

平成21年5月22日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007 年度～2008 年度  
 課題番号： 19750054  
 研究課題名 (和文) 超高速界面顕微振動分光法による生体反応の分子・速度論的解明  
 研究課題名 (英文) Molecular and kinetic studies on bio-reactions by using ultrafast surface microscopic vibrational spectroscopy  
 研究代表者  
 野口 秀典 (NOGUCHI HIDENORI)  
 北海道大学・大学院理学研究院・助教  
 研究者番号： 60374188

## 研究成果の概要：

本研究は、タンパク質等の生体分子が実際に生きて存在する水環境下での生体分子周辺の水の構造および水との間に働く相互作用（水素結合など）をリアルタイムで追跡することで、タンパク質の構造と機能発現におよぼす水の影響について速度・分子論的に解明することを目的としている。二次的非線形光学現象にもとづく和周波発生（SFG）分光法は、反転対称性の欠如をもつ界面（表面）のみの情報を選択的に得ることが可能な振動分光法であり、特に固体／液体および液体／液体界面の水のプロープには従来の分光法と異なりバルクの水の影響を考慮する必要がないため、SFG 分光法が適している。本研究では、カルシウム受容性タンパク質のひとつであるカルモジュリン（CaM）を固体基板上へ固定化させるほ法を確立し、カルシウムイオン存在下でのタンパクの構造変化に伴う周囲の水の構造および CaM 自身の構造変化を界面振動分光法により評価した。CaM がカルシウムイオンと結合することで CaM 周囲に配向していた水分子の水素結合性が弱くなることを示唆する結果が得られた。これは、CaM の疎水性部位の露出により水分子の配向性が乱れたことに起因するものと考えている。同様な測定をマグネシウム存在下でも行ったが、マグネシウムイオンの添加による界面水の構造変化は観測されなかった。以上の結果から、今回観測された結果はカルシウムイオンとの結合によって引き起こされた CaM の構造変化によるものであることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：表面物理化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：界面水、生体分子、表面和周波分光、振動分光

## 1. 研究開始当初の背景

生体反応の多くは、細胞膜表面などの界面での反応が重要な役割を果たしている。したがって反応を理解するためには界面における分子（水、タンパク質、脂質など）の構造あるいは動的挙動を反応が進行しているその場で、かつ高い空間・時間分解能で明らかにすることが重要であると考えられる。申請者はこれまで、界面選択的な振動分光法の一つである和周波発生（Sum Frequency Generation: SFG）分光法により固体表面での化学反応をピコ秒の時間スケールで追跡してきた。SFG分光法は二次的非線形光学現象をベースにした分光法のため、界面のみの情報が選択的に得られる。波長可変の赤外レーザーと波長固定の可視レーザーを用いる SFG 分光法では、分子の振動遷移エネルギーに赤外波長が共鳴すると SF 光の強度が増強されるため、赤外波長を走査することで界面にいる分子の振動スペクトルが得られる。この SFG 分光法はバルクに存在する分子種に妨害されることなく界面の有機分子や水の構造を観測することが可能であり、生体反応を分子レベルで追跡するうえで非常に有効な測定法となる。またパルスレーザーを用いることから、レーザーのパルス幅で決まる極めて高い時間分解能（ピコ秒、フェムト秒）も有している。しかし、空間分解能という観点では極めて不十分なものであった。そこで、SFG 分光法に新たに高い空間分解能を付け加えた顕微分光システムを新たに開発することで、例えば生体分子の機能発現に重要な役割を果たしていると言われていた生体分子界面水のダイナミクスについて追跡を行うことが出来る。このような時間分解 SFG 顕微分光システムの開発は生命現象の解明に大きく貢献できると確信し、本研究を提案するにいたった。

## 2. 研究の目的

生体分子は水環境の中にあり（人体のおよそ60%は水）、生命活動を支える多くの化学反応には水が積極的に関与している。例えば、タンパク質がその機能を発現するためには、タンパク質自身の構造変化と共に、その周囲の水の構造も大きく変化することが知られている。しかしながら、タンパク質の反応場である水分子がタンパク質の構造変化にどのような影響をおよぼしているのか、またどれくらいのタイムスケールでタンパク質が構造変化するのかといった点についてはいまだ不明な点が多く存在する。タンパク質表面の水の構造を明らかにすることの重要性は古くから十分認識されており、これまで構造決定のための手法として、X線回折（XRD）法と核磁

気共鳴（NMR）法が主に用いられてきた。しかし、XRD法は結晶化が可能な試料にしか適用することができない。また、NMR法は溶液中の分子構造について有用な情報は得られるが高速ダイナミクスを追跡することが出来ない、といった問題があった。このような状況に対し、（超）短パルス光を用いる振動分光法（赤外吸収分光法、Raman散乱分光法、SFG分光法）は実時間で分子の構造を追跡・議論するのに極めて有効な測定手法となり、これまで数々の生体分子に適応した例が報告されてきた。しかし、タンパク質が実際に存在する水環境下での表面近傍の水（界面の水）の構造を直接的に決定・議論することはこれまで行われていない。

そこで本研究は、タンパク質等の生体分子が実際に生きて存在する水環境下での生体分子周辺の水の構造および水との間に働く相互作用（水素結合など）をリアルタイムで追跡することで、タンパク質の構造と機能発現におよぼす水の影響について速度・分子論的に解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### （1）固体表面に固定化された生体分子の水和構造の観測

SFGは二次的非線形光学過程であり、中心対象性をもつ媒体からは発生しない。そのため、溶液中に均一に分散したタンパク質周辺の水の構造決定等には不向きであるといふ欠点がある。しかし、目的とするタンパク質を固体表面に配列・固定化することによって、SFG測定は可能になると考えられる。複雑な高次構造を持つタンパク質を、その性質を壊すことなく固体表面に化学的に固定化する方法として既に“His-tag”と呼ばれる技術が確立されている（図2）。このようにして構築したタンパク質周辺の水の構造および、分子間相互作用に関する知見をSFG顕微分光により得る。また、細胞膜の基礎となる脂質二分子膜界面の水についても同様な知見を得る。

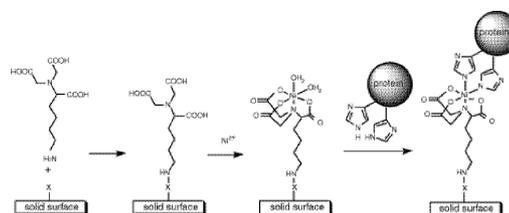


図2 His-tag法によるタンパク分子の表面固定化

### （2）探針増強SFG顕微鏡の開発

既存のフェムト秒（fs）ブロードバンドSFG分光システムを用い、原子間力顕微鏡（AFM）と組み合わせた「探針増強 SFG 顕

微システム」の開発を行う。SFG 測定のためのレーザー光は図2のように試料の裏面から入射する内部反射型の光学配置をとり、AFM のカンチレバーを上部から試料表面へ近づける。このようなセットアップを市販の倒立顕微鏡システム内に構築し、まずは固体／液体界面での探針増強効果の確認を行う。ラマン測定において nm サイズの金属探針を試料に近づけると信号が増強されることが知られており（探針増強ラマン散乱）、ラマン成分を含む SFG においても同様の増強が期待できる。金属でコートした導電性探針を界面から遠ざけておけば、従来通りの SFG スペクトルが得られ、探針を近づけることにより探針直下の数十 nm 領域からの信号が優勢となるものと予想される。この場合、通常の SFG 測定系をそのまま利用するため、入射赤外光及び可視光、そして出射 SF 光の偏光を規制でき、種々の偏光の組み合わせで測定することにより、界面に存在する分子の配向を決定できる。従来の SFG 分光では、分子集団の平均配向角しか得られないが、本システムでは数十 nm 領域に存在する分子のみの配向角が得られ、生体分子膜やキラル膜など応用範囲は広い。さらに、この方法では AFM による表面形状と振動モードの分布を同時測定することが可能となる。申請者の研究室ではこれまで金属/溶液、石英/溶液界面およびその表面を有機単分子層で修飾した界面の水の検出には既に成功している。従って界面水由来の SFG 信号の増強効果の確認は、比較的容易に実現できるものと考えている。

#### 4. 研究成果

##### (1) 生体分子の固体表面への固定化

複雑な高次構造を持つタンパク質を、その性質を壊すことなく固体表面に化学的に固定化する方法を確立した。本研究では Ca イオン受容性タンパクであるカルモジュリン (CaM) の金基板上への固定化を行った。(図3) CaM は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化のシグナルを伝達する Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質である。このシグナル伝達系は筋収縮をはじめとする多くの生理現象に関わっており、CaM の酵素活性メカニズムの解明は非常に重要である。しかし、これまでの CaM の酵素活性に関する多くの研究は間接的手法によるもので、リアルタイムで直接観測した例は少ない。そこで本研究は CaM を固体基板上に固定化させ、Ca<sup>2+</sup>濃度変化に応じた CaM の構造変化および CaM 結合ペプチドである Mastoparan(MP)との結合・解離のプロセスを実時間追跡することで、固体基板上での CaM の動的挙動を明らかにした。

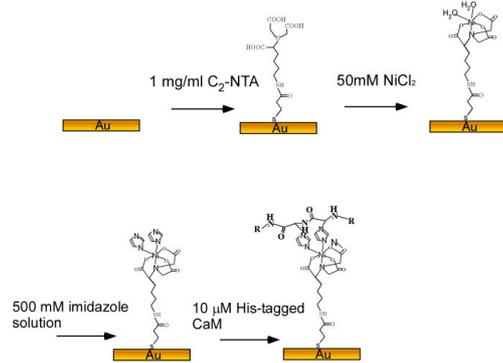


図3 CaM の金基板上への固定化スキーム

図4は金基板上に固定された CaM の各 Ca<sup>2+</sup>濃度のリン酸緩衝液中におけるアミド領域 (1500~1750 cm<sup>-1</sup>) の赤外吸収スペクトルである。リファレンスは Ca<sup>2+</sup>を含まないリン酸緩衝液中で測定した結果を用いた。Ca<sup>2+</sup>濃度が 10<sup>-7</sup>M (図4(a)) から 10<sup>-3</sup> M (図4(e)) へ上昇するにつれて、1550 cm<sup>-1</sup> と 1634 cm<sup>-1</sup> に上向きのピークが出現した。これらはそれぞれ CaM の EF ハンド内の酸性残基 (Asp、Gln) が Ca<sup>2+</sup>と配位結合した際に出現するピークとセントラルヘリックスが伸びた構造をとる際に出現するピークに帰属される。また再び Ca<sup>2+</sup>濃度が 10<sup>-3</sup> M から 10<sup>-7</sup>M (図4(i)) へ減少するとこれらのピークは消失した。この結果は過去に報告されている均一系の結果と比べて同様なスペクトルの変化を示したことから固体基板上に固定化された CaM は均一系と同様に振舞っていることが分かった。

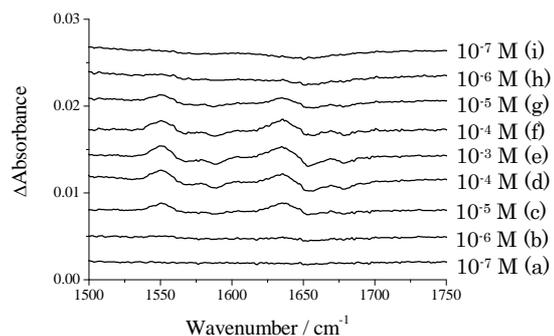


図4 各 Ca<sup>2+</sup>濃度の液中における金基板上に固定された CaM の IR スペクトル。

このように作製した CaM 固定化基板を用いて、CaM の標的酵素のモデルペプチドとして用いられている MP との結合・解離過程を調べた。図5は、CaM 固定化基板および CaM なし基板にそれぞれ Ca<sup>2+</sup>と MP を含むリン酸緩衝液中で測定した赤外吸収スペクトルで

ある。リファレンスはMPを含まないリン酸緩衝液中で測定した結果を用いた。CaMあり基板では $1653\text{ cm}^{-1}$ に、またCaMなし基板では $1647\text{ cm}^{-1}$ にそれぞれMP由来のピークが観測された。両者のピーク波数の違いから、CaM固定化基板では、MPは $\alpha$ -Helix構造を保持した状態でCaM内部に取り込まれており、一方CaMを固定化していない基板ではMPはランダムコイル状で固体基板上に吸着していることが示唆された。

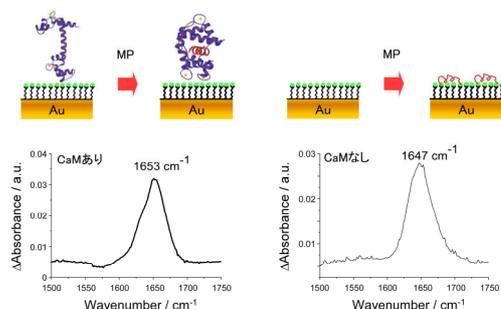


図5 CaM固定化および未固定化基板の $\text{Ca}^{2+}$ 、MPを含むリン酸緩衝溶液中におけるアミド領域のIRスペクトル

また、MPの濃度依存性の測定を行い、CaMとMPとの解離定数を求めた結果、均一系と比べてMPが結合し難いことが示された。これはCaMのN末端がHis-tagによって固定されてCaMの自由度が減少したため、または高い表面密度によりMP結合部位が隠れてしまったためと考えられる。

## (2) 生体分子周囲の水の構造評価

タンパク質の生体内での構造・機能発現において周囲の水が大きな役割を果たしている事は良く知られており、タンパク質表面の水の構造を明らかにすることの重要性は十分認識されている。しかし、これまでの研究はX線解析、低温NMR、熱測定などが主な手法として用いられているが、タンパク質が実際に存在している状態での表面近傍の水のみの構造を直接的に決定することはほとんど行われていない。そこで本研究で $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパク質であるCaMをHis-tag法により活性を保持した状態で固体基板上に固定し、和周波発生(SFG)分光法によりCaM周囲の水の構造評価および $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存した構造変化に伴うCaM周囲の水分子の動的挙動を分子レベルで追跡した。

図6はCaMを結合させる前のimidazole/水溶液界面(a)、CaMを結合後のCaM/水溶液界面(b)のOH伸縮領域のSFGスペクトルの $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性である。各々の図の縦軸は $\text{Ca}^{2+}$ を添加する前のスペクトル強度で規格化した。 $3200\text{ cm}^{-1}$ 、 $3400\text{ cm}^{-1}$ に2つのブロードなピークが観測され、それぞれ強く水素結合した水

のOH伸縮振動(ice-like water)、弱く水素結合した水のOH伸縮振動(liquid-like water)に帰属される。imidazole/水溶液界面では $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が増加してもスペクトルはほとんど変化しなかった。わずかにスペクトル強度が減少したが、これはイオン強度の増加により界面の電気二重層が薄くなり、二重層に配向していた水分子が減少したためだと考えられる。一方、CaM/水溶液界面ではimidazole/水溶液界面と比べてスペクトル強度の大きな減少が観測された。スペクトル強度は界面に配向した水分子の数を反映しているため、スペクトル強度の減少からCaM周囲に配向していた水分子が減少したことが考えられる。また得られたスペクトルをフィッティングし、liquid-like waterのピーク面積に対するice-like waterのピーク面積比を求めた(表1)。imidazole/水溶液界面では $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇しても、liquid-like waterよりもice-like waterが優勢であり、imidazole-Ni-NTA分子周囲に配向している水分子は強い水素結合を形成したままであることがわかる。一方、CaM/水溶液界面では $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇するにつれて、ice-like waterの相対強度が小さくなっている。したがって、CaMが $\text{Ca}^{2+}$ と結合することで、CaM周囲に配向している水分子間の水素結合が弱くなることが考えられる。これらは $\text{Ca}^{2+}$ との結合、またはそれに伴うCaMの構造変化に起因するものと考えられる。CaMは細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が $10^{-4}\text{ M}$ になると $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位であるEFハンドで $\text{Ca}^{2+}$ と結合し、CaM内部に内包されていた疎水性部位が溶媒中に露出することが知られている。したがって、EFハンド内の酸性残基が $\text{Ca}^{2+}$ と結合した際にマイナスチャージが減少し、酸性残基と相互作用していた水分子が解離した、あるいは疎水性部位の露出により水分子の配向性が乱れたためスペクトル強度が減少し、周囲の水分子間の水素結合が弱まったものと考えられる。

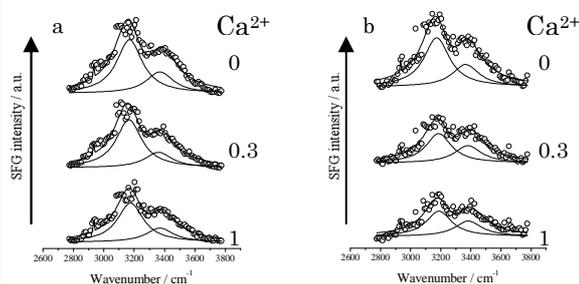


図6 imidazole/水溶液界面(a)とCaM/水溶液界面(b)におけるOH伸縮領域のSFGスペクトルの $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性。

表1 図6の liquid-like water のピーク面積に対する ice-like water のピーク面積比

	0 mM	0.3 mM	1 mM
	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
Imidazole / 水溶液界面	2.82	3.33	2.72
CaM / 水溶液界面	2.76	1.44	1.30

CaMはEFハンドでMg<sup>2+</sup>とも結合することが知られている。しかし、NMRによる結果からはMg<sup>2+</sup>の結合によるCaMの構造変化は非常に小さく、結合部位であるEFハンド近辺のみに限られる。<sup>35</sup>そこでMg<sup>2+</sup>濃度に依存したCaM周囲の水分子の構造変化を調べた。図7はCaM/水溶液界面のOH伸縮領域のSFGスペクトルのMg<sup>2+</sup>濃度依存性である。これよりCa<sup>2+</sup>濃度上昇時と同様のスペクトル強度の大きな減少が観測された。したがって、Mg<sup>2+</sup>との結合に伴い、CaM周囲の水分子が減少したことが考えられる。また得られたスペクトルをフィッティングし、liquid-like waterのピーク面積に対するice-like waterのピーク面積比を求めたが、これもCa<sup>2+</sup>のときと同様の結果であった(表2)。したがって、Ca<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>に対するスペクトルの変化がほぼ同じであったことからSFG測定により観測された水の構造変化はCaMのEFハンド周囲に構造化した水分子によるものであると考えられる。MingjieらはNMRとX線結晶構造解析によりCa<sup>2+</sup>非結合型CaMとCa<sup>2+</sup>結合型CaMの構造を比較し、Ca<sup>2+</sup>非結合型CaMのC末端およびN末端の表面では非常に多くの酸性残基が溶媒中に露出しており、Ca<sup>2+</sup>と結合することで逆に疎水性残基が露出することが示されている。したがって、Ca<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>と結合することでEFハンド内の酸性残基のマイナスチャージが減少し、そこに結合していた水分子の水素結合が弱まり、水分子の解離が起こったと考えられる。

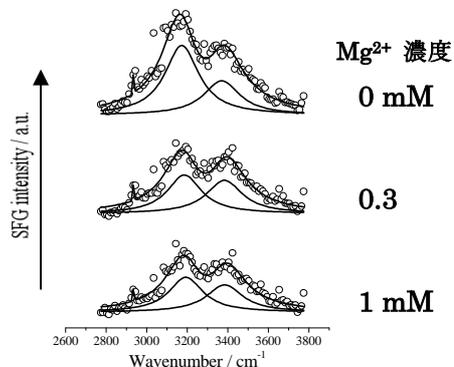


図7 CaM/水溶液界面におけるOH伸縮領域のSFGスペクトルのMg<sup>2+</sup>濃度依存性。

表2 図7の liquid-like water のピーク面積に対する ice-like water のピーク面積比

	0 mM	0.3 mM	1 mM
	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
CaM / 水溶液界面	2.78	1.20	1.23

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1) Hidehiko Asanuma, Hidenori Noguchi, Kohei Uosaki, and Hua-Zhong Yu  
"Metal Cation-Induced Formation of DNA Self-Assembled Monolayers on Silicon: Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy"  
*J. Am. Chem. Soc.* **130**(25), 8016-8022 (2008).  
(査読有)

2) Hidenori Noguchi, Tsubasa Okada, and Kohei Uosaki  
"SFG study on potential dependent structure of water at Pt electrode/electrolyte solution interface"  
*Electrochim. Acta* **53**(23), 6841-6844 (2008).  
(査読有)

3) Hidenori Noguchi, Minowa Hiroshi, Taiki Tominaga, Jian Ping Gong, Yoshihito Osada and Kohei Uosaki  
"Interfacial water structure at polymer gel/quartz interfaces investigated by sum frequency generation spectroscopy"  
*Phys. Chem. Chem. Phys.*, **10**(32), 4987-4993(2008).  
(査読有)

4) Hidenori Noguchi, Tsubasa Okada, and Kohei Uosaki  
"Molecular structure at electrode/electrolyte solution interfaces related to electrocatalysis"  
*Faraday Discuss.*, **140**(1), 125-137 (2008).  
(査読有)

[学会発表] (計9件)

1) 野口秀典、石丸剛士、魚崎浩平  
「電気化学ブロードバンドSFG分光法によるアルカリ溶液中でのCO酸化反応のその場追跡」  
日本化学会第89回春季年会  
平成21年3月28日(日本大学 船橋)

2) 野口秀典、安達龍彦、中富 晶子、矢澤 道生、魚崎 浩平

「赤外分光法による金基板上に固定化した Calmodulin の構造・機能評価」

日本化学会第 89 回春季年会

平成 21 年 3 月 28 日 (日本大学 船橋)

3) 野口秀典

「界面 (光) 機能とダイナミクスに関する研究」

化学系学協会北海道支部 2009 年冬季研究発表会

平成 21 年 2 月 3 日 (北海道大学 札幌)

4) 野口秀典、岡田翼、魚崎浩平

「和周波数発生分光法による電極/溶液界面構造のその場追跡」

第 28 回表面科学学術講演会

平成 20 年 11 月 14 日 (早稲田大学 東京)

5) 野口秀典、安達龍彦、中富 晶子、矢澤 道生、魚崎 浩平

「赤外分光法による固体基板上に固定化した Calmodulin の構造機能評価」

第 2 回分子科学討論会

平成 20 年 9 月 25 日 (福岡国際会議場 福岡)

6) 野口秀典、安達龍彦、中富 晶子、矢澤 道生、魚崎 浩平

「赤外分光法による固体基板上に固定化した Calmodulin の構造機能評価」

第 61 回コロイドおよび界面化学討論会

平成 20 年 9 月 7 日 (九州大学 福岡)

7) Hidenori Noguchi, Tsubasa Okada and Kohei Uosaki

"Molecular structure at electrode/electrolyte solution interfaces related to electrocatalysis"

Faraday Discussion 140: Electrocatalysis-Theory and Experiment at the Interface

平成 20 年 7 月 8 日 (Southampton Univ. United Kingdom)

8) 野口秀典、岡田翼、魚崎浩平

「和周波発生分光法による金属/電解質溶液界面の水の構造評価」

日本化学会北海道支部夏季研究発表会

平成 20 年 7 月 19 日 (北見工業大学 北見)

9) 野口秀典、脇悠介、魚崎浩平

「和周波発生分光法による温度応答性ポリマーの構造評価」

日本化学会第 88 回春季年会

平成 20 年 3 月 29 日 (立教大学 東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 秀典 (NOGUCHI HIDENORI)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号: 60374188

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし