

令和元年6月17日現在

機関番号：32702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K17784

研究課題名(和文) 超高速時間分解分光によるヘムたんぱく質光乖離機構解明

研究課題名(英文) Photodissociation mechanism of heme protein studied by ultrafast spectroscopy

研究代表者

藪下 篤史 (Yabushita, Atsushi)

神奈川大学・付置研究所・客員教授

研究者番号：20376536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムたんぱく質は生体内で重要な機能を持っており、ヘモグロビンは呼吸で得た酸素を体内に輸送しエネルギーを与え、一酸化窒素合成酵素(NOS)から発生する一酸化窒素(NO)は血流、神経伝達、免疫をコントロールする。これらの機能のトリガーとなる初期過程は分子のヘムたんぱく質からの超高速乖離であるが、その重要性にもかかわらず、未だその詳細は明らかにされていない。本研究課題ではこれらの乖離過程を明らかにするため、独自の超短パルスレーザー光源を開発し、これを用いた超高速分光実験を行いNOSの超高速反応ダイナミクスを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘムたんぱく質は生体内で重要な機能を持っており、ヘモグロビンは呼吸で得た酸素を体内に輸送しエネルギーを与え、一酸化窒素合成酵素(NOS)から発生する一酸化窒素(NO)は血流、神経伝達、免疫をコントロールする。これらの機能のトリガーとなる初期過程は分子のヘムたんぱく質からの超高速乖離であり、本研究課題では超短パルスレーザー光源を開発することにより、NOSをはじめ様々な物質の超高速反応メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Heme protein plays important roles in vivo; hemoglobin transports oxygen obtained by respiration to produce energy at each part inside of the body, and nitric oxide (NO) generated by NO synthase (NOS) controls blood flow, neurotransmission, and immunity. The primary processes of these functions are triggered by ultrafast dissociation of diatomic molecules from those heme proteins. Despite the importance of the primary process, its detail mechanism is still not been elucidated.

In this project, I have developed my own ultrashort pulse laser system to study the ultrafast primary process, and applying the ultrashort pulse laser, I have elucidated the initial reaction mechanism of NOS.

研究分野：超高速分光

キーワード：超高速分光 フェムト秒レーザー ヘム蛋白 光反応

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素(NO)は生体内で重要な役割を担っており、血流の制御、神経伝達、免疫などの細胞の活性を制御する役割を持つ。これらのNOSは単量中に還元部位(reductase domain)と酸化部位(oxygenase domain)をもちそれらがカルモジュリン(CaM)によってつながれており、一般に2量体(dimer)として体内に存在する。

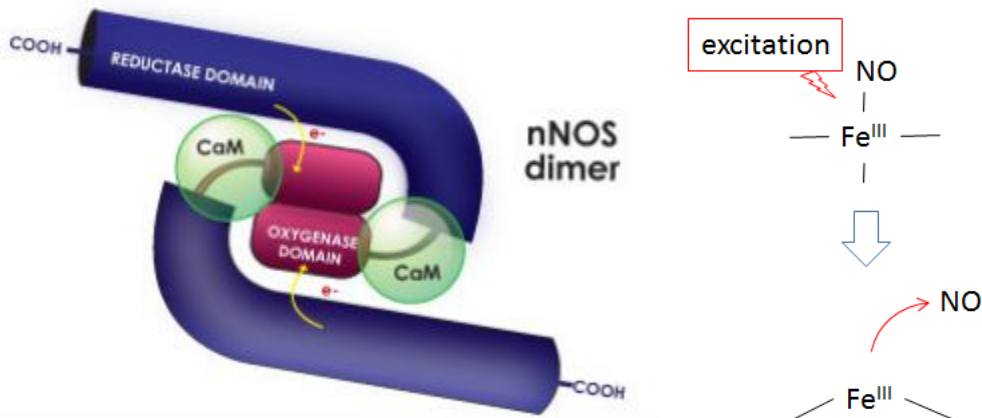


図1 (左) nNOSの構造模式図。(右)酸化部位からの一酸化窒素の超高速乖離模式図。

NOは還元部位から酸化部位へ電荷移動が起きた後に、酸化部位中のヘムから乖離される。この最重要である乖離過程はフェムト秒オーダーの超高速で起きるため、その機構解明には超短パルスを用いた超高速分光が必須となる。

生物学上の重要性からNOSは広く研究されてきており、定常状態、準定常状態の分光がミリ秒の時間スケールで明らかにされている。また近年ではピコ秒領域で時間分解分光もなされている(W. Belliston-Bittner et al., J. Am. Chem. Soc., 127, 15907-15915 (2005), I. Mikula et al, Biochem. J. 418, 673-682 (2009))。しかしながら既述の超高速の乖離過程を含め、NOSの反応初期過程の機構は未だに不明であった。

同様に生体内で重要な役割を持つヘムたんぱく質であるヘモグロビンは、体内で酸素の輸送を行うがこの場合は酸素分子がヘムに結合し輸送され、目的の場所で酸素をヘムから乖離することで機能する。

ヘモグロビンの超高速分光はなされてきており、これまでに申請者の先行研究でその酸素分子の光乖離が45フェムト秒という非常に速い時間で起きることが明らかにされた。一方、ヘモグロビンには一酸化炭素が強固に結合するため、酸欠を起こすことも知られている。酸素以外の分子のヘモグロビンからの超高速乖離過程については未だ不明である。

これらのヘムたんぱく質の反応初期過程を明らかにするためには、超短パルスレーザー光源を用いる必要があり、また市販光源では得られないため独自に光源開発を行う必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題ではこれらヘムたんぱく質からの分子の超高速乖離過程を明らかにするために、超高速分光の手法を用いて観測することを目的とする。一酸化窒素合成酵素は研究協力を行っている Academia Sinica の Dr. Pei-Feng Chen から提供を受け、ヘモグロビンはフェロ安定化した市販の試料を用いる。

測定手法としては時間分解吸収分光と時間分解蛍光による二つの手法で測定を行う。前者においてはフェムト秒光源及び分光装置が必要となるが、これまで同大学の岩倉いずみ准教授のもとに共同で構築済みのものを使用する。後者に関しては、本研究で購入する装置により測定する。

紫外フェムト秒パルスを用いたポンププローブ時間分解吸収分光では、ヘムたんぱく質のヘムが持つ固有の紫外吸収バンドを効率よく励起できるため、光乖離過程のダイナミクスが精度よく観測できる。また紫外励起可視プローブによる時間分解吸収分光では、ヘム中のポルフィリンリングの構造変化を反映する可視吸収バンドを観測するため、光乖離後の分子構造変化が解明される。

フェムト秒、ピコ秒のダイナミクスは上記のとおり時間分解吸収分光を用いて明らかにする。またそれに連なるナノ秒以降のダイナミクスは時間分解蛍光を時間相関単一光子係数法を用いて

観測する。これらの測定結果を合わせることにより、ヘムたんぱく質の光乖離過程とそれに連なる反応が完全に明らかとなる。

3. 研究の方法

ヘムたんぱく質試料である一酸化窒素合成酵素は研究協力を行っている Academia Sinica, Taiwan の Dr. Pei-Feng Chen から提供を受ける。

チタンサファイア再生増幅器から発生した近赤外フェムト秒パルス为非線形結晶に照射することで、第2高調波(SH)である紫外フェムト秒パルスを発生させる。神奈川大学内の研究協力者である岩倉いずみ准教授の研究室に共同で構築済みの紫外励起可視プローブ時間分解吸収分光装置を用いて、フェムト秒及びピコ秒の光乖離ダイナミクスの測定を可視域に現れる分子構造変化に焦点を当てて研究を行う。**神奈川大学では独自のフェムト秒時間分解吸収分光システムの構築のため、ファイバーレーザーの構築を並行して進める。**

超高速光乖離は100フェムト秒より速い時間で進行する可能性もあるため、National Chiao-Tung University, Taiwan で研究協力者と構築中の超短パルス紫外レーザーを完成させ、30フェムト秒を上回る時間分解能で時間分解吸収分光を行い、その結果を合わせることにより超高速光乖離が観測可能となる。アルゴンガスで満たした中空ファイバー中をSHパルスが通ることにより紫外広帯域パルスとなり、時間圧縮することで紫外超短レーザーパルスを作成する。

4. 研究成果

(1) 内皮一酸化窒素合成酵素の酸化部位(eNOS-oxy)の配位子や基質との相互作用の超高速ダイナミクス

チタンサファイアレーザーから発生させた35フェムト秒近赤外レーザーパルスを非線形結晶に集光し、第二高調波である近紫外フェムト秒レーザーパルスを発生させた。この近紫外フェムト秒レーザーパルスを用いてeNOS-oxy試料のポンププローブ分光を行った。

試料は、eNOS-oxy及びそれにイミダゾール配位子を添加したもの、L-Arg基質を添加したものの三種類を使用し、eNOS-oxyが配位子や基質と起こす相互作用がもたらす超高速ダイナミクスへの影響を評価した。

ポルフィリンの $\pi-\pi^*$ 遷移に対応するソーレー吸収帯は酸化、配位、ヘム鉄のスピン状態に敏感である。NOSは通常6配位の低スピン状態を取っており、水分子が配位していると考えられる。BH4が添加されることにより、分子構造が変化し、配位していると考えられる水分子が不安定になる。何も添加を行わない状態においてはeNOS-oxyは400nm付近に吸収ピークを持っている。L-ArgとBH4がNOSと共存する場合、吸収ピークは395nmに短波長シフトしたが、これは5配位である高スピン状態へ遷移したことを示している。一方、イミダゾールを添加した場合は、水分子の代わりにイミダゾールが強く配位し6配位状態となり、その結果吸収スペクトルの430nmへの長波長シフトとして観測されていると考えられる。L-Arg、イミダゾールともに添加していない場合は、これら5配位状態と6配位状態の中間的な状態となり、吸収ピーク波長も中間的な400nm付近に観測されていると考えられる。

より詳細な反応メカニズムの違いは超高速分光を行うことによって初めて明らかにされると考えられるため、近紫外フェムト秒レーザーパルスを発生させ、これらの試料の時間分解分光測定を行った。その結果下記のような知見が得られた。

イミダゾールを添加したeNOS-oxyではヘム-イミダゾールの結合が300フェムト秒で乖離し蛋白の構造変動を引き起こし、その後2ピコ秒でポルフィリンの局所構造緩和を伴う振動緩和が観測された。ヘム部位周辺の局所的な構造変動は数十ピコ秒で緩和し、最終的に144ピコ秒で元の状態に緩和した。

L-Argを添加したeNOS-oxyでは、振動エネルギーの再分配が400フェムト秒で進行し、中心金属からポルフィリンへの電荷移動は1.4ピコ秒で起きた。

何も添加しない原型のeNOS-oxyでは5配位状態と6配位状態の中間的な状態であると考えられ、光励起の後0.79ピコ秒で水分子が高速に光乖離し、非平衡な5配位状態が生成した。その後、電荷移動とともに起きる振動冷却がヘム-水の再結合とともに4.76ピコ秒でおき、12.2ピコ秒でのヘムの緩和へと続くのが観測された。

(2) 内皮一酸化窒素合成酵素の酸化部位(eNOS-oxy)の可視領域超高速分光

eNOS は紫外領域に強い吸収を持つため、さまざまな種類の eNOS 試料の緩和ダイナミクスを比較するには紫外領域ポンププローブ法による測定が最適であった。紫外領域であるソーレー吸収帯の電子状態ダイナミクスを調べるには十分だが、可視領域である Q バンドおよび電荷移動 (CT) バンドの電子状態ダイナミクスを調べることができなかった。

チタンサファイアレーザーから発生させた 35 フェムト秒近赤外レーザーパルスをビームサンブラーを用いて強度比 9 : 1 で分割した。高強度の近赤外レーザーパルスは、非線形結晶に集光し、第二高調波である近紫外フェムト秒レーザーパルスを発生させるのに用いた。一方弱近赤外レーザーパルスはサファイア板に集光することにより、広帯域スペクトルの白色可視レーザーパルスを発生させた。近紫外フェムト秒レーザーパルス、広帯域白色可視レーザーパルスをおの励起光、プローブ光として eNOS-oxy 試料のポンププローブ分光を行った。

測定された過渡吸収信号に対してグローバルフィッティング解析と 2 次元相関分光による解析を行い、お互いに矛盾しない下記のような緩和ダイナミクスが見出された。

ソーレー吸収帯へ励起された後、Q バンドへの遷移 (0.16 ピコ秒)、配位子の乖離と CT (0.94 ピコ秒)、CT 状態の緩和 (4.0 ピコ秒)、配位子の再結合 (59 ピコ秒) の順番で起きることが明らかになった。

(3) 10 フェムト秒近紫外パルスレーザー開発と反応機構解析への応用

9,9 ビアントリルは光励起により局所励起状態を生成し、極性溶媒中ではその後、分子内電荷移動により電荷移動状態となると考えられている。一方、非極性溶媒中では電荷移動状態が不安定であるため、二つのアントラセン環の間で双極子の振動が起きると考えられている。

局所励起状態や電荷移動状態における緩和過程において、二つのアントラセン環をつなぐ C-C 結合が変化すると考えられている。

10 フェムト秒近紫外パルスレーザーを開発することにより、分子振動が時間領域で測定可能となり、分子振動のダイナミクスが可視化できるようになった。9,9 ビアントリルの光反応に適用することで、C-C 結合の伸縮振動数が 500 フェムト秒で復元することが観測され、電子励起状態において C-C 結合のねじれがその周期で起きていることが明らかになった。

また極性溶媒、非極性溶媒における測定結果においてねじれ周期の変化が見られなかったことから、その分子内電荷移動は二つのアントラセン環をつなぐ C-C 結合のねじれには影響を及ぼさないということが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Li, Che-Ming; Lo, Hsin-Pin; Chen, Liang-Yu; Yabushita, Atsushi; “Experimental verification of multidimensional quantum steering”, *Optics Communications*, 410, 956-960 (2018)
2. Hashimoto, Sena; Yabushita, Atsushi; Kobayashi, Takayoshi; Okamura, Kotaro; Iwakura, Izumi; “Direct observation of the change in transient molecular structure of 9,9'-bianthryl using a 10 fs pulse UV laser”, *Chemical Physics*, 512, 128-134 (2018)
3. Ko, Ying-Kuan; Huang, Yan-Hao; Le, Phuoc Huu; Luo, Chih-Wei; Gospodinov, Marin Mirtchev; Kobayashi, Takayoshi; Yabushita, Atsushi; “Ultrafast dynamics of coherent optical phonon in a thin film of Bi₃Se₂Te”, *Chemical Physics*, 512, 62-67 (2018)
4. Hung, Chih-Chang; Chen, Xiao-Ru; Ko, Ying-Kuan; Kobayashi, Takayoshi; Yang, Chii-Shen; Yabushita, Atsushi; “Schiff Base Proton Acceptor Assists Photoisomerization of Retinal Chromophores in Bacteriorhodopsin”, *Biophysical Journal*, 112, 2503-2519 (2017)
5. Hashimoto, Sena; Yabushita, Atsushi; Iwakura, Izumi; “Real-time observation of interfragment vibration and charge transfer within the TCNQF(4) dimer”, *Chemical Physics*, 493, 56-60 (2017)
6. Hung, Chih-Chang; Yabushita, Atsushi; Kobayashi, Takayoshi; Chen, Pei-Feng; Liang, Keng S.; “Ultrafast relaxation dynamics of nitric oxide synthase studied by visible broadband transient absorption spectroscopy”, *Chemical Physics Letters*, 683, 619-624 (2017)
7. Hashimoto, Sena; Yabushita, Atsushi; Iwakura, Izumi; “Transient process spectroscopy for the direct observation of inter-molecular photo-dissociation”, *Structural Dynamics*, 4, 54901 (2017)
8. Xue, Bing; Yabushita, Atsushi; Kobayashi, Takayoshi; “Ultrafast dynamics of uracil and thymine studied using a sub-10 fs deep ultraviolet laser”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18, 17044-17053 (2016)
9. Hung, Chih-Chang; Yabushita, Atsushi; Kobayashi, Takayoshi; Chen, Pei-Feng; Liang, Keng S.; “Ultrafast dynamics of ligand and substrate interaction in endothelial nitric oxide synthase under Soret excitation”, *Biophysical Chemistry*, 214, 11-16 (2016)

10. Hashimoto, Sena; Yabushita, Atsushi; Kobayashi, Takayoshi; Iwakura, Izumi; “Real-time measurements of ultrafast electronic dynamics in the disproportionation of [TCNQ](2-)(2) using a visible sub-10 fs pulse laser”, Chemical Physics Letters, 650, 47-51 (2016)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Ying-Kuan Ko; Takayoshi Kobayashi; Atsushi Yabushita; “Development of Ultrafast Near-Ultraviolet and Deep-Ultraviolet Laser Pulses”, 10th Asian Photochemistry Conference, Taipei, Taiwan, December 16-20, 2018
2. Sena Hashimoto; Atsushi Yabushita; Takayoshi Kobayashi; Izumi Iwakura; “Ultrafast Spectroscopy using a UV sub-10-fs Pulse Laser to Clarify Solvent Effect on the Photo-reaction in 9,9'-bianthryl”, 10th Asian Photochemistry Conference, Taipei, Taiwan, December 16-20, 2018
3. Izumi Iwakura; Sena Hashimoto; Kenta Hamada; Atsushi Yabushita; Hiroataka Fujita; Yuta Ono; Noriko Chikaraishi; Kazuo Yamaguchi; “Takayoshi Kobayashi; Izumi Iwakura; “Real-time measurements of ultrafast electronic dynamics of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl acetate using sub-10 fs laser pulses”, 10th Asian Photochemistry Conference, Taipei, Taiwan, December 16-20, 2018
4. Takahiko Murakami; Sena Hashimoto; Atsushi Yabushita; Takayoshi Kobayashi; Izumi Iwakura; “Excitation wavelength dependence of ultrafast intramolecular charge transfer”, 10th Asian Photochemistry Conference, Taipei, Taiwan, December 16-20, 2018
5. Atsushi Yabushita; Ying-Kuan Ko; Takayoshi Kobayashi; “Ultrafast vibrational dynamics in oxy-hemoglobin observed by sub-10fs laser pulse”, 2018 年光化学討論会、関西学院大学、2018 年 9 月 5-7 日
6. Ying Kuan Ko; Atsushi Yabushita; Bing Xue; Takayoshi Kobayashi, “Development of Ultrafast Near-Ultraviolet and Deep-Ultraviolet Laser Pulses”, OPTIC 2017 (Optics & Photonics Taiwan, International Conference – Annual Meeting of Taiwan Photonics Society), National Sun Yat-sen University, Kaohsiung, Taiwan, December 7-9, 2017
7. 藪下篤史, Chih-Chang Hung, Takayoshi Kobayashi, Pei-Feng Chen, Keng Liang, “紫外、可視フェムト秒パルスによる一酸化窒素合成酵素の超高速ダイナミクス測定”, 日本物理学会第 72 回年次大会、大阪大学、2017 年 3 月 17-20 日
8. 藪下篤史, Hung Chih-Chang, Ko Ying-Kuan, Yang Chii-Shen, 小林孝嘉, “バクテリオロドプシンにおけるプロトンポンプサブチャンネルの超高速ダイナミクス”, 2016 年光化学討論会、東京大学、2016 年 9 月 6-8 日

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：岩倉 いずみ (神奈川大学)

ローマ字氏名：Iwakura, Izumi

研究協力者氏名：Chen, Pei-Feng (Academia Sinica, Taiwan)

ローマ字氏名：Chen, Pei-Feng

研究協力者氏名：Lo, Hsin-Pin (National Chiao-Tung University, Taiwan)

ローマ字氏名：Lo, Hsin-Pin

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。