

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04975

研究課題名（和文）ハイパーラマン分光法によるタンパク質二次構造研究の新展開

研究課題名（英文）Study of secondary structures of proteins by using hyper-Raman spectroscopy

研究代表者

奥野 将成（Okuno, Masanari）

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00719065

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）：非線形振動分光法の一つである、ハイパーラマン（HR）分光法によって、タンパク質をはじめとした生体関連分子に関する新たな構造情報を得ることを目的とした。本研究では、タンパク質中のアミド結合のモデル分子であるN-メチルアセトアミドからのアミドバンドのHR分光法によるはじめての検出、二次構造のHR分光法による判別可能性、トリメチルアミン-N-オキシドなどの浸透圧調整物質の水分子への振動の水分子の束縛回転モードからのアプローチが主な結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質などの生体分子の分子構造は、その機能を考えるうえで非常に重要である。水溶液中での構造は、生体分子が機能を発現している状態であるにもかかわらず、研究することが難しく、新たな研究手法を探求する必要がある。本研究では、非線形振動分光法の一つであり、これまでほとんど研究が行われていないハイパーラマン分光によって生体関連分子に初めて適応した。結果として、従来の分光法と同様にタンパク質の二次構造を判別できる点、従来の分光法では測定できなかった、生体関連分子による周囲の水素結合環境の変化など、新たな知見を得ることができた。このように、生体関連分子を研究する手法として、HR分光法の可能性を開拓した。

研究成果の概要（英文）：This study aims to obtain structural information on biomolecules, including proteins, by using hyper-Raman (HR) spectroscopy, which is one of vibrational spectroscopies. First, we detected multiple amide bands originating from the peptide structure of N-methylacetamide by HR spectroscopy. Second, we characterized the secondary structures of several model peptides, whose molecular structures are well-defined, from the amide bands in the observed HR spectra. Third, we studied the hydration structures of water molecules in the vicinity of osmolytes, including urea, ter-butyl alcohol, and trimethylamine-N-oxide by HR spectroscopy. We focus on the librational bands of water originating from the hindered rotation in the low-frequency region. We show that HR spectroscopy can detect the change of the librational bands, which can be hardly detected by IR and Raman spectroscopy.

研究分野：分子光学学

キーワード：非線形分光 ラマン分光 生体関連分子

1. 研究開始当初の背景

生体分子の構造に関する知見は、その機能を理解するために必要不可欠である。これまでにさまざまな手法が生体分子の構造の計測に利用されている。その中でも、振動分光法は振動スペクトルを通じて、試料の形態を問わず分子の構造情報を得ることができる手法である。これまでに、赤外吸収分光法およびラマン分光法が広く用いられ、液相中の分子構造を研究するために必要不可欠な手法となっている。一方、赤外・ラマン分光法と同様の振動分光法であるハイパーラマン (HR) 分光法は、これまでに生体分子を研究するための手法としてほとんど用いられなかった。HR 散乱は 2 光子が消失し、その和のエネルギーから分子振動分のエネルギーだけシフトしたエネルギーをもつ 1 光子が散乱される現象である。HR 散乱断面積は極めて小さく、測定が困難であり、生体分子のみならずこれまで研究がほとんど進んでいない。

2. 研究の目的

HR 分光法を溶液中の生体関連分子へと応用する。HR 分光法では、赤外・ラマン分光法では得られない分子構造情報が得られる可能性がある。また、赤外・ラマン分光法では得ることが難しい、低波数振動の情報を得ることができる。HR 分光法を生体分子に適用することで、タンパク質をはじめとする生体分子から、これまでに得られなかったスペクトル情報を取得できると期待される。生体分子自身の信号のみならず、水溶液中であれば水分子の信号に着目することで、周囲の水素結合環境についての構造情報を得ることが予想される。このように、HR 分光法の適用範囲を広げ、生体分子から構造情報を抽出する手法として確立することを目指す。

3. 研究の方法

微弱な HR 信号を検出するために、我々の研究室で構築した高感度な HR 分光計を用いた。ピコ秒レーザーの出力である 1064 nm もしくはその第二高調波である 532 nm を励起光とした HR 分光計、もしくはフェムト秒レーザーの出力の第二高調波である 515 nm のスペクトルを狭帯域化し、ピコ秒化した光源を励起光とした HR 分光計により測定を行った。分光計の高感度化を達成したことにより、それぞれの測定において、これまでに不可能であった偏光解消度の測定を行えるようになり、一部の測定では偏光を制御することで HR 信号の偏光解消度を決定した。

水溶液系の測定においては、温度によって信号のピーク位置がシフトする可能性があるために高精度で温度調整が可能なキュベットホルダーに石英製のキュベットを入れ、測定を行った。

4. 研究成果

本研究で得られた成果は以下のように 3 つに大別できる。すべてすでに査読付き雑誌に掲載されている。

(1) ペプチド結合のモデル分子である N-methylacetamide (NMA) の測定

NMA はペプチド結合を含む最小の分子であり、分光法におけるモデル分子として用いられる。振動分光法においては、ペプチド結合に特徴的なアミドバンドの研究に用いられている。本研究では、HR 分光法によるアミドバンドの検出に世界で初めて成功するなど、以下のようない結果が得られ、*J. Phys. Chem. Lett.*, **12** 4780-4785 (2021) として出版されている。

HR 分光法によるアミドバンドの検出

赤外・ラマン分光法では選択律から、アミドバンドの有無や強度が大きく異なる。赤外分光法では主にアミド II バンドに着目した研究が行われている一方、ラマン分光法ではアミド I および III バンドが主に研究されている。赤外分光法ではアミド I バンドは溶液中においては水の変角振動に埋没してしまい、研究が難しい。また、可視光を励起光とした場合、ラマン分光法ではアミド II バンドは検出されないことが知られている。

図 1 に NMA 純液体から取得した、1064 nm 励起および 532 nm 励起 HR スペクトル、532 nm ラマンスペクトルおよび ATR 配置で取得した赤外吸収スペクトルを示す。HR、ラマンおよび赤外吸収スペクトルは、互いに大きく異なり、選択律の違いを反映している。HR スペクトル中には、1665 cm^{-1} 、1565 cm^{-1} 、1375 cm^{-1} 、1300 cm^{-1} および 882 cm^{-1} にそれぞれアミド I、II、S (CCH₃ symmetric bend.)、IVa に帰属される信号が検出された。また、アミド VI および IVb に由来するバンドが 631 cm^{-1} および 598 cm^{-1} に観測された。さらに、低波数領域にアミド VIII (297 cm^{-1}) および IX (198 cm^{-1}) が観測された。このように、アミド V を除くアミドバンドの検出に成功した。

HR スペクトルで特徴的であるのは、アミド III および II バンドの相対強度が大きい点である。これは赤外・ラマン分光法と相補的に HR 分光法をアミドバンドの検出に用いることができることを示している。また、アミド I バンドのピーク位置について、赤外吸収およびラマンスペクトルではそれぞれ 1641 cm^{-1} および 1651 cm^{-1} に観測されているのに対して、HR スペクトルでは 1665 cm^{-1} と有意に高波数に観測された。このような赤外・ラマン・HR スペ

クトル間のピーク位置の違いは、アミド I バンドで顕著であるものの、他のバンドでは大きな違いは見られない。このアミド I バンドの分光法によるピーク位置の違いを、ノンコインシデンス効果に帰属した。アミド I バンドは大きな極性をもつ C=O 結合の伸縮振動の寄与が大きく、各分子の C=O 結合が双極子相互作用を通じてノンコインシデンス効果を引き起こすことが知られている。本研究では、確立されている赤外・ラマン信号のノンコインシデンス効果に加えて、同効果により HR 信号もこれらと異なるピーク位置を与えることを見出した。

NMA の HR スペクトルにおける電子共鳴効果の検討

また、電子共鳴効果が NMA の HR スペクトルに与える影響を研究するため、1064 nm と 532 nm の二つの励起波長において、アミドバンドの偏光解消度を決定した。アミド II および III バンドについて、1064 nm 励起では偏光解消度が 0.3 に近い値であったのに対し、532 nm 励起では 0.2 に近い値が得られた。励起光を短波長化すると偏光解消度が 0.2 に近づくということは、一つの電子状態に共鳴していることを示唆しており、本研究では 190 nm に存在する $\pi-\pi^*$ 遷移に 2 光子共鳴していることが考えられた。一方、アミド I バンドについては 1064 nm および 532 nm 励起ともに偏光解消度は有意に 0.2 よりも大きな値になった。これは、アミド I バンドはアミド II、III バンドとは異なる電子共鳴効果を受けていることを意味している。この結果は、紫外共鳴ラマン分光による NMA の結果と矛盾しないものである。

以上のように、モデル分子である NMA の HR 分光を行うことで、バンド強度・ピーク位置・励起波長依存性・溶媒依存性など、基礎物理化学的な知見を多く得ることに成功した。一方、より詳細な電子共鳴効果のメカニズムや、ノンコインシデンスの起源については、今後の研究課題である。

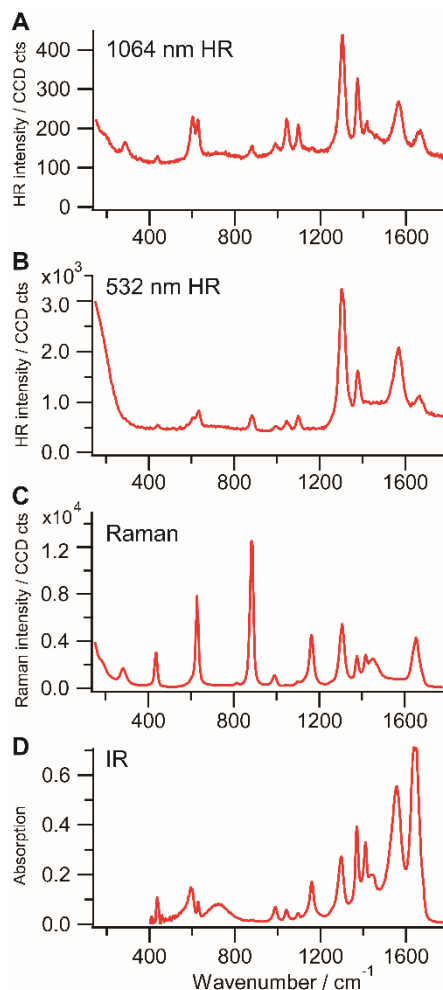


図 1 NMA 純液体から得られた HR スペクトル (a: 1064 nm 励起, b: 532 nm 励起), c; ラマンスペクトル, d: 赤外吸収スペクトル

(2) モデルペプチドを用いた、HR 分光法によるタンパク質二次構造決定の研究

NMA の結果を踏まえ、HR スペクトルに基づいた二次構造の研究を行った。この結果は *J. Phys. Chem. B* **127** (30), 6675-6683 (2023) にて出版されている。水溶液中において二次構造がよくわかっているモデルペプチドである、ポリ-L-リシン (PLL)、ポリ-L-グルタミン酸 (PLGA)、ポリ-L-オルニチン (PLO) を測定対象とし、温度および pH を制御することで二次構造を変化させた測定を行った。PLL については、図 2 に示すように α -helix およびランダムコイル構造、PLGA については、図 3 に示すように α -helix、 β -sheet およびランダムコイル構造とし、515 nm を励起光とした HR スペクトルを取得した。

α -helix およびランダムコイルについて、以下のスペクトルの特徴が得られた。 α -helix では 1300 cm^{-1} 付近のアミド III バンドが非常に幅広く観測された一方、ランダムコイルでは 1260 cm^{-1} および 1394 cm^{-1} にアミド III および CCH₃ 対称伸縮振動が分かれて検出された。バンド強度について、 α -helix ではアミド I バンドが II バンドよりも強く観測された一方、ランダムコイルではこれらが同程度で観測された。これらは 3 つすべてのポリペプチドでみられた共通の特徴である。 β -sheet については、アミド III はランダムコイルに近い特徴と、アミド I および II バンドでは II の方が I より強いという特徴が得られた。

これらの特徴に加えて、アミド I バンドのピーク位置が $1660 \sim 1680\text{ cm}^{-1}$ という非常に高波数に観測されることを見出した。このピーク位置はラマン分光や赤外吸収で観測されるピーク位置よりも 10 cm^{-1} 以上高波数である。この結果を確かめるために、PLGA について重水を溶媒とした測定を行った。その結果、アミド I バンドのピーク位置が有意に高波数に位

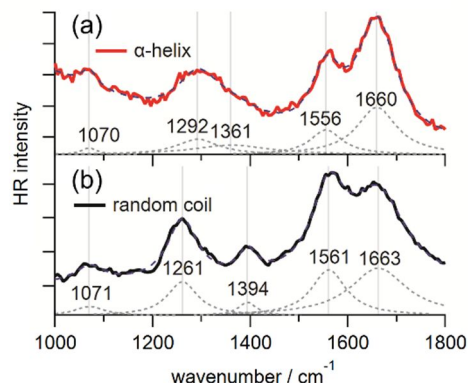


図 2 PLL の HR スペクトル。
a: α -helix, b: ランダムコイル

置していることが確かめられた。アミド I バンドが高波数に観測された由来について、NMA で得られていた結果と同様に、ノンコインシデンス効果によるものと考えた。ポリペプチド分子内に多数存在する C=O 結合が、双極子相互作用によってノンコインシデンス効果を受け、赤外・ラマン信号と比べると、高波数に存在する振動モードがハイパーラマン散乱を強く放出する振動を与えたと考えられる。

以上のように、HR 分光法を用いて、二次構造が良く規定されたポリペプチドを測定し、そのスペクトルの特徴と二次構造の相関を得ることができた。HR スペクトル中で認められたユニークな特徴の一つは、他の振動分光法と比較してアミド I バンドが高波数に存在することであり、赤外・ラマン分光法と相補的に用いることで、ノンコインシデンス効果を通して新たな構造情報が得られる可能性がある。

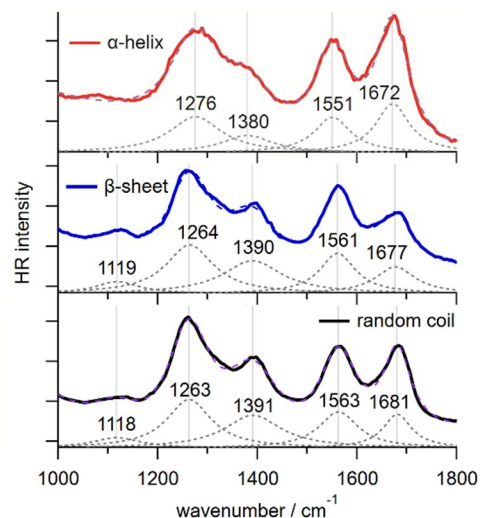


図 3 PLGA の HR スペクトル。
a: α -helix、b: β -sheet、c: ランダムコイル

(3) 浸透圧調整物質の水溶液における水の低波数振動モードの研究

トリメチルアミン-N-オキsid (TMAO) や尿素は生細胞中において浸透圧調整物質として働くことが知られている。しかし、その分子レベルの動作機序に関して、解明されていない点が残されている。その中で重要な点は、これらの分子がタンパク質と直接相互作用するのか、それとも周囲の水分子と相互作用して水素結合環境を変化させ、その水素結合がタンパク質と相互作用するのか、という点である。本研究では、HR 分光法によってこれらの水溶液を測定することで、新たな構造情報を得ることを目指した。従来の赤外・ラマン分光法では非常に高い濃度の水溶液について、OH 伸縮振動に着目した研究が行われている。一方本研究では、HR 分光法によって水分子の librational モード (束縛回転モード) が強く観測されることを用い、この低波数に現れる振動バンドが、生体に存在する分子濃度 ($\sim M$) でどのように振る舞うのかを明らかにした。この結果は *Phys. Chem. Chem. Phys.* **26** (16), 12397-12405 (2024). として出版されている。

TMAO、尿素および TMAO に構造に近い *tert*-ブチルアルコール (TBA) の水溶液をさまざまな濃度で 532 nm 励起 HR 分光装置で測定した。その結果、これら 3 つの分子の水溶液で $< 2 M$ の領域では OH 伸縮振動のバンドのピーク位置はほとんど変化しなかった。一方、水分子の束縛回転運動に由来する librational モードについては、TBA と尿素では純粋な水とほとんど変化が見られなかった一方、TMAO では濃度をあげるにつれてピーク位置が大きく変化することを見出した。純粋な水と比べると、librational モードが $15\sim 20\text{ cm}^{-1}$ 高波数シフトすることが観測された。OH 伸縮振動がほとんど変化しなかったのに対し、この librational モードの変化は非常に大きい変化である。これは、OH 伸縮振動が 1 分子程度に局在化した分子運動であるのに対して、librational モードは本質的に非局在化した振動であり、これらが相関しないことを意味している。Librational モードのピーク位置を、室温で測定した TMAO の水溶液と、低温で測定した純粋な水と比較すると、TMAO から得られたピーク位置は 5 程度の純粋な水のピーク位置に相当することがわかった。これは、TMAO が $\sim 1 M$ 程度の濃度であるにもかかわらず、水分子の束縛回転運動を低温環境のように強く束縛していることを示唆している。

このように、束縛回転運動が TMAO 分子によって強く束縛される原因について、先行研究と比較することにより、TMAO が複数の水分子と水素結合により強く結合し、錯体を形成することに帰属した。TMAO は N-O 結合において N が正、O が負に電荷をおびており、O 原子に水分子が強く複数結合する。その水分子にさらに複数の水分子が水素結合し、その運動が束縛されることが提唱されている。本研究で回転運動が束縛された水分子は、これらの TMAO の周囲の水分子群であると考えた。

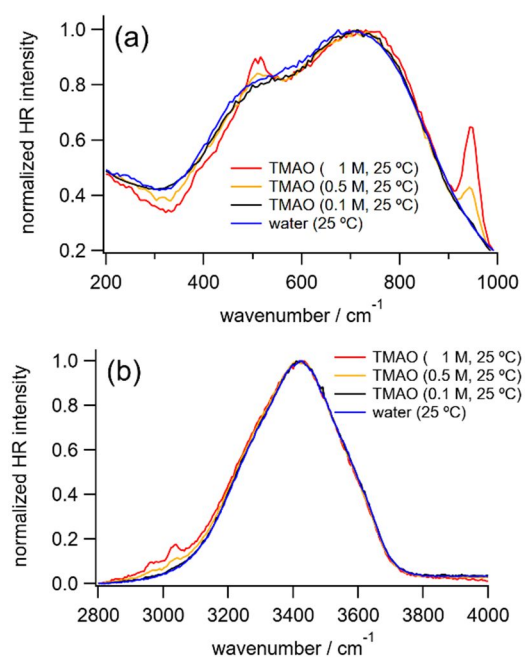


図 4 TMAO 水溶液の HR スペクトル。
a: 低波数領域、b: OH 伸縮振動領域

以上のように、TMAO がつくる特異的な水素結合環境を HR 分光法により明らかにした。重要な点は、通常振動分光法で研究対象とされる OH 伸縮振動領域にはほとんど変化が見られず、librational モードにおいてのみ大きな変化が観測された点である。Librational モードは低波数に位置するために赤外吸収では観測が難しく、ラマン分光では信号強度が小さいという問題がある。本研究では、librational モードを高感度に検出できるという HR 分光法の特徴を生かし、生体関連分子の構造にアプローチすることができることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Kazuki, Morimoto Tenri, Yokogawa Daisuke, Okuno Masanari	4. 巻 157
2. 論文標題 Hyper-Raman spectroscopy of benzene and pyridine revisited	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 054505 ~ 054505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0099204	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 Inoue Kazuki, Litman Yair, Wilkins David M., Nagata Yuki, Okuno Masanari	4. 巻 14
2. 論文標題 Is Unified Understanding of Vibrational Coupling of Water Possible? Hyper-Raman Measurement and Machine Learning Spectra	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 3063 ~ 3068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.3c00398	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 Asakura Masaya, Okuno Masanari	4. 巻 12
2. 論文標題 Hyper-Raman Spectroscopic Investigation of Amide Bands of <i>N</i> -Methylacetamide in Liquid/Solution Phase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 4780 ~ 4785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.1c01215	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 Morimoto Tenri, Okuno Masanari	4. 巻 50
2. 論文標題 Polarized Hyper-Raman Study of Cyclohexane- h_{12} and $-d_{12}$ in the Liquid Phase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1512 ~ 1515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210225	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 Yu Xiaoqing, Seki Takakazu, Yu Chun-Chieh, Zhong Kai, Sun Shumei, Okuno Masanari, Backus Ellen H. G., Hunger Johannes, Bonn Mischa, Nagata Yuki	4. 巻 125
2. 論文標題 Interfacial Water Structure of Binary Liquid Mixtures Reflects Nonideal Behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 10639 ~ 10646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c06001	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 Iwano Tsukasa, Shitamatsu Kota, Ogiwara Naoki, Okuno Masanari, Kikukawa Yuji, Ikemoto Satoru, Shirai Sora, Muratsugu Satoshi, Waddell Paul G., Errington R. John, Sadakane Masahiro, Uchida Sayaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Ultrahigh Proton Conduction via Extended Hydrogen-Bonding Network in a Preyssler-Type Polyoxometalate-Based Framework Functionalized with a Lanthanide Ion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 19138 ~ 19147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.1c01752	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 Liu Tsung-Han, Okuno Masanari	4. 巻 127
2. 論文標題 Characterization of Secondary Structures of Model Polypeptides in Solutions with Hyper-Raman Spectroscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6675 ~ 6683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.3c02101	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 Liu Tsung-Han, Okuno Masanari	4. 巻 26
2. 論文標題 TMAO perturbs intermolecular vibrational motions of water revealed by low-frequency modes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 12397 ~ 12405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D4CP01025F	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13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 奥野将成
2. 発表標題 Revival of hyper-Raman spectroscopy: polarization dependence and molecular structures
3. 学会等名 2022年度日本分光学会年次講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上一希、奥野将成
2. 発表標題 ハイパーラマン分光法によるイオンの水和構造の研究
3. 学会等名 2022年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本天麗、奥野将成
2. 発表標題 水のハイパーラマン信号の特異な偏光依存性と非局在化した分子振動
3. 学会等名 2022年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上一希、奥野将成
2. 発表標題 ハイパーラマン分光法による高濃度酸水溶液の研究への応用
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本天麗、奥野将成
2. 発表標題 液体の水の非局在化した分子振動のハイパーラマン分光による研究
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥野将成
2. 発表標題 非線形分光法でみる分子キラリティー：バルク液体から単分子膜まで
3. 学会等名 第15回分子科学討論会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本天麗、奥野将成
2. 発表標題 偏光ハイパーラマン分光による液体シクロヘキサンの振動モードの帰属
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朝倉将矢、奥野将成
2. 発表標題 ハイパーラマン分光法によるN-メチルアセトアミドのアミドバンドの研究
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上一希、奥野将成
2. 発表標題 液体状態の水のハイパーラマンスペクトルの温度および偏光依存性
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masanari Okuno
2. 発表標題 Long-range correlation of molecular vibrations in liquid water probed by polarization-resolved hyper-Raman spectroscopy
3. 学会等名 8th Asian Spectroscopy Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsung-Han Liu, Masanari Okuno
2. 発表標題 Hyper-Raman Spectroscopy for Characterizing Secondary Structures of Polypeptides in Aqueous Solutions
3. 学会等名 第17回分子科学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsung-Han Liu, Masanari Okuno
2. 発表標題 Hyper-Raman spectroscopic study on characterization of secondary structures of model polypeptides in solutions
3. 学会等名 8th Asian Spectroscopy Conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsung-Han Liu, Masanari Okuno
2. 発表標題 Hyper-Raman spectroscopic application in characterization of secondary structures of model polypeptides in solutions
3. 学会等名 2023年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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