

2. 研究の目的

振動分光法をもちいると、サブナノメートルの空間分解能で化学結合の微小変化を検出できる。従来の時間分解共鳴ラマン分光法によるヘムタンパク質の構造ダイナミクス観測では、プローブ部位が、ヘムとその軸配位子であるアミノ酸残基、および芳香族アミノ酸残基に限定される (図2a)。プローブ部位では、高空間分解能をもった高感度観測が可能であるが、プローブ部位から離れた分子運動はサイレントであった。本研究では、空間分解能の高さを保ったまま第三のダイナミクス観測プローブ部位として、タンパク質のアロステリック効果を生み出すのに重要なヘム近傍のナノメートルスケールの局所構造変化の情報取得 (図2b) を目指す。

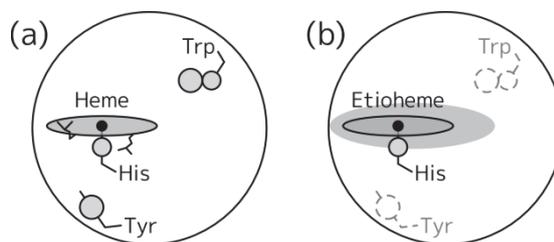


図2. ミオグロビン (図中、○) のダイナミクス観測プローブ部位 (図中、グレーの部分). (a) 共鳴ラマン分光法、(b) 分子近接場振動分光法.

3. 研究の方法

(1) 試料

ヘムタンパク質内部における分子近接場効果の効率を上げるために、補欠分子族をヘムから対称中心をもつエチオヘムに再構成する (図3)。エチオヘムは、市販のエチオポルフィリンを原料に合成する。ヘムの再構成は Neya らの方法 (*Biochim. Biophys. Acta* 1989) をもちいる。ミオグロビンから、酸性条件下でヘムをはずし、アポ体を調整する。その後、弱酸性 (pH 6.5 付近) 下で、エチオヘムを再構成し、カラムクロマトグラフィーで精製する。リガンド分子の結合は、タンパク質試料溶液を気密性セルに入れ、試料をリガンド分子のガス雰囲気下で還元することで行う。

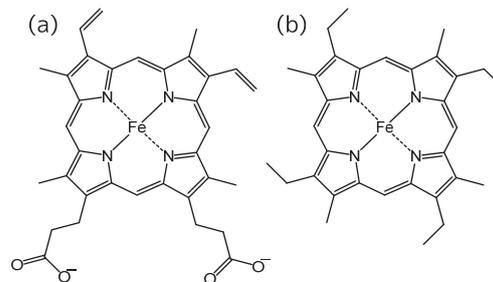


図3. (a) ヘム (鉄プロトポルフィリン IX)、(b) エチオヘム. それぞれ C_s 、 D_{4h} 対称性をもつ.

(2) ハイパーラマン散乱測定

ハイパーラマンスペクトルの測定は、再生増幅したチタンサファイアレーザーから得られるピコ秒パルスをもちいる。波長 800 nm の基本波をプローブ光 (ω_i) として使用する。これにより、B バンドに共鳴するヘムの共鳴ハイパーラマン散乱が得られる。ヘムの共鳴ハイパーラマン散乱は振電相互作用により強度が増大するため、ヘム近傍ナノメートル領域にある分子の振動バンドが分子近接場効果を通じて観測されると考えられる。

共鳴ハイパーラマン散乱が観測されるエネルギー領域 (ω_i に対して、 $2\omega_i - \Omega$) は、通常の共鳴ラマン散乱の場合 (同、 $\omega_i - \Omega$) とは大きく異なるため、それぞれの散乱光によるスペクトルの区別は容易である。さらに、ハイパーレイリー散乱はレイリー散乱と比較して強度が小さいため、ハイパーラマン散乱は低振動数領域まで観測できる利点がある。

4. 研究成果

(1) タンパク質中のヘムからの共鳴ハイパーラマン散乱観測

ヘムタンパク質の補欠分子族ヘムは、ポルフィリン鉄錯体である。金属ポルフィリンは、400 nm 付近に非常に強い吸収帯の B バンドが、500 ~ 600 nm には弱い吸収帯の Q バンドが観測される。800 nm 付近の B バンドへの 2 光子吸収効率、近接する Q バンドとの相互作用により

上昇することが知られている。そこで、800 nm 励起でミオグロビンの共鳴ハイパーラマン散乱の観測を行った。このスペクトルは、400 nm 励起のヘムの共鳴ラマンスペクトルと形状が異なっていた。共鳴ラマンおよびハイパーラマン散乱の強度増大機構では、各振動状態の波動関数の重なりで起因する場合、スペクトル形状は互によく似るが、振電相互作用に起因する場合、スペクトル形状の類似は見られない。この結果は、タンパク質内のヘムの共鳴ハイパーラマン機構が振電相互作用に起因することを支持し、ヘムタンパク質は分子近接場効果の必要条件を満たすことを示した。

(2) タンパク質中におけるヘムの対称性

タンパク質中でヘムの対称性があるかを調べるために、天然のミオグロビンとエチオヘムを再構成したミオグロビンにおけるヘムの共鳴ラマンスペクトルを測定した。その結果、タンパク質中においても通常のヘムは対称中心がない構造であるが、エチオヘムは対称中心をもち、高い対称性を保つことが明らかになった。

(3) 有機溶媒中のエチオヘム溶液の共鳴ハイパーラマン観測

有機溶媒をもちいた溶液中のヘミン（単離した状態のヘム）とエチオヘムの共鳴ハイパーラマンスペクトルを測定した。溶媒には、エチオヘムの溶解度が高いピリジン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタンをもちいた。エチオヘム溶液の共鳴ハイパーラマンスペクトルには、ヘミン溶液のスペクトルで観測されないバンドが観測された。このバンドは、溶媒分子の振動バンドであった。しかし、使用した溶媒は、高いエネルギーをもつ励起光により容易にハイパーラマン散乱を発生させるものであったため、新たに観測されたハイパーラマンバンドが、分子近接場効果によって発生するのか、過剰なエネルギーをもつ励起光によって発生するのかを区別をすることができなかった。実験条件の詳細な検討が必要となった。

エチオヘムの溶解度が比較的高く、ハイパーラマン散乱発生確率が低い溶媒として、テトラヒドロフランおよびアセトンに注目した。この結果、エチオヘムが持つ高い分子対称性により生じる分子近接場効果により、溶媒分子のハイパーラマン散乱が観測されることを確認した。また、ヘムタンパク質中の環境を模すために、エチオヘムに配位するイミダゾール分子を溶液に加えて測定し、イミダゾール分子からも分子近接場効果によるハイパーラマン散乱を観測することができた。この溶液における実験結果は、ヘムタンパク質においてヘムの周辺局所構造変化の観測についての高い可能性を示した。

(4) エチオヘム再構成ミオグロビンにおける共鳴ハイパーラマン観測

溶液における実験結果から、励起光のエネルギーを低く抑える必要性が生じたため、タンパク質中におけるヘム周辺のアミノ酸残基のハイパーラマン散乱を感度よく観測するにはいたっていない。さらなる測定系の改良が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

1. Nao Nishimura, Misao Mizuno, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani, “Distortion and a Strong Hydrogen Bond in the Retinal Chromophore Enable Sodium-Ion Transport by the Sodium-Ion Pump KR2”, *J. Phys. Chem. B* 123, 3430-3440 (2019). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b00928
2. Akihiro Otomo, Misao Mizuno, Manish Singh, Wataru Shihoya, Keiichi Inoue, Osamu Nureki, Oded Bèjà, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani, “Resonance Raman Investigation of the Chromophore Structure of Heliorhodopsins”, *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 6431–6436 (2018). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.jpclett.8b02741
3. Tomomi Shionoya, Misao Mizuno, Takashi Tsukamoto, Kento Ikeda, Hayato Seki, Keiichi Kojima, Mikihiro Shibata, Izuru Kawamura, Yuki Sudo, and Yasuhisa Mizutani, “High Thermal Stability of Oligomeric Assemblies of Thermophilic Rhodopsin in a Lipid Environment”, *J. Phys. Chem. B*, 122, 6495-6953 (2018). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b04894
4. Riho Takayama, Akimasa Kaneko, Takashi Okitsu, Satoshi P. Tsunoda, Kazumi Shimono, Misao Mizuno, Keiichi Kojima, Takashi Tsukamoto, Hideki Kandori, Yasuhisa Mizutani, Akimori Wada, and Yuki Sudo, “Production of a Light-gated Proton Channel by Replacing the Retinal Chromophore with Its Synthetic Vinylene Derivative”, *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 2857–2862 (2018). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.jpclett.8b00879
5. Satoshi Yamashita, Misao Mizuno, Duy Phuoc Tran, Hisham Dokainish, Akio Kitao, and Yasuhisa Mizutani, “Vibrational Energy Transfer from Heme through Atomic Contacts in Proteins”, *J. Phys. Chem. B* 122, 5877-5884 (2018). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b03518
6. Keita Sato, Takahiro Yamashita, Hideyo Ohuchi, Atsuko Takeuchi, Hitoshi Gotoh, Katsuhiko Ono, Misao Mizuno, Yasuhisa Mizutani, Sayuri Tomonari, Kazumi Sakai, Yasushi Imamoto, Akimori Wada, and Yoshinori Shichida, “Opn5L1 is a retinal receptor that behaves as a reverse and self-regenerating photoreceptor”, *Nat. Commun.* 9, 1255 (2018). (査読有)
DOI: 10.1038/s41467-018-03603-3

7. Misao Mizuno, Ayumi Nakajima, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani, “Structural Evolution of a Retinal Chromophore in the Photocycle of Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*”, *J. Phys. Chem. A* 122, 2411–2423 (2018). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.jpca.7b12332
8. Shanyan Chang, Misao Mizuno, Haruto Ishikawa, and Yasuhisa Mizutani, “Tertiary Dynamics of Human Adult Hemoglobin Fixed in R and T Quaternary Structures”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20, 3363–3372 (2018). (査読有)
DOI: 10.1039/C7CP06287G
9. Akiko Niho, Susumu Yoshizawa, Takashi Tsukamoto, Marie Kurihara, Shinya Tahara, Yu Nakajima, Misao Mizuno, Hikaru Kuramochi, Tahei Tahara, Yasuhisa Mizutani, and Yuki Sudo, “Demonstration of a light-driven SO_4^{2-} transporter and its spectroscopic characteristics”, *J. Am. Chem. Soc.* 139, 4376–4389 (2017). (査読有)
DOI: 10.1021/jacs.6b12139
10. Akihiro Otomo, Haruto Ishikawa, Misao Mizuno, Tetsunari Kimura, Minoru Kubo, Yoshitsugu Shiro, Shigetoshi Aono, and Yasuhisa Mizutani, “A Study of the Dynamics of the Heme Pocket and C-helix in CooA Upon CO Dissociation Using Time-resolved Visible and UV Resonance Raman Spectroscopy”, *J. Phys. Chem. B*, 120, 7836–7843 (2016). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b05634
11. Takeo Yamawaki, Haruto Ishikawa, Misao Mizuno, Hiro Nakamura, Yoshitsugu Shiro, and Yasuhisa Mizutani, “Regulatory Implications of Structural Changes in Tyr201 of the Oxygen Sensor Protein FixL”, *Biochemistry* 55, 4027–4035 (2016). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00405
12. Masato Kondoh, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani, “Importance of Atomic Contacts in Vibrational Energy Flow in Proteins”, *J. Phys. Chem. Lett.* 7, 1950–1954 (2016). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.jpcclett.6b00785

[学会発表] (計 7 件)

1. 水野 操, 水谷 泰久, 佐藤 恵太, 大内 淑代, 山下 高廣, 酒井 佳寿美, 今元 泰, 七田 芳則, 山野 由美子, 和田 昭盛, 「脊椎動物がもつ新規光センサーOpn5L1 の不活性状態の発色団構造」, 第 12 回分子科学討論会, 2018 年.
2. Misao Mizuno, “Light-driven cation pump mechanism of a sodium ion pump derived by its chromophore structure of photointermediates”, 26th International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS2018), 2018 年.
3. 西村 尚, 水野 操, 神取 秀樹, 水谷 泰久, 「ナトリウムイオンポンプの発色団構造と光駆動カチオン輸送機構」, 第 11 回分子科学討論会, 2017 年.
4. Misao Mizuno, “Determining factors for ion pumping mechanism in microbial rhodopsins”, 18th International Conference on Time-resolved Vibrational Spectroscopy (TRVS2017), 2017.
5. Momoko Kawarabata, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani, “Spectral features of heme with higher symmetry in myoglobin”, 日本化学会第 96 春季年会, 2017 年.
6. 水野 操, 神取 秀樹, 水谷 泰久, 「ハロロドプシン光反応中間体のレチナル発色団に対する水分子の役割」, 第 10 回分子科学討論会, 2016 年.
7. Misao Mizuno, “Structural evolution of the retinal chromophore in the photocycle of microbial rhodopsins”, 4th Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications”, 2016 年.

[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) 研究部分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：河原畑 桃子、ロウ セイセイ

ローマ字氏名：Momoko Kawarabata, Lou Lanqingqing