

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05524

研究課題名(和文) 低波数ラマン光学活性による溶液中タンパク質の高次構造解析

研究課題名(英文) Higher-Order Structures of Proteins in Solution Explored by Using Low-Frequency Raman Optical Activity

研究代表者

山本 茂樹 (Yamamoto, Shigeki)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：60552784

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)：タンパク質のキラルな高次構造と、その溶液中での揺らぎ、さらには周囲の溶媒分子とのキラルな溶媒和構造を直接測定することを目指し、キラリティを分子振動によって検出するラマン光学活性(Raman Optical Activity: ROA)の測定範囲を低波数領域にまで拡張し、タンパク質の低波数ROAを初めて測定した。低波数領域を測定可能な新規ROA装置を開発し、結晶構造が既知のタンパク質の測定によりピーク帰属を試みた。ヘリックス構造をとるポリペプチドのスペクトルを量子力学計算によりよく再現し、低波数ROAはヘリックス二巻き分の長距離の相互作用と、その構造ゆらぎを反映することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラマン光学活性の測定範囲を低波数領域にまで拡張し、溶液中タンパク質の測定を初めて行ったことは、タンパク質のキラル高次構造とその揺らぎを直接に簡便に測定する新規な方法を開拓した点で学術的意義が高い。生物のキラル選択的な反応の一因はタンパク質のキラル高次構造とその反応にあると考えられるため、その解析手法の開発はキラル薬剤の開発の一助となるだろう。

研究成果の概要(英文)：To analyze chiral higher-order structures of proteins, their fluctuation in solutions, and chiral solute-solvent interactions, we have extended a measurable region of chiral vibrational spectroscopy, Raman Optical Activity (ROA), to the lower frequency region and measured low-frequency ROA of proteins in solutions at the first time. A new spectrometer was developed for the measurements and peak assignments were attempted by comparing spectra of proteins of which crystal structures are well-known. Furthermore, experimental spectrum of an alpha-helical polypeptide was well reproduced by quantum mechanical simulation, which explored that the low-frequency ROA can reflect a long-range interaction of alpha-helix within about two helix turns and its structural fluctuation in solutions.

研究分野：分光分析

キーワード：キラリティ タンパク質構造

1. 研究開始当初の背景

太古に起こった生物の単一キラリティ選択によりタンパク質は L-アミノ酸からなり、その鏡像異性体である D-アミノ酸は特殊なペプチドにしか含まれない。このためタンパク質の高次構造にもキラリティの偏りがあり、例えばヘリックス二次構造においてはペプチド主鎖は右巻きの螺旋を取るとき安定となっている。生体高分子のキラル高次構造が一因となって、生物はキラル選択的な反応を示す。このためキラル高次構造を測定することはタンパク質の機能を理解する上で重要である。二次構造だけでなく、三次構造以上の高次のタンパク質構造や溶媒和構造(図1)もキラルとなりうるが、それらキラル高次構造を溶液中において直接かつ簡便に測定することは依然難しい。新たな原理に基いた測定法の開発が必要である。

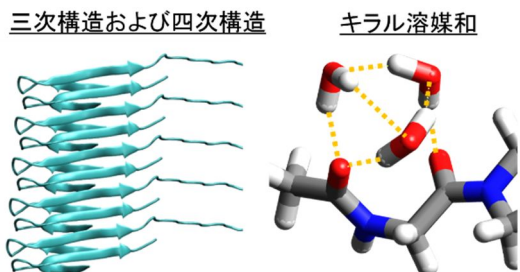


図1. 溶液中タンパク質のキラル高次構造

2. 研究の目的

本研究においては 180cm^{-1} 以下の低波数領域においてラマン光学活性 (Raman Optical Activity; ROA) の測定を可能とする装置を開発し、溶液中タンパク質のキラル高次構造を直接に解析でき、かつ既存の高波数 ROA よりも高感度な分析法を開発することを目指した。一般的に低波数振動は分子内および分子間において非局在化した振動を含むため、低波数 ROA はキラル高次構造およびキラル溶媒和構造を検出できる可能性が高い。

ROA は分子キラリティを振動準位において直接測定する分光法であり、溶液中分子の立体配座とその存在確立を決定でき、かつマイクロ秒以下の速い構造平衡系にも適用できる利点を持つ。しかしこれまで、構造解析法として研究されてきたのはアミド I やアミド III バンドなどの 1000cm^{-1} 以上の高波数ピークのみであって、 800cm^{-1} 以下の領域についてはピーク帰属さえ報告例がほぼなく、約 180cm^{-1} 以下の低波数領域は報告さえ行われてこなかった。

3. 研究の方法

構造の異なるタンパク質の低波数 ROA スペクトルを系統的に測定し、もって高強度低波数 ROA とタンパク質キラル高次構造との相関を明らかとする。さらに実験だけでなく、量子力学スペクトル計算を行い、高強度キラリティの発生原因を明らかとする。その際、我々が開発してきた分子断片化法を用い、通常の計算方法では達成不可能な巨大なペプチドの量子スペクトル計算を可能とする。

4. 研究成果

世界に先駆けて 180cm^{-1} 以下の低波数ラマン光学活性 (低波数 ROA) を測定し、溶液中でヘリックス構造を主にとるポリ-L-アラニンおよびタンパク質のキラリティを、従来の高波数領域での測定と比べて3-10倍の強度で測定できることを示した(図2)。これにより測定時間の劇的な短縮と試料濃度の削減の可能性が開けたことは、新たなキラル分光分析法の確立の観点から意義がある。

ヘリックス構造をとるペプチドは 100cm^{-1} 付近に共通して正符号の強い ROA ピークを示した。この高強度キラル信号の原因としては二つの可能性があるかと推測される。すなわち低波数領域において非局在化したキラルな分子運動と、タンパク質-溶媒分子間のキラルな溶媒和相互作用である。高強度キラル信号の主な原因を明らかとするために、側鎖構造の単純なポリ-L-アラニンを標的として、量子力学をもちいて低波数 ROA スペクトルを計算し、実験スペクトルと比較した(図3左)。ポリマーの振動スペクトル計算を達成するために分子断片化法を用い計算コストを劇的に下げることで、低波数 ROA スペクトルの量子力学計算を可能とした。相対強度および波数について、実験と計算が良く対応しており(図3左)、これまで達成されていなかったキラル低波数振動の帰属が初めて可能となった。これにより、ペプチド内にて非局在化した分子運動が 100cm^{-1} 付近の高強度 ROA 信号に大きく寄与していることが明らかとなった(図3

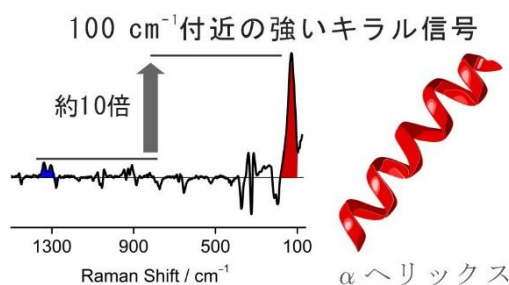


図2. 溶液中ポリ-L-アラニンの低波数 ROAスペクトルと二次構造

右) ヘリックス内部にて水素結合により連結されたアミド基の寄与が大きかった。

ヘリックスの非局在化した分子運動をより容易に理解するために“ヘリックス座標”を導入し、低波数 ROA 信号をヘリックス構造の全体的な伸縮や拡張の運動へ帰属した。その結果、 100cm^{-1} 付近の高強度 ROA はヘリックスの巻きの程度が増減するキラルな非局在運動に帰属できることが明らかとなった。この解析結果は、従来の基準振動座標(図3右)による表現とも合致する。

一方で分子動力学と量子力学を組み合わせた計算も行い、ヘリックス構造の揺らぎと、溶媒和の寄与について検討を行った。分子動力学により得られた、溶媒分子を含む多数のペプチド構造についてスペクトルを量子力学計算し、平均したものを実験と比較した(図2左)。その結果、低波数 ROA はヘリックスの構造揺らぎを主に反映し、一方でキラル溶媒和の影響は小さいことが明らかとなった。これは、高強度な低波数 ROA 信号が主にアミド基から発生し、アミド基は溶媒分子と付加的水素結合を形成していることを考えると不思議な結果とも言える。今回解析した 70cm^{-1} 付近よりもさらに低波数領域において、キラルな溶媒和の情報を含む ROA 信号が現れる可能性がある。

低波数 ROA 信号の非局在性をさらに具体的に理解するために、分子断片の長さを変えて量子力学計算を行い、キラル信号を発生させる相互作用の長さを明らかとした(図4)。その結果、実験スペクトルを再現するためにはアミノ酸12個(ヘリックス二巻き分)以上の長い分子断片を用いる必要があった。これは高波数 ROA の再現に必要なヘリックス一巻き分(アミノ酸6個)と比べて約二倍と長かった。低波数 ROA がタンパク質内におけるヘリックスの構造揺らぎ、すなわち、あるヘリックスの一巻きと、次の一巻きとの構造関係、を反映する可能性を示すものであり興味深い。

溶液中で PP-II ヘリックス構造をとるコラーゲンモデルペプチドの低波数 ROA 測定を行い、従来の 800cm^{-1} 以上の高波数領域と比べて 5-10 倍のキラル信号を示すことを明らかとしたことは、新たな高感度キラル測定法の開発の観点から大きな進捗である。さらに、分子断片化法を用いた量子力学および分子動力学計算により、コラーゲンモデルペプチドの高強度な低波数 ROA スペクトルを良く再現することができた。相対強度および波数について、実験スペクトルと計算スペクトルが良く対応しており、高強度 ROA ピークの振動モードの帰属が可能となった。実験スペクトルと計算スペクトルの比較から、コラーゲンモデルペプチドの高強度な低波数 ROA 信号は、アミド基平面に関した原子運動と側鎖が関連した非局在化した原子運動に帰属されることが分かった。さらに、分子動力学と量子力学計算を組み合わせた解析から、 100cm^{-1} 付近の高強度 ROA 信号のピーク幅は、溶液中ペプチドの構造揺らぎを反映することが明らかとなった。

これまでの低波数 ROA の測定可能な波数範囲は、申請者らが以前に行った 70cm^{-1} 付近までであった。本研究において特殊な光学設計を採用することで、この測定下限を 35cm^{-1} 付近まで拡張することを達成した。これまでの低波数 ROA 信号に比べて、さらに非局在化し、高強度なキラル信号や、キラル溶媒和を反映したキラル信号を検出できる可能性がある。このことは、タンパク質のキラル高次構造の解析に限らず、より一般的なキラル計測法の開発の観点からも、大きな進展である。

開発した 35cm^{-1} 付近まで測定可能な極低波数 ROA 装置を用いて、結晶構造が既知である種々のタンパク質の水溶液を測定し、タンパク質構造(一次、二次、三次)と極低波数 ROA スペクトルとの相関を検討した。主な二次構造がヘリックス、シート、PP-II ヘリックスまたはランダムコイルであるタンパク質について測定し比較することで、二次構造を反映する低波数 ROA の特徴を調べた。一方で、二次および三次構造が似通ったタンパク質を比較し、一次構造または溶媒和状態の違いに起因するスペクトル特徴を明らかとした。さらに重水素化した溶媒および非水溶媒を用いて測定を行うことで、溶媒分子とタンパク質が協奏的に生み出すキラル信号の有無を検討した。タンパク質が形成するであろうキラルな溶媒和状態を直接検出できる手法として期待される。

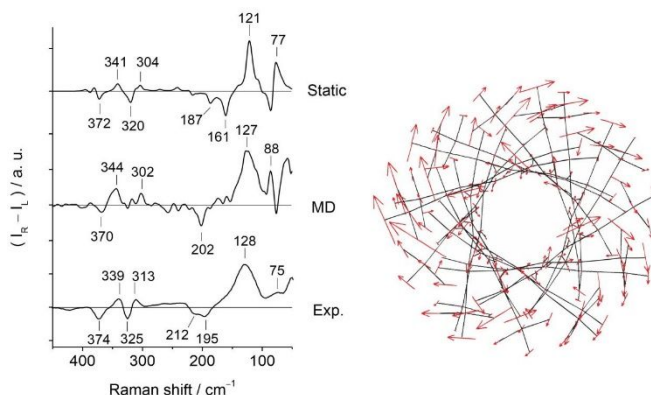


図3. 溶液中ポリ-L-アラニンの低波数ROAのQM計算(左上)、QM-MD計算(左中)、実験(左下)スペクトルおよびヘリックス軸方向から見た 130cm^{-1} 付近の高強度ピークの原子運動(右の赤矢印)

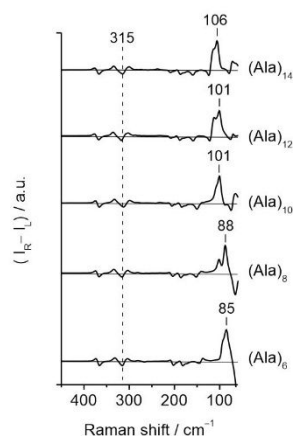


図4. 計算低波数ROAスペクトルの分子断片長さ依存性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yamamoto Shigeki, Kimura Fumiya | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Probing the solvation of the α -helix with extended amide III bands in Raman optical activity | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics | 6. 最初と最後の頁 3191 ~ 3199 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cp04480j | 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 Yamamoto Shigeki, Ishiro Shota, Kessler Jiri, Bour Petr | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Intense chiral signal from α -helical poly-L-alanine observed in low-frequency Raman optical activity | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics | 6. 最初と最後の頁 26501 ~ 26509 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cp04401j | 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 Ozaki Yukihiro, Bec Krzysztof B., Morisawa Yusuke, Yamamoto Shigeki, Tanabe Ichiro, Huck Christian W., Hofer Thomas S. | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Advances, challenges and perspectives of quantum chemical approaches in molecular spectroscopy of the condensed phase | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Chemical Society Reviews | 6. 最初と最後の頁 10917 ~ 10954 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cs01602k | 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 Yamamoto Shigeki, Ohnishi Erika, Sato Harumi, Hoshina Hiromichi, Ishikawa Daitaro, Ozaki Yukihiro | 4. 巻 123 |
| 2. 論文標題 Low-Frequency Vibrational Modes of Nylon 6 Studied by Using Infrared and Raman Spectroscopies and Density Functional Theory Calculations | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B | 6. 最初と最後の頁 5368 ~ 5376 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b04347 | 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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shigeki Yamamoto |
| 2. 発表標題 Relation Between Solvated States of α -Helical Peptides and Extended Amide III Bands in Raman Optical Activity |
| 3. 学会等名 10th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS10) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井城翔太, 山本茂樹 |
| 2. 発表標題 低波数ラマン光学活性に観測されるテルペンの高強度キラル信号 |
| 3. 学会等名 日本分光学会年次講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井城翔太, 塚原聡, 山本茂樹 |
| 2. 発表標題 低波数ラマン光学活性によるリモネンおよび類似化合物の高強度キラル信号の測定 |
| 3. 学会等名 日本分析化学会第68年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室
<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/tsukahara/>

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 | | | |
|---------|---------|--|--|--|
| チェコ | IOCB | | | |
| チェコ | IOCB | | | |