

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05756

研究課題名(和文) ラマン円偏光二色性分光を基盤とした生体分子科学における新しい計測法の開拓

研究課題名(英文) Applications of Raman Optical Activity to Biomolecular Sciences

研究代表者

海野 雅司 (Unno, Masashi)

佐賀大学・理工学部・教授

研究者番号：50255428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の大きな目的は申請者らが開発してきたラマン光学活性分光装置の更なる高感度化と、生命科学における重要課題への適用である。本手法は円二色性分光(いわゆるCD)のラマン分光版で、通常のラマン分光に比べて極めて多くの構造情報を提供する。特に溶液中では平面構造の分子がタンパク質中ではキラルな非平面構造になることに注目し、活性中心である補欠分子の構造的な歪みを検出できることを示してきた。特に本研究では、発色団の水素面外変角振動モードのラマン光学活性バンドの強度が歪みを表す二面角と比例関係にあることを見出し、活性部位構造を調べる物差しとして使えることを明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は生体内におけるさまざまな機能に関与しており、生命現象の解明という基礎研究から生体分子の工業的な応用や医療にも関係する極めて重要な生体分子の一つである。従って、タンパク質の活性部位構造を明らかにすることは生命科学における重要な研究課題であり、我々はラマン光学活性分光とよばれる手法を用いることで、色素タンパク質の活性部位構造を解析する新しい研究手段を開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Many biological cofactors, such as light-absorbing chromophores in photoreceptors, are intrinsically planar molecules. A protein environment, however, causes structural distortions of the cofactor, and such structural changes can lead to a modulation of chemical properties of the cofactor to maximize its biological activity. In this project, we have constructed a near-infrared excited Raman optical activity (ROA) spectrometer with a scattered circular polarization scheme. Using this state-of-the-art ROA spectrometer, We found that a hydrogen out-of-plane ROA band provides a spectroscopic ruler for the out-of-plane distortion of the chromophore that is embedded in a protein environment.

研究分野：分子分光学

キーワード：振動分光 生物物理 光受容タンパク質 量子化学計算

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然界には補欠分子を活性中心としてもつ色素タンパク質が数多く存在する。例えばヘムタンパク質はさまざまな機能を発現するため鉄ポルフィン錯体であるヘムを活性部位としてもっている。また光受容タンパク質では発色団と呼ばれる有機化合物を光の検出に使っており、光吸収によって引き起こされた発色団の構造変化がタンパク質の構造変化を引き起こして信号伝達などの機能を実現している。このような補欠分子の多くは $\pi$ 電子系を有した化合物で、溶液中などでは平面構造である。しかし、タンパク質というキラルな環境中に取り込まれることで非平面構造となり、この構造の歪みがタンパク質の機能と密接な関係をもつことが示されてきた。例えば、光受容タンパク質では発色団の吸収波長制御や光物理・光化学的な性質などに関与していることが示されている。

上記のように補欠分子の構造歪みの重要性は指摘されてきたが、その実験的な検出は容易ではない。例えば、X線結晶回折では1.5 Å程度の高分解能構造でも正確に面外方向の歪みを検出することはできない。そこで我々は非平面構造への歪みに関する構造情報が期待できる分光手段として、ラマン光学活性分光(Raman Optical Activity, ROA)と呼ばれる手法に注目した。ROAは右回りと左回りに円偏光したレーザー光を照射した際に観測されるラマン散乱光の強度差 $I^R - I^L$ で、鏡像異性体ではその符号が反転する性質を用いたキラル分光の一つである。紫外可視光を用いた電子円二色性分光(いわゆるCD)に比べてROAスペクトルでは多くの振動バンドから構成されており、個々のバンドが有益な構造マーカーとなり得るのが大きな利点である。このためROAはタンパク質や糖鎖などのさまざまな生体関連分子に応用されてきた。しかし、従来開発されてきたROA分光装置のほとんどは可視レーザー光を励起光源として用いているため、多くの色素タンパク質では蛍光や試料の光損傷などのため応用できなかった。そこで我々は近赤外励起のROA分光装置を開発し、タンパク質中に存在する発色団のROAスペクトルを選択的/優先的に測定できることを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

本研究の大きな目的は申請者らが開発してきた近赤外ラマン光学活性分光法の高感度化と、実際に本手法を用いて生命科学における重要課題を解決していくことである。この目的を達成するため、本研究ではつぎの目的を設定した。(1)装置の高感度化:我々は近赤外ラマン光学活性分光が色素タンパク質の構造解析に有効であることを示してきたが、高濃度の試料を用いた長時間測定が必要であるなどの問題点があった。そこで、測定感度の向上を目指し、後述の散乱円偏光方式を採用した新しい近赤外ラマン光学活性分光装置の開発を第一の目的とした。(2)応用研究の推進:本手法が実際に“使える”手法であることを示すためには、広範囲の系への応用が必要である。そこで、光受容タンパク質の反応中間体や蛍光タンパク質、金属タンパク質などへの応用を試みる。我々は近赤外ラマン光学活性スペクトルを測定できる世界中で唯一の研究グループであり、生命科学における重要課題の解決に率先して挑戦したい。

### 3. 研究の方法

ROAでは入射光として右回りおよび左回りに円偏光したレーザー光を用いてラマン散乱光を観測する。これらの和 $I^R + I^L$ は通常のラマンスペクトルに対応するが、これらの差 $I^R - I^L$ がROAスペクトルとなる。キラルでない分子では $I^R - I^L = 0$ となるが、キラルな分子では $I^R$ と $I^L$ の強度がわずかに異なり $I^R - I^L \neq 0$ となる。ところがROA信号 $I^R - I^L$ はラマン信号強度 $I^R + I^L$ の $10^{-3}$ 以下と極めて小さく、その測定は容易ではない。しかし鏡像異性体ではROAスペクトルの符号が反転して区別でき、生体関連分子の多くはキラルであることから通常のラマン分光よりも高次の構造情報が期待できる。本研究では、まず我々が開発した近赤外ラマン光学活性分光装置の更なる高感度化に取り組んだ。従来の装置では入射光を左右円偏光に変調して測定したラマン散乱光を観測し、その差 $I^R - I^L$ から得ることができる。この方法は入射円偏光方式(Incident Circular Polarization, ICP)と呼ばれる。一方、無偏光の入射光を照射して観測されるラマン散乱光の左右円偏光の強度差を観測する散乱円偏光方式(Scattered Circular Polarization, SCP)でも同様のROAスペクトルが得られることがわかっている。この方式では左右円偏光成分を同時観測するため、レーザー光の出力や発振波長の揺らぎの影響を受けずにラマン光学活性スペクトルを観測可能だと期待できる。また改良した装置を用い、受容タンパク質を中心にさまざまな系に応用した。また得られたスペクトルはGaussian16などを用いた量子化学計算により解析した。

### 4. 研究成果

我々は532 nm励起と785 nm励起の2台のROA分光装置を保有しているが、本研究においてともにICP方式からSCP方式に改良を行った。この装置改良により、ROA分光装置の長期的な安定性が飛躍的に向上した。この改良した装置を用い、Photoactive Yellow Protein (PYP)や微生物型ロドプシンへの応用研究を行った。PYPについては同位体標識したp-クマル酸を再構成したサンプルについても測定を行い、PYPのROAスペクトルにおいて顕著な信号を示すバンドをC-H面外変角モード( $\gamma_8$ ,  $\gamma_2$ )に帰属することができた。また密度汎関数理論(DFT)を用いた解析からC-H面外変角モード $\gamma_8$ に由来するROAバンドの強度は発色団の面外方向への捻じれを表す二面角に比例することを見出した。微生物型ロドプシンについてもナトリウムポンプ型

ロドプシンを始め、さまざまな試料への応用研究を行った。その結果、微生物型ロドプシンの ROA スペクトルはレチナール発色団のコンフォメーションに極めて敏感であり、通常のラマン分光法では得られない精密な活性部位構造に関する知見が得られることを明らかにできた。また光中間体への ROA 測定を目的に、低温下で光照射することで初期中間体を捕捉する低温ラマン分光法を微生物型ロドプシンなどに応用した。現在までに、海洋性細菌がもつ光駆動プロトンポンプであるプロテオロドプシンや塩化物イオンポンプであるハロロドプシンの初期中間体である K 中間体について、ラマンスペクトルの測定に成功した。これらの低温ラマン分光による研究により、将来的な ROA 分光への応用の基礎を確立することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haraguchi Shojiro, Shingae Takahito, Fujisawa Tomotsumi, Kasai Noritaka, Kumauchi Masato, Hanamoto Takeshi, Hoff Wouter D., Unno Masashi	4. 巻 115
2. 論文標題 Spectroscopic ruler for measuring active-site distortions based on Raman optical activity of a hydrogen out-of-plane vibration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 8671 ~ 8675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1073/pnas.1806491115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujisawa Tomotsumi, Abe Masahiro, Tamogami Jun, Kikukawa Takashi, Kamo Naoki, Unno Masashi	4. 巻 592
2. 論文標題 Low-temperature Raman spectroscopy reveals small chromophore distortion in primary photointermediate of proteorhodopsin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3054 ~ 3061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1002/1873-3468.13219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwata Tatsuya, Nagai Takashi, Ito Shota, Osoegawa Shinsuke, Iseki Mineo, Watanabe Masakatsu, Unno Masashi, Kitagawa Shinya, Kandori Hideki	4. 巻 140
2. 論文標題 Hydrogen Bonding Environments in the Photocycle Process around the Flavin Chromophore of the AppA-BLUF domain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 11982 ~ 11991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1021/jacs.8b05123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuji Takaoka, Shohei Esaki, Koichi Sakaguchi, Tomotsumi Fujisawa, Masashi Unno, Shintaro Morisada, Keisuke Ohto, Hidetaka Kawakita	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 ize-dependent separation of graphene oxide by deformation of packed-gel in a chromatographic column	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Separation Science and Technology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osoegawa Shinsuke, Miyoshi Risako, Watanabe Kouhei, Hirose Yuu, Fujisawa Tomotsumi, Ikeuchi Masahiko, Unno Masashi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Identification of the Deprotonated Pyrrole Nitrogen of the Bilin-Based Photoreceptor by Raman Spectroscopy with an Advanced Computational Analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b00965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa Tomotsumi, Leverenz Ryan L., Nagamine Momoka, Kerfeld Cheryl A., Unno Masashi	4. 巻 139
2. 論文標題 Raman Optical Activity Reveals Carotenoid Photoactivation Events in the Orange Carotenoid Protein in Solution	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 10456 ~ 10460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b05193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwata Tatsuya, Nozaki Dai, Yamamoto Atsushi, Koyama Takayuki, Nishina Yasuzo, Shiga Kiyoshi, Tokutomi Satoru, Unno Masashi, Kandori Hideki	4. 巻 56
2. 論文標題 Hydrogen Bonding Environment of the N3-H Group of Flavin Mononucleotide in the Light Oxygen Voltage Domains of Phototropins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3099 ~ 3108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.7b00057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajimoto Kousuke, Kikukawa Takashi, Nakashima Hiroki, Yamaryo Haruki, Saito Yuta, Fujisawa Tomotsumi, Demura Makoto, Unno Masashi	4. 巻 121
2. 論文標題 Transient Resonance Raman Spectroscopy of a Light-Driven Sodium-Ion-Pump Rhodopsin from <i>Indibacter alkaliphilus</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 4431 ~ 4437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.7b02421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Piao Wen, Hanaoka Kenjiro, Fujisawa Tomotsumi, Takeuchi Satoshi, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Terai Takuya, Tahara Tahei, Nagano Tetsuo, Urano Yasuteru	4. 巻 139
2. 論文標題 Development of an Azo-Based Photosensitizer Activated under Mild Hypoxia for Photodynamic Therapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 13713 ~ 13719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b05019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuramochi Hikaru, Fujisawa Tomotsumi, Takeuchi Satoshi, Tahara Tahei	4. 巻 683
2. 論文標題 Broadband stimulated Raman spectroscopy in the deep ultraviolet region	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical Physics Letters	6. 最初と最後の頁 543 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cpllett.2017.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shin Narae, Hanaoka Kenjiro, Piao Wen, Miyakawa Takuya, Fujisawa Tomotsumi, Takeuchi Satoshi, Takahashi Shodai, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Terai Takuya, Tahara Tahei, Tanokura Masaru, Nagano Tetsuo, Urano Yasuteru	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of an Azoreductase-based Reporter System with Synthetic Fluorogenic Substrates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 558 ~ 563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.6b00852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 黒岩亮介、藤澤知績、海野雅司、須藤雄気、井上紗希
2. 発表標題 ラマン光学活性分光法を用いた「内向き」プロトンポンプRnXeRの活性部位の構造解析
3. 学会等名 九重分子科学セミナー2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川将吾、藤澤知績、海野雅司、菊川峰志
2. 発表標題 ラマン光学活性で観るハロロドプシン多量体形成における活性部位の構造変化
3. 学会等名 九重分子科学セミナー2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomotsumi Fujisawa, Ryosuke Kuroiwa, Megumi Kamimura, Saki Inoue, Yuki Sudo, Masashi Unno
2. 発表標題 Raman optical activity spectroscopy of a new microbial rhodopsin with inward proton transport activity
3. 学会等名 26th International Conference on Raman Spectroscopy
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shojiro Haraguchi, Takahito Shingae, Tomotsumi Fujisawa, Noritaka Kasai, Masato Kumauchi, Takeshi Hanamoto, Wouter D. Hoff, and Masashi Unno
2. 発表標題 Raman Optical Activity of the Hydrogen Out-of-plane Vibration is a Sensitive Probe of Chromophore Distortions in a Photoreceptor Protein
3. 学会等名 26th International Conference on Raman Spectroscopy
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisato Ishii, Shojiro Haraguchi, Jie Ren, Takahito Shingae, Tomotsumi Fujisawa, Takeshi Hanamoto, Wouter D. Hoff, Masashi Unno
2. 発表標題 Assignment of Hydrogen Out-of-Plane Vibration of the p-Coumaric Acid Chromophore in Photoactive Yellow Protein
3. 学会等名 26th International Conference on Raman Spectroscopy
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shojiro Haraguchi, Takahito Shingae, Tomotsumi Fujisawa, Noritaka Kasai, Masato Kumauchi, Takeshi Hanamoto, Wouter D. Hoff, Masashi Unno
2. 発表標題 A Spectroscopic Ruler for Measuring Active Site Distortions based on Raman Optical Activity of a Hydrogen Out-of-Plane Vibration
3. 学会等名 6th International Conference on Vibrational Optical Activity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yushi Nakamizo, Takashi Kikukawa, Tomotsumi Fujisawa, Masashi Unno
2. 発表標題 Chromophore structural change in the primary photointermediate of sodium-pump rhodopsin studied by low-temperature Raman spectroscopy
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomotsumi Fujisawa, Jun Tamogami, Takashi Kikukawa, Masashi Unno
2. 発表標題 Distinctively small distortion of retinal chromophore in K intermediate of proteorhodopsin observed by low-temperature Raman spectroscopy
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶本航介、菊川峰志、中島弘貴、山領春輝、斉藤優太、藤澤知績、出村誠、海野雅司
2. 発表標題 ナトリウムポンプ型ロドプシン中間体の過渡共鳴ラマン分光法による研究
3. 学会等名 九重分子科学セミナー2017
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Masashi Unno
2. 発表標題 Raman Optical Activity of Short Peptides Analyzed by Quantum Chemical Calculations Combined with Molecular Dynamics Simulations
3. 学会等名 16th International Conference on Chiroptical Spectroscopy 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shojiro Haraguchi, Jie Ren, Tomotsumi Fujisawa, Wouter D. Hoff, Masashi Unno
2. 発表標題 Active Site Structures of Photoactive Yellow Protein Revealed by Spectroscopy and QM/MM Calculations
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kousuke Kajimoto, Takashi Kikukawa, Hiroki Nakashima, Haruki Yamaro, Yuta Saito, Tomotsumi Fujisawa, Makoto Demura, Masashi Unno
2. 発表標題 Transient Resonance Raman Spectroscopy of a Light-Driven Sodium-Ion-Pump Rhodopsin from <i>Indibacter alkaliphilus</i>
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Junpei Matsuo, Takashi Kikukawa, Tomotsumi Fujisawa, Masashi Unno
2. 発表標題 Raman optical activity probes the conformation of the retinal chromophore in microbial rhodopsins
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yushi Nakamizo, Momoka Nagamine, Tomotsumi Fujisawa, Cheryl Kerfeld, Masashi Unno
2. 発表標題 Evidence for close-to-open photoactivation of orange carotenoid protein from ultraviolet resonance Raman spectroscopy
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Azusa Iizuka, Takashi Kikukawa, Kousuke Kajimoto, Tomotsumi Fujisawa, Takashi Tsukamoto, Tomoyasu Aizawa, Naoki Kamo, Masashi Unno
2. 発表標題 Functional importance of trimer formation of light-driven H <sup>+</sup> pump Gloeobacter rhodopsin
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masashi Unno
2. 発表標題 Raman optical activity of the hydrogen out-of-plane mode is a sensitive probe of chromophore distortions in a photoreceptor protein
3. 学会等名 SciX2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古田雅 和・藤澤知績・浦郷寛康・新ヶ江貴仁・高橋 聡・BLANCH Ewan・海野雅司
2. 発表標題 Poly(L-Proline)IIコンフォメーションをもつテトラアラニンのラマン光学活性分光
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会 (2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 FUJISAWA, Tomotsumi; UNNO, Masashi
2. 発表標題 Anharmonically-coupled low frequency mode in green fluorescent protein: the assignment by QM/MM calculation
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会 (2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井寿斗・原口翔次郎・Ren Jie・新ヶ江貴仁・藤澤知績・花本猛士・Hoff Wouter D.・海野雅司
2. 発表標題 同位体標識 p-クマル酸を再構成した Photoactive Yellow Protein の振動スペクトルと帰属
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会 (2018)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐賀大学 海野一藤澤研究室 <a href="http://biophysics.chem.saga-u.ac.jp/">http://biophysics.chem.saga-u.ac.jp/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	藤澤 知績  (Fujisawa Tomotsumi)  (60633493)	佐賀大学・理工学部・准教授    (17201)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	菊川 峰志 (Kikukawa Takashi) (20281842)	北海道大学・先端生命科学研究院・講師  (10101)	
連携研究者	細井 晴子 (Hosoi Haruko) (00313396)	東邦大学・理学部・准教授  (32661)	