

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05037

研究課題名(和文) ラマン光学活性分光法による光受容タンパク質の反応中間体の計測と応用

研究課題名(英文) Raman optical activity measurement of reaction intermediate of photoreceptor proteins and its application

研究代表者

藤澤 知績 (Fujisawa, Tomotsumi)

佐賀大学・理工学部・准教授

研究者番号：60633493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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、生物の光受容体の反応中間体の立体構造を計測することを目的とした。微生物の光駆動イオンポンプ等の光受容体を対象として、極低温下で捕捉した初期反応中間体のROA計測を計画した。このROA計測の重要なステップとなる低温ラマン測定では、種々の光受容体の初期中間体の測定を行い、その構造をラマンスペクトルに基づいて解析した。ROA測定へ展開可能なラマン信号の強い初期中間体を見出し、低温ラマン測定と並行して低温ROA測定装置の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で実施した光受容タンパク質の極低温ラマン測定は、世界的にみても行える研究グループがほとんど無く、独自性の高い構造情報に基づいた光受容タンパク質の研究成果である。また、ラマン光学活性(ROA)分光法は、今日広く利用されるどの分光手法でも測定ができない、タンパク質の反応サイトの詳細な立体構造を捉えられる方法である。本研究はタンパク質研究において"今まで見えなかった構造を観測する"新展開を拓く取り組みである。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to utilize Raman optical activity (ROA) spectroscopy for the measurement of the three-dimensional (3D) structure of the reaction intermediates in photoreceptor proteins. We chose the photoreceptors, such as light-driven ion pumps, of micro-organisms and planned to measure ROA of their initial photointermediates trapped at low temperature. As the important step for this ROA measurement, we could measure the low-temperature Raman spectra of the initial intermediates of various photoreceptors and studied their early-time structural changes in the photoreactions. We found a couple of photoreceptors, to which the ROA spectroscopy can be applied, and worked on the development of the low-temperature ROA spectrometer.

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 低温ラマン分光法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素に代表されるタンパク質は内部に化学反応を実現するための空間を持ち、この反応サイトでは一般に単一の化学反応が高い効率で起こる。例えば、視覚を司る網膜タンパク質はレチナール色素(ビタミン A 誘導体)の光異性化反応を起点とした一連の化学変化を通して光感知信号を生み出す。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、その内部で起こる化学反応もまた立体的な構造変化・化学変化の連続である。しかし、その立体的な構造変化を正確に捉えることは最難関の課題の一つであった(現在でも状況は変わらない)。

通常、タンパク質の立体的構造を見るには X 線結晶構造解析が最も強力である。タンパク質の立体構造の全容が原子レベルで可視化できるからである。しかし、反応サイトの分子の立体構造を結晶構造から特定する場合、空間分解能が不足し不明確な構造が報告されることも多い。結晶構造解析の他に、タンパク質中で反応する分子の構造を観測する方法として用いられる手法に振動分光法が挙げられ、(赤外・ラマンに代表される)振動分光法は反応分子の結合長や構造のわずかな変化にも鋭敏である反面、分子の立体的構造情報を取り出すことが原理的にできないといった弱点がある。

そこで、本研究は分子の立体構造を取得可能なラマン光学活性分光法をタンパク質の反応サイトの研究に応用することを企画した。ラマン光学活性(ROA: Raman optical activity)はラマン散乱光の右円偏光成分と左円偏光成分の微差を計測する方法であり、その微差から得られる ROA スペクトルは分子の立体構造にも極めて鋭敏である。本研究は、微生物の光受容タンパク質を具体的な対象として、ラマン光学活性の活用によって反応サイトの立体構造変化の観測と反応機構解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

ラマン光学活性分光法によってタンパク質内で反応中の分子の立体構造を捉え、その立体構造変化と反応機構を明らかにすることを目的とした。微生物の光受容タンパク質を対象として、特に初期反応中間体の計測を主眼とした。一般に初期中間体は光エネルギーを分子の立体的ゆがみとして蓄積すると考えられており、その 3 次元的構造について興味を持たれてきたからである。ROA を利用してタンパク質の中の分子を見る方法が確立できれば、タンパク質内部に結合した医薬分子等の構造解析にも本研究手法を応用することも目指した。

3. 研究の方法

(研究対象)

光受容タンパク質は光を捉えるための色素を内包したタンパク質であり、多くは色素の種類によって分類される。本研究においては、レチナール色素を内包した微生物型ロドプシンと、*p*-クマル酸色素を内包した光活性イエロータンパク質(PYP)を対象とした。微生物型ロドプシンは古細菌やバクテリアの膜に存在して、光駆動型イオンポンプ、イオンチャネル、あるいは光センサーとして働く光受容体である。PYP はバクテリアの光センサータンパク質として知られる光受容体である。

(方法 : 低温トラップ法を利用したラマン・ROA スペクトル測定)

本研究の主眼である初期反応中間体の測定には、低温トラップ法を利用する。通常、光励起後に最初に現れる反応中間体はマイクロ秒の寿命で減衰するが、低温トラップ法は極低温で反応中間体の寿命を長くして中間体を実効的に捕捉する方法である。光受容タンパク質の多くは液体窒素温度(77K)で初期中間体を安定に捕捉できることが知られており、低温下で捕捉した初期中間体に対してラマン・ROA 測定を進めた。

(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。得られた色素分子の ROA スペクトルを、タンパク質環境を考慮した QM/MM 計算を用いてシミュレートし、計算結果と実測スペクトルとの整合性に基いて反応サイトにおける分子の立体構造を検討した。

(方法 : タンパク質-薬剤結合に対するラマン光学活性分光法の応用)

タンパク質の中の分子の立体構造情報を ROA の利用によって取得する方法は、光受容体の反応サイトの構造解析だけでなく、より一般的な有用性を持ち得る。本研究では、タンパク質に結合した医薬分子への研究にも ROA 分光法の適用性を調べた。

4 . 研究成果

微生物型ロドプシンおよび光活性イエロータンパク質の低温ラマン・ROA 測定

低温トラップした光受容タンパク質の初期中間体の ROA 測定を実現するには、初期中間体のラマンスペクトルを高いシグナル-ノイズ比で得ることが前提条件となる。この研究課題を始める前年度（2017 年度）に近赤外レーザーを光源とした低温ラマン測定装置を立ち上げられたため、初年度から種々の微生物型ロドプシンや光活性イエロータンパク質に対して低温ラマン測定をスタートできた。バクテリアの光駆動プロトンポンプ（プロテオロドプシン）、光駆動クロライドポンプやナトリウムポンプ等の測定を実施した。このような低温ラマン測定を実施する研究グループは世界的にみても極めて少なく、これら微生物型ロドプシンの初期中間体について新規の構造情報を得ることができたため、結果を下記の国際雑誌に公開することができた。

[1] Y. Nakamizo, T. Fujisawa, T. Kikukawa, A. Okamura, H. Baba, M. Unno, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 23, 2072-2079, 2021.

[2] T. Fujisawa, H. Kiyota, T. Kikukawa, M. Unno, *Biochemistry* 58, 4159-4167, 2019.

[3] T. Fujisawa, M. Abe, J. Tamogami, T. Kikukawa, N. Kamo, M. Unno, *FEBS Letters*, 592, 3054-3061, 2018.

低温ラマン測定を行った光受容タンパク質の中には、光励起前の暗状態（反応の始状態）に類似する強度のラマン信号が得られたものもあり、このことは低温下の ROA 測定が現実的であることを示していた。そのため、低温ラマン測定と並行して低温 ROA 測定装置の開発を進めた。低温 ROA 分光計の製作を完了するには至っておらず、現在も開発途中の段階である。

微生物型ロドプシンおよび光活性イエロープロテインの ROA 測定

上記の低温測定のほか、種々の光受容タンパク質に対して常温下の ROA 測定を実施した。光源には近赤外レーザー（785nm）を用いて、光励起前の暗状態の測定を行った。微生物型ロドプシンや光活性イエロータンパク質が内包する色素の構造に対して、従来の振動分光法では得ることができない詳細な立体構造情報を取得することができた。例えば、色素がどの方向に、どのようにねじれているかといった構造情報を量子化学計算の併用によって明らかにすることができた。これらの結果を下記の国際雑誌に公表し、ROA を用いたタンパク質の構造解析について総説と著書を執筆した。

[4] J. Matsuo, T. Kikukawa, T. Fujisawa, W. D. Hoff, M. Unno, *Journal of Physical Chemistry Letters* 11, 8579-8584, 2020.

[5] T. Fujisawa, M. Unno "Vibrational optical activity spectroscopy" Chapter 2 in *Molecular and Laser Spectroscopy: Advances and Applications: Volume 2*; Gupta, V. P. & Ozaki, Y. Eds.; Elsevier Inc.; pp 41-82 (2020)

[6] T. Fujisawa, "Raman Optical Activity of Proteins" *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2020 John Wiley & Sons, Ltd.

[7] S. Haraguchi, T. Shingae, T. Fujisawa, N. Kasai, T. Hanamoto, W. D. Hoff, M. Unno, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 115, 8671-8675, 2018.

その他

タンパク質に結合した医薬分子の ROA 測定を実施したが、医薬分子とタンパク質の結合が弱く、ROA 信号がノイズと区別がつかなかった。医薬分子の信号を増大させる工夫が今後必要になる。一方で、研究課題の開始時点では研究対象として考慮しなかったシアノバクテリオクロム等の光受容体ファミリーに対しても対象を広げることができた。これはシアノバクテリアが持つ光受容体でテトラピロール色素を内包する光センサータンパク質である。近赤外ラマン測定による構造解析の結果を下記の国際雑誌に公表した。

[8] T. Sato, T. Kikukawa, R. Miyoshi, K. Kajimoto, C. Yonekawa, T. Fujisawa, M. Unno, T. Eki, Y. Hirose, *Journal of Biological Chemistry* 294, 18909-18922, 2019.

[9] S. Osoegawa, R. Miyoshi, K. Watanabe, Y. Hirose, T. Fujisawa, M. Ikeuchi, M. Unno, *Journal of Physical Chemistry B*, 123, 3242-3247, 2019.

[10] A. Iizuka, K. Kajimoto, T. Fujisawa, T. Tsukamoto, T. Aizawa, N. Kamo, K.-H. Jung, M. Unno, M. Demura, T. Kikukawa, *Scientific Reports* 9, 10711, 2019.

地場産業である海苔や陶磁器のラマン測定を進めて、結果の一部を下記の国内および国際雑誌に公表し、海苔のラマン測定については特許出願を行った。

- [11] S. Kamura, T. Tani, H. Matsuo, Y. Onaka, T. Fujisawa, M. Unno, *ACS Omega* 6, 7829-7833 (2021).
- [12] T. Akatsu, T. Fujisawa, M. Unno, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 129, 267-270 (2021)
- [13] Y. Takaoka, S. Esaki, K. Sakaguchi, T. Fujisawa, M. Unno, S. Morisada, K. Ohto, H. Kawakita, *Separation Science and Technology*, <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1586726>

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shoutaro Kamura, Takumi Tani, Hideyuki Matsuo, Yoshimitsu Onaka, Tomotsumi Fujisawa, Masashi Unno	4. 巻 6
2. 論文標題 New probe for porcelain glazes by luminescence at near-infrared excitation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 7829-7833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c00322	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 Takashi Akatsu, Masashi Unno, Tomotsumi Fujisawa	4. 巻 6
2. 論文標題 Prestress in alumina-strengthened porcelain as estimated with Raman scattering spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Ceramic Society of Japan	6. 最初と最後の頁 267-270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2109/jcersj2.21013	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 Yushi Nakamizo, Tomotsumi Fujisawa, Takashi Kikukawa, Akiko Okamura, Hiroaki Baba, Masashi Unno	4. 巻 23
2. 論文標題 Low-temperature Raman spectroscopy of sodium-pump rhodopsin from <i>Indibacter alkaliphilus</i> : Insight of Na ⁺ binding for active Na ⁺ transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 2072-2079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CP05652A	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 Junpei Matsuo, Takashi Kikukawa, Tomotsumi Fujisawa, Wouter D. Hoff, Masashi Unno	4. 巻 11
2. 論文標題 "Watching" a Molecular Twist in a Protein by Raman Optical Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 8579-8584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c02448	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, Kiyota Hayato, Kikukawa Takashi, Unno Masashi	4. 巻 58
2. 論文標題 Low-Temperature Raman Spectroscopy of Halorhodopsin from <i>Natronomonas pharaonis</i> : Structural Discrimination of Blue-Shifted and Red-Shifted Photoproducts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4159-4167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.9b00643	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 Iizuka Azusa, Kajimoto Kousuke, Fujisawa Tomotsumi, Tsukamoto Takashi, Aizawa Tomoyasu, Kamo Naoki, Jung Kwang-Hwan, Unno Masashi, Demura Makoto, Kikukawa Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional importance of the oligomer formation of the cyanobacterial H ⁺ pump Gloeobacter rhodopsin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47178-5	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 Teppei Sato, Takashi Kikukawa, Risako Miyoshi, Kousuke Kajimoto, Chinatsu Yonekawa, Tomotsumi Fujisawa, Masashi Unno, Toshihiko Eki, Yuu Hirose	4. 巻 294
2. 論文標題 Protocromic absorption changes in the two-cysteine photocycle of a blue/orange cyanobacteriochrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem	6. 最初と最後の頁 18909-18922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010384	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) 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 Yuji Takaoka, Shohei Esaki, Koichi Sakaguchi, Tomotsumi Fujisawa, Masashi Unno, Shintaro Morisada, Keisuke Ohto, Hidetaka Kawakita	4. 巻 55
2. 論文標題 Size-dependent separation of graphene oxide by deformation of packed-gel in a chromatographic column	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Separation Science and Technology	6. 最初と最後の頁 1356-1363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01496395.2019.1586726	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, 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) 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 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) 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

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤澤知績
2. 発表標題 Three-dimensional chromophore structures in proton-pumping microbial rhodopsins from Raman optical activity
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤澤知績
2. 発表標題 低温ラマン分光法によるナトリウムポンプロドプシンの初期構造変化の研究
3. 学会等名 ISSP ワークショップ「レチナールタンパク質の光機能発現の物理と化学」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤知績
2. 発表標題 ラマン光学活性分光法の光受容性タンパク質への応用
3. 学会等名 第42回溶液化学シンポジウム・プレシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川将吾、藤澤知績、菊川峰志、海野雅司
2. 発表標題 Raman optical activity observes a clear structural change of active site caused by trimer formation of halorhodopsin
3. 学会等名 第42回溶液化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒岩亮介、藤澤知績、菊川峰志、海野雅司
2. 発表標題 Near-IR Raman optical activity Spectroscopy of Inward proton pump rhodopsin
3. 学会等名 第42回溶液化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川将吾、藤澤知績、菊川峰志、海野雅司
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 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒岩亮介、藤澤知績、菊川峰志、海野雅司
2. 発表標題 ラマン光学活性による光駆動内向きプロトンポンプの研究
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤知績
2. 発表標題 Raman Optical Activity Spectroscopy of a New Microbial Rhodopsin with Inward Proton Transport Activity
3. 学会等名 ICORS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤澤知績
2. 発表標題 Structural analysis of active site in microbial rhodopsins using Raman optical activity
3. 学会等名 SciX2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中溝祐志、藤澤知績、菊川峰志、海野雅司
2. 発表標題 Chromophore structural change in the primary photointermediate of sodium-pump rhodopsin by low-temperature Raman spectroscopy
3. 学会等名 第56回生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤澤知績、田母神淳、海野雅司
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回生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 相樂隆正 / 共編著 海野雅司 / 共編著	4. 発行年 2019年
2. 出版社 培風館	5. 総ページ数 210
3. 書名 理工系の大学基礎化学	

1. 著者名 Tomotsumi Fujisawa	4. 発行年 2020年
2. 出版社 R, 2020 John Wiley & Sons, Ltd.	5. 総ページ数 18
3. 書名 Optical Activity of Proteins, Encyclopedia of Analytical Chemistry	

1. 著者名 Tomotsumi Fujisawa, Masashi Unno	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 42
3. 書名 Vibrational optical activity spectroscopy In Molecular and Laser Spectroscopy: Advances and Applications: Volume 2; Gupta, V. P. & Ozaki, Y. Eds.; Elsevier Inc.; pp 41-82 (2020)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 海苔の品質評価方法、および海苔の品質評価装置	発明者 海野雅司、川村嘉 心、藤澤知績、木村 圭	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-097092	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

教員(准教授) 藤澤知績 http://biophysics.chem.saga-u.ac.jp/Fujisawa_webpage/Tfujisawa.html

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------