

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17859

研究課題名(和文) Raman光学活性に基づく生体内反応の立体構造ダイナミクスの観測

研究課題名(英文) Observation of three-dimensional structural dynamics in biological chemical reactions based on Raman optical activity

研究代表者

藤澤 知績 (Fujisawa, Tomotsumi)

佐賀大学・工学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：60633493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ラマン光学活性(ROA)分光法を利用して光受容性タンパク質の反応中間体の立体構造を計測することを目的とした。オレンジカロテノイドタンパク質を対象として過渡的状態のROA測定に初めて成功し、その立体構造を解析した。種々の光受容性タンパク質の中間体に対してROA分光法を応用するために、低温ラマン測定による構造解析を進め、ROA分光法を適用できる良好な中間体のラマンスペクトルを得るに至った。

研究成果の概要(英文)：This research have been aiming to develop Raman optical acitivity (ROA) spectroscopy to track the three-dimensional (3D) structure of the reaction intermediates in photoreceptor proteins. We successfully measured the ROA spectrum for the transient state of orange carotenoid protein and analysed the 3D structure. We also built the low-temperature Raman setup to measure the photo-itnermediates of various photoreceptors . We obtained good Raman data for the photo-intermediates of a couple of photoreceptors, which allows us to apply ROA spectroscopy to the photointermediates.

研究分野：物理化学

キーワード：ラマン光学活性 光受容タンパク質 反応中間体

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の中には、酵素のように化学反応を担うものや、視覚を司る網膜タンパク質のように(光)化学反応とともに機能を発現するものがある。このようなタンパク質の中で化学反応は「活性部位」といわれる反応サイトで起こり、その反応機構を理解するためには活性部位の構造を分子レベルで明らかにすることが重要となる。

タンパク質はアミノ酸が立体的に連なった高分子であるから、その内部の活性部位も反応を実現するための特殊な立体構造を持っている。しかし、タンパク質の反応を研究する上で、従来の分光法の弱点は、3次元的な構造を高精度でみることが困難である点であった。X線結晶構造解析は活性部位も含めたタンパク質の立体的構造の全容を原子レベルで捉える強力な方法であるが、その一般的な空間分解能(約 2Å)では活性部位の分子の正確な立体構造を捉えることは難しい。また赤外・ラマン分光法といった振動分光法では、X線解析では観測しにくい活性部位の水素結合状態や微細な構造変化を検出できる反面、分子の立体構造までは知ることができなかった。そこで、本研究では、これまで見ることが困難であった活性部位の3次元構造の詳細を、分子の立体構造に最も鋭敏とされるラマン光学活性分光法の活用によって明らかにすることを企画した。

2. 研究の目的

本研究は、ラマン光学活性分光法によってタンパク質の活性部位で反応する分子の立体構造を反応過程(始状態 中間体 生成物)において捉えて、その立体的な反応機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(研究対象)

シアノバクテリアの光防護を担うオレンジカロテノイドタンパク質(OCP)と微生物の光駆動型イオンポンプとして知られる微生物型ロドプシンを対象として研究を行った。

(方法 : 散乱円偏光型 ROA 装置の製作)

反応の過渡的な状態からの微弱な ROA 信号を得るために ROA 装置を改良した。改良型 ROA 装置には、ラマン散乱光に含まれる左右円偏光成分と計測して差をとる散乱円偏光方式を採用した。光源には近赤外光を用いて、活性部位で反応する分子からの ROA 信号を選択的に観測した。

(方法 : 低温トラップ法の利用)

測定対象の微生物型ロドプシンは、光励起に伴って活性部位のレチナル分子が光反応を起こして、マイクロ秒~ミリ秒の寿命を持つ反応中間体を形成する。微生物型ロドプ

シンのイオン輸送などの活性はこれら反応中間体の生成とともに発現されるため、中間体の立体構造情報が反応機構だけでなく機能発現機構の理解に重要となる。低温トラップ法を利用して、低温下で反応中間体を安定に補足してラマン/ラマン光学活性測定を行った。

(方法 : 量子化学計算による立体構造決定)

ほぼ全ての振動バンドの符号と強度を含めた ROA スペクトルの特徴を量子化学計算によって再現すれば、分子の立体構造の詳細を知ることができる。反応分子の ROA スペクトルをタンパク質環境で計算し、計算結果と実測スペクトルとの整合性に基づいて、活性部位における反応分子の立体構造を検討した。

4. 研究成果

OCP の過渡的な活性状態の ROA 測定

オレンジカロテノイドタンパク質(OCP)はカロテノイド色素(3'-hydroxyechinenone)を内包した光受容性のタンパク質であり、シアノバクテリアの光合成系を強い光から保護する役割を持つ。光吸収前は OCP^O と呼ばれるオレンジ色の状態であるのに対し、光吸収後に活性化すると OCP^R と呼ばれる赤色の状態(寿命: ~10 秒)に変わることによって光防護能を発揮する。

本研究では OCP の光変換機構を調べるため、ROA 分光法を用いて光活性化におけるカロテノイド色素の立体構造の変化を観測した。この研究は OCP^R のような過渡的な状態の ROA スペクトルを観測した初の研究例であり、この研究で OCP^O と OCP^R の間で起こるカロテノイド色素の立体的な光異性化を溶液中で初めてとらえた。

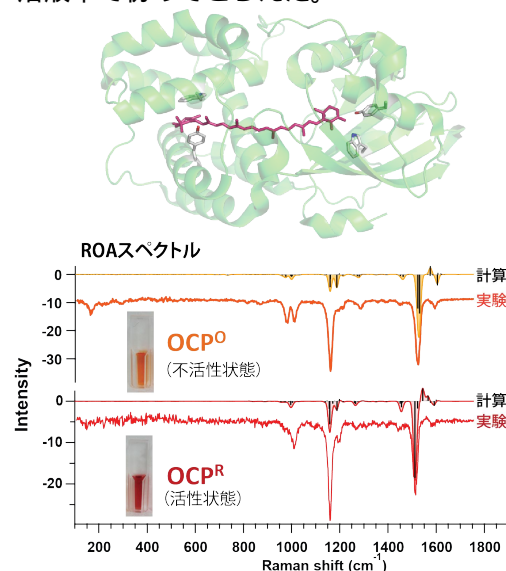
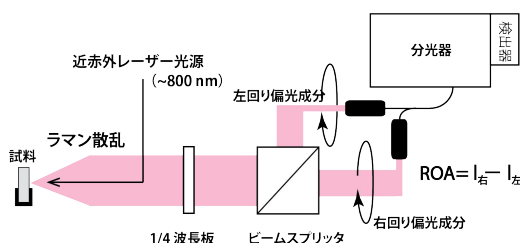


図1 オレンジカロテノイドタンパク質(OCP、上部:結晶構造)の ROA スペクトル. OCP^O (オレンジ): 光照射前の不活性状態、OCP^R (赤): 光照射後に生成する過渡的な活性状態

散乱円偏光方式を採用した ROA 装置の製作と微生物型ロドプシンへの応用

ROA 装置は、これまで入射光の偏光を左右円偏光に切り替えて ROA 信号を得る方式(入射円偏光方式)を用いてきたが、本研究では、ラマン散乱光に含まれる左右円偏光成分と分離・計測して ROA 信号を得る散乱円偏光(SCP)方式へと改良した。SCP 方式では、ラマン散乱光に含まれる左右円偏光成分を同時に計測してラマン散乱光強度の差をとるため、レーザー波長のドリフトや散乱光の揺らぎによるアーティファクトを軽減しやすい。実際に、SCP 方式へ切り替えたことで、これまで信号が弱く、測定が困難であった種々の微生物型ロドプシンについて良好な ROA スペクトルを得ることができた。これらの ROA スペクトルは、タンパク質環境を考慮した量子化学計算によって、(活性部位のレチナル分子の)スペクトルの特徴を概ね再現して立体構造を決定できる段階にある。

(A)



(B)

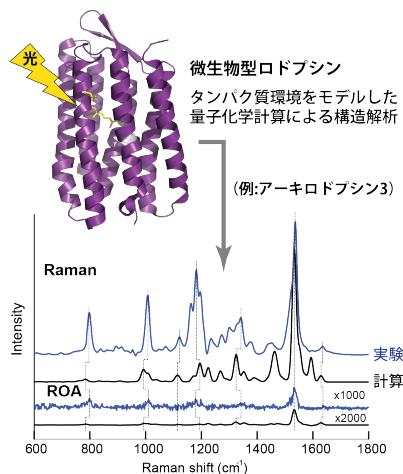


図2 (A) 散乱円偏光方式を採用した ROA 装置 (B) 微生物型ロドプシンのラマン/ROA スペクトルと量子化学計算との比較。

低温ラマン測定による微生物型ロドプシンの反応中間体の観測

本研究の最大の目標は、短寿命(マイクロ秒からミリ秒程度)の反応中間体に対する ROA 測定であった。研究期間において長寿命の過渡的状態の ROA 測定が可能となり、また ROA 装置の改良によって微生物型ロドプシンの微弱な ROA 信号も測定ができるようになった。しかし、低温トラップ法を利用した短寿命中間体の ROA 測定はまだ実現でき

ていない。

現在、低温トラップ法を用いて微生物型ロドプシンを含む種々の光受容タンパク質の初期中間体のラマン測定が可能になった段階である。微生物型ロドプシンの初期中間体は大きくゆがんだレチナル分子を活性部位に持つと考えられているため、その立体的に構造に興味を持たれてきた。本研究において、低温ラマン測定装置を立ちあげて、微生物型ロドプシンの初期中間体の計測を行った結果、微生物型ロドプシンの種類や機能に応じて初期中間体のレチナル分子が特徴的な構造歪みを持つことが明確になった。また、いくつかの微生物型ロドプシンの初期中間体からは非常に強いラマン信号が観測されることが分かったため、今後の ROA 測定への展開が現実的となった。

Naイオンポンプ型ロドプシンのラマンスペクトル

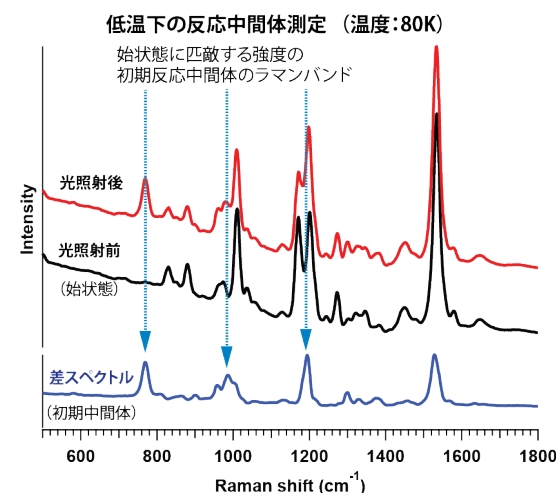


図3 Naイオンポンプ型の微生物型ロドプシンの低温ラマン測定(温度:80K、黒:照射前の始状態、赤:照射後に初期中間体を含む状態)。照射によって初期中間体の強いラマンバンド(青)が現れる。

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 9 件)

T. Fujisawa, S. Masuda, "Light-induced chromophore and protein responses and mechanical signal transduction of BLUF proteins" *Biophysical Reviews*, 2017

"Development of an Azo-based Photosensitizer Activated under Mild Hypoxia for Photodynamic Therapy", W. Piao, K. Hanaoka, T. Fujisawa, S. Takeuchi, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Tahara, T. Nagano, Y. Urano, *Journal of the American Chemical Society*, 139, 13713-13719, 2017. 査読有り

"Broadband Stimulated Raman Spectroscopy in the Deep Ultraviolet Region", H. Kuramochi, T. Fujisawa, S.

Takeuchi, T. Tahara, *Chemical Physics Letters*, 683, 543-546, 2017. 査読有り

"Raman Optical Activity Reveals Carotenoid Photoactivation Events in the Orange Carotenoid Protein in Solution" T. Fujisawa, R. L. Leverenz, M. Nagamine, C A. Kerfeld, M. Unno, *Journal of the American Chemical Society*, 139, 10456-10460, 2017. 査読有り

"Transient Resonance Raman Spectroscopy of a Light-Driven Sodium-Ion-Pump Rhodopsin from *Indibacter alkaliphilus*", K. Kajimoto, T. Kikukawa, H. Nakashima, H. Yarmayo, Y. Saito, T. Fujisawa, M. Demura, M. Unno, *Journal of Physical Chemistry B* 121, 4431-4437, 2017. 査読有り

"Development of an Azoreductase-based Reporter System with Synthetic Fluorogenic Substrates" N. Shin, K. Hanaoka, W. Piao, T. Miyakawa, T. Fujisawa, S. Takeuchi, S. Takahashi, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Tahara, M. Tanokura, T. Nagano, Y. Urano *ACS Chemical Biology* 12, 558-563, 2017. 査読有り

"Raman Optical Activity of Tetra-alanine in the Poly(L-proline) II Type Peptide Conformation" M. Furuta, T. Fujisawa, H. Urigo, T. Eguchi, T. Shingae, S. Takahashi, E. W. Blanch, M. Unno, *Physical Chemistry Chemical Physics* 19, 2078-2086, 2017. 査読有り

「ラマン光学活性分光法」藤澤知績、海野雅司、*分光研究*, 65, 218-231, 2016. 査読有り

"Ultrafast dynamics in aromatic cation based ionic liquids: A femtosecond Raman-induced Kerr effect spectroscopic study" H. Shirota, S. Kakinuma., K. Takahashi., A. Tago, H. Jeong, T. Fujisawa. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 89, 3942-3945, 2016. 査読有り

〔学会発表〕(計 7件)

2018年3月、第98回日本化学会春季年会、日本大学船橋キャンパス、"Anharmonically-coupled low frequency mode in green fluorescent protein: the assignment by QM/MM calculation" Tomotsumi Fujisawa, Masashi Unno, 口頭発表

2018年1月、第20回連携大学院セミナー、産業技術総合研究所九州センター、「ラマン光学活性分光法とカロテノイド結合タンパク質への応用」、藤澤知績、口頭発表(招待講演)

2017年3月、第97回日本化学会春季年会、「Searching for Anharmonic Low Frequency Mode in Green Fluorescent

Protein" Tomotsumi Fujisawa, Masashi Unno、ポスター発表

2017年3月、第77回岡崎カンファレンス、分子科学研究所、「Time-resolved impulsive stimulated Raman study of green fluorescent protein: role of a coherent low frequency mode in the excited-state proton transfer" Tomotsumi Fujisawa, 口頭発表(招待講演)

2016年11月、第54回生物物理学会年会、「Chromophore conformation in active site of orange carotenoid protein studied by Raman optical activity spectroscopy" Tomotsumi Fujisawa, Ryan L. Leverenz, Cheryl A. Kerfeld, Masashi Unno, ポスター発表

2016年9月、5th international conference on vibrational optical activity - VOA5, "Chromophore conformation in active site of orange carotenoid protein from Raman optical activity" Tomotsumi Fujisawa, Ryan L. Leverenz, Cheryl A. Kerfeld, Masashi Unno, 口頭発表

2016年6月、第43回生体分子科学討論会「ラマン光学活性に基づくオレンジカロテノイドタンパク質の活性部位における発色団の立体構造変化」藤澤知績、Ryan L. Leverenz, Cheryl A. Kerfeld、海野雅司、口頭発表

〔図書〕(計 0件)
該当なし。

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)
該当なし。

取得状況(計 0件)
該当なし。

〔その他〕
ホームページ等
http://biophysics.chem.saga-u.ac.jp/Fujisawa_webpage/Tfujisawa.html#history

6. 研究組織
(1) 研究代表者

藤澤 知績 (FUJISAWA, Tomotsumi)
佐賀大学・工学系研究科・特任講師
研究者番号: 60633493

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし