

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24540323

研究課題名(和文) 高強度中赤外光を用いたタンパク質の光誘起構造ダイナミクス研究

研究課題名(英文) Photo-induced structural dynamics of proteins studied with intense mid-infrared laser pulses

研究代表者

中村 亮介 (NAKAMURA, Ryosuke)

大阪大学・産学連携本部・講師

研究者番号：70379147

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)：本研究では、光受容タンパク質PYPの光反応途中において、高強度中赤外光を照射し、特定振動モードを選択的に励振する。その効果を観測することで、超高速反応を実現しているプロトン移動と構造異性化との協調機構を解明することを目的とした。中赤外光照射による反応過程の変化(促進、抑制、分岐など)は本システムの測定精度( $< 10^{-4}$ )では有意の差としては現れなかったが、本研究手法により、初期状態における振動エネルギーフローの全容を明らかにすることができた。また、フェムト秒誘導ラマン散乱測定によって、励起状態における超高速水素結合ダイナミクスを世界で初めてとらえることに成功した。

研究成果の概要(英文)：To reveal proton transfer and structural isomerization dynamics of photoactive yellow protein (PYP), we have developed the pump-pump-probe spectroscopy: The first pump pulse at 400 nm initiates the photocycle of PYP, the second pulse at mid-infrared modulates the vibrational states of the chromophore, and the subsequent broadband probe pulse measures the absorption spectrum of PYP. We have examined the effect of the mid-infrared pump pulse on the photocycle of PYP with a variety of the frequency and timing of the second pump pulse. It is found that the effect is less than our system noise level,  $10^{-4}$ . However, by using this method, we obtained the unified view of the vibrational energy flow in the electronic ground state of PYP. In addition, ultrafast hydrogen bonding dynamics in the electronic excited state was revealed with the femtosecond stimulated Raman spectroscopy.

研究分野：数物系科学・物理学・物性I・光物性

キーワード：超高速分光 タンパク質 反応制御

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は“機能”を発現する過程で、その構造を適切に、高効率に変化させる。その特有の構造変化は、アミノ酸残基で構成される水素結合ネットワークによって巧みに制御されていることが、最近の遺伝子改変技術やX線構造解析、分光研究によって明らかになってきた。

光受容タンパク質 Photoactive Yellow Protein (PYP)においては、光励起によって一連の構造変化(光反応サイクル)が生じる。その際、発色団近傍(図1参照)における水素結合ネットワーク内のプロトン着脱が、構造変化と協調するように次々に進行する。マイクロ秒~ミリ秒の遅い構造ダイナミクスについては、核の動きをスナップショットとして捉えることに成功している。一方で、光励起直後の超高速構造ダイナミクスに関しては不明な点が多い。これまでに、フェムト秒赤外吸収分光によって、最初の構造中間体 I<sub>0</sub>では、すでに異性化していることが報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、光受容タンパク質の光誘起構造ダイナミクスの初期過程において、プロトン移動と構造異性化との協調機構を明らかにすることが第一の目的である。特に、カルボニル部位の水素結合に着目し、光励起直後から時々刻々と変化する核の動きと非調和性を明らかにする。そのために、光励起直後の振動モードの変化を、フェムト秒中赤外プローブ分光およびフェムト秒誘導ラマン分光によって追跡する。トランス・シス異性化、プロトン移動に対して指標となる振動モードはすでに分かっているので、それらの時間変化を追跡・解析することで、核の動きと非調和性を明らかにする。

次に、高強度中赤外光を用いて、水素結合部分を強く励振し、非調和性を伴った高い振動量子数まで励起する。その後の振動モードの変化や反応過程を追跡することで、水素結合ネットワークが構造ダイナミクスに与える影響を調べる。水素結合に対する光変調を基軸としたタンパク質の反応制御・構造変化誘起の可能性を提示することが、第二の目的である。

## 3. 研究の方法

開発済みの中赤外過渡吸収分光装置、可視過渡吸収分光装置を改良し、一体化する。反応トリガー光(400 nm)、電子状態プローブ白色光(可視)、高強度振動励起光(中赤外)、振動プローブ光(中赤外)のさまざまな組み合わせが可能な一体型高精度分光装置を開発する。試料は、発色団周辺のアミノ酸残基を改変した一連の変異体光受容タンパク質

を用いることで、系統的比較を行い、水素結合ネットワークの役割を明らかにする。高強度中赤外光の有無による微小な変化を、振動プローブ光および電子状態プローブ光を用いて探索する。高強度中赤外光の波長、タイミング、偏光を変化させることで、水素結合ネットワークと構造異性化に関わるモード間の相互作用を明らかにする。

### (1)高精度分光装置の開発

現有の中赤外過渡吸収分光装置に対して改良を行う。チタンサファイアレーザー再生増幅器からの10%(0.1 mJ)の出力光を利用して、反応トリガー光(400 nm)、電子状態プローブ白色光(可視)を発生させる。プローブ白色光を検出するために、分光器・フォトダイオードアレイを設置し、レーザー(1 kHz)、2位相チョッパー(250, 500 Hz)との同期をとる。可視および中赤外領域において $10^{-4}$ 以下の吸収変化量を精度よく取得することを目標とする。

### (2)振動状態基礎データの取得

反応トリガー光によって光反応サイクルを開始させ、その初期過程における振動状態の変化を中赤外プローブ光によってモニターする。プロトン移動( $1,500 - 1,700 \text{ cm}^{-1}$ )と異性化( $1,200 - 1,400 \text{ cm}^{-1}$ )の指標となる振動モードの相関を追跡する。また、スペクトル変化から非調和性について解析する。中赤外過渡吸収分光だけでは、目的の振動モードと他の振動モードとの分離をするうえで、不確かさが生じる可能性も考えられる。したがって、フェムト秒誘導ラマン分光も補足的に行うことで正確な情報を得る。特に、電子状態に共鳴させることで選択性の向上が期待できる。二つの分光法は、得られる情報、測定の困難さなどに関して相補的であり、両方行えることは、本研究の強みである。

### (3)振動励起光の導入

振動励起光の有無によって生じる振動状態、電子状態に関するわずかな信号強度変化をとらえる。高強度中赤外光照射によって、その後の振動状態・電子状態が変化したとき、非線形効果や熱の効果と分離する必要がる。そのために、中赤外光の波長やタイミング、偏光をパラメータとして詳細に効果を調べる。また、一連の変異体試料を用いることも有効であると考えている。

### (4)制御へ向けた試み

高強度中赤外光によって、より高い振動量子数まで励起するため、非調和性に合致したチャープを与える。回折格子とレンズの組み合わせにより、正負のチャープをコントロールする。チャープ制御装置の透過率が低く、必要な光強度が得られない場合は、CaF<sub>2</sub>やGeなどの正負の分散をもつ窓材を組み合わせる。チャープ制御を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高精度分光装置の開発

チタンサファイアレーザー(繰り返し1 kHz、出力1 mJ)を主要光源とし、出力の90%を光パラメトリック増幅(OPA)・差周波発生へと導入し、中赤外領域の高強度振動励起光、振動プローブ光を得た。約10 - 15 uJの高強度中赤外光が本装置により得られており、本研究目的を達成するために十分であると見込まれる。チタンサファイアレーザーの残り10%の出力光を用いて、反応トリガー光(400 nm)、電子状態プローブ白色光を発生させた。1 kHzのレーザーと同期させた2位相チョッパーを導入することで、わずかな吸収変化量(10<sup>-4</sup>)も精度よく取得することが可能となった。検出器は、電子状態プローブ白色光に対してはフォトダイオードアレイを、中赤外プローブ光に対してはMCT検出器を用いた。

##### (2) フェムト秒誘導ラマン散乱分光

反応トリガー光(400 nm)による光反応開始直後の構造情報を得るため、光受容タンパク質PYP(野生型WTおよび変異型E46Q)のフェムト秒誘導ラマン散乱を行った。発色団であるp-クマル酸とその周辺アミノ酸残基の構造を図1に示す。

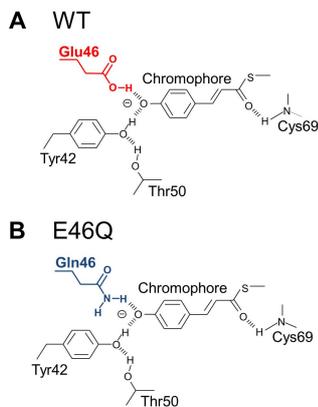


図1 p-クマル酸と周囲のアミノ酸残基の構造。(A) WT (B) E46Q

次に、図2 Aに基底状態における誘導ラマン散乱スペクトルを示す。この結果は、これまでに報告されている自発ラマン散乱スペクトルとほぼ一致している。1450 - 1600 cm<sup>-1</sup>には、芳香環およびエチレン部のC-C、C=C伸縮振動、1100 - 1350 cm<sup>-1</sup>にはC=C(またはC-C)と面内CH rocking振動が結合したモード、1000 cm<sup>-1</sup>以下には、skeletonモードや面外振動などが含まれる。同じ図にE46Qの誘導ラマン散乱スペクトルを1290 cm<sup>-1</sup>のモードで規格化して図示した。明らかな違いとして、E46Qの1555 cm<sup>-1</sup>のラマン強度が大

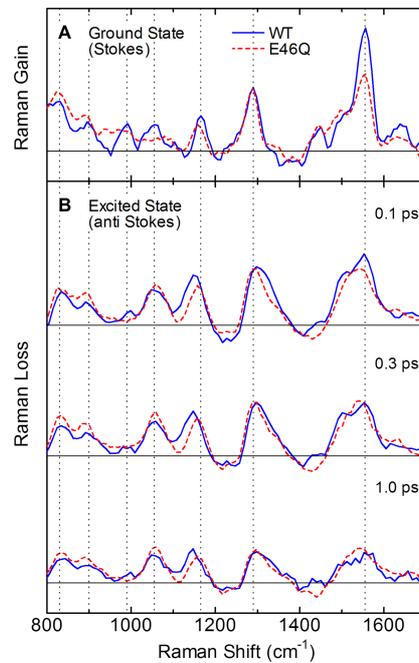


図2 基底状態(A)および励起状態(B)における誘導ラマン散乱スペクトル

きく減少していることが分かる。1555 cm<sup>-1</sup>の振動モードはチロシンY19aに対応するp-クマル酸芳香環の伸縮モードであり、フェノール部位の水素結合状態に大きく依存することが知られている。

図2 Bに励起状態における誘導ラマンスペクトルを示す。WTは基底状態に比べて、1555 cm<sup>-1</sup>のラマン信号の相対強度が大きく減少していることが分かる。一方、E46Qはあまり変化していない。結果として、励起状態では、WTとE46Qとがほぼ同じスペクトルとなっている。しかし、1555 cm<sup>-1</sup>のラマン信号相対強度の時間変化を詳細に見てみると、図3に示すように両者で異なることが分かる。WT

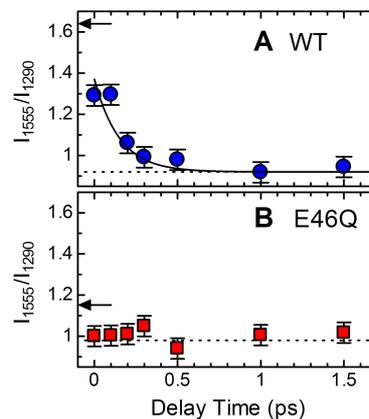


図3 1290 cm<sup>-1</sup>のラマン信号に対する1555 cm<sup>-1</sup>の相対強度。WT (A)とE46Q (B)。図中の実線は0.15 psの時定数で減衰する指数関数。矢印は基底状態での相対強度比

の場合、基底状態における相対強度比は図中矢印で示すように 1.64 である。励起後、相対強度比は急激に減少し、1 ps 以上の時間領域では一定値 0.92 に達する。その減衰時間は時間分解能とほぼ同程度の 150 fs である。一方で、E46Q は、励起後、相対強度比はほとんど変化せず 0.98 であり、基底状態での値 1.15 に近い。以上の結果から、WT では励起後、Glu46 と p-クマル酸フェノール部位との水素結合が、時間分解能 150 fs よりも速い時間で変化していると考えられる。

### (3) 中赤外励起 可視プローブ分光

次に、PYP の発色団および周辺アミノ酸残基の特定振動モードを中赤外光で励起した後の構造変化、振動エネルギーの移動を、中赤外励起 - 可視プローブ分光で明らかにした。用意した中赤外励起光を図 4 に示す。中心周波数は 1340, 1420, 1500, 1670  $\text{cm}^{-1}$  である。

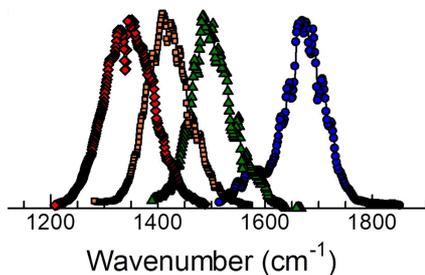


図 4 実験で用いた中赤外励起光

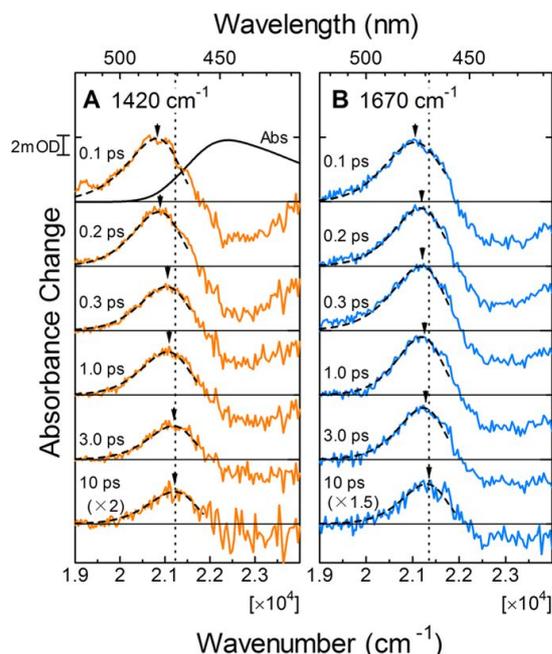


図 5 中赤外光励起による時間分解吸収スペクトル。励起光の中心周波数は (A) 1420、(B) 1670  $\text{cm}^{-1}$ 。定常吸収スペクトルを黒実線で (A) に示す。矢印は過渡吸収スペクトルのピーク位置を指す

図 5 に PYP の中赤外励起による可視吸収変化スペクトルを示す。440nm 付近の負の信号は、基底状態の退色信号である。一方、その長波長側に現れた正の信号は振動励起状態からの過渡吸収信号である。励起後の時間とともに過渡吸収スペクトルのピークは短波長側にシフトしていき、信号強度は減少していく様子が見取れる。それらの詳細を図 6 および図 7 に示す。

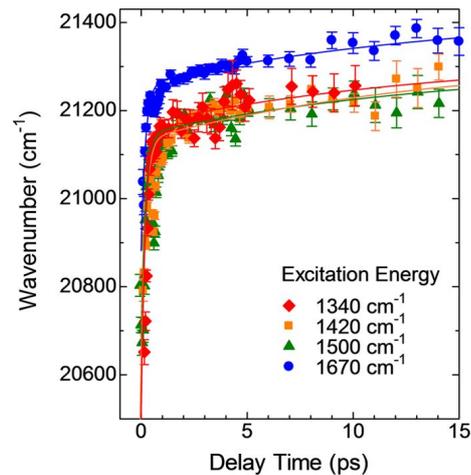


図 6 過渡吸収スペクトルにおけるピークエネルギーの時間変化

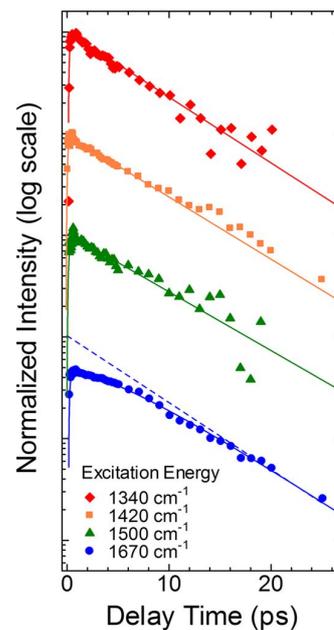


図 7 過渡吸収スペクトルにおけるピーク強度の時間変化

図 6 から分かるように、ピークエネルギーの時間変化として 2 成分 (0.2, 14 ps) 存在する。図 7 からは、1670  $\text{cm}^{-1}$  の中赤外光で励起した場合、他の励起光とは異なる振る舞いをする事が分かる。つまり、1670  $\text{cm}^{-1}$  で励起した場合、新たな立ち上がり成分 (4.2 ps の時定数) が含まれる。この立ち上がり成分は、

発色団への振動エネルギーの流入を示唆している。1670 $\text{cm}^{-1}$ というエネルギーから考察すると、タンパク質骨格C=O伸縮から発色団へのエネルギー移動と結論できる。以上、まとめると、図8のような結論を得ることができた。

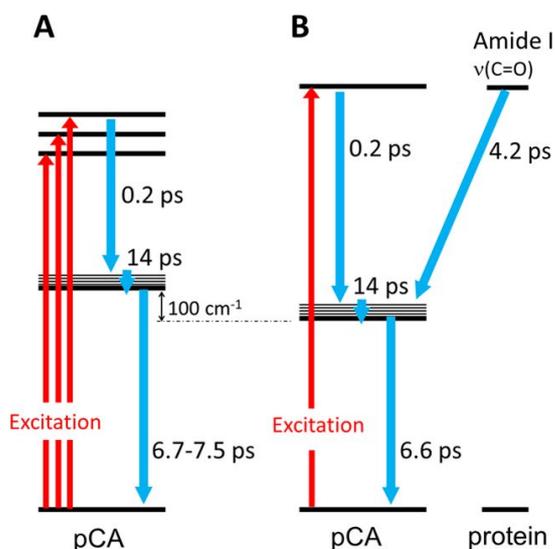


図8 実験から得られたエネルギー移動経路。(A)赤外励起光 1340, 1420, 1500  $\text{cm}^{-1}$ の場合。(B)赤外励起光 1670  $\text{cm}^{-1}$ の場合

#### (4) 反応途中における振動分光と反応制御

上記の中赤外励起 - 可視プローブ分光を、反応途中、あるいは反応中間体に対して行った。つまり、反応開始光(400nm) - 中赤外励起光 - 可視プローブ光、というマルチパルス分光である。照射した中赤外光の中心周波数は1100~1800  $\text{cm}^{-1}$ の範囲でチューニングし、タイミングは反応開始後0.2 ps ~ 1 nsの範囲で変化させた。このパラメータ空間は以下の反応過程をカバーする：電子励起に伴う水素結合ネットワークの変化、プロトン移動および構造異性化による初期反応中間体の生成、さらに続く第二反応中間体の生成。しかしながら、中赤外光照射による反応過程の変化(促進、抑制、分岐など)は本システムの測定精度( $< 10^{-4}$ )では有意の差としては現れなかった。

反応制御には至らなかったものの、本研究手法により、光受容タンパク質PYP初期状態における振動エネルギーフローを明らかにすることができた。つまり、発色団の振動モード間相互作用や、周辺アミノ酸残基から発色団への振動エネルギー移動など、タンパク質の高効率反応過程を理解する上で重要な素過程を明らかにすることができた。また、本手法は光受容タンパク質だけでなく、一般的なりガンド結合タンパク質へと応用可能であり、今後展開していく予定である。

#### 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5件)

R.Nakamura, N. Hamada, "Vibrational Energy Flow in Photoactive Yellow Protein Revealed by Infrared Pump-Visible Probe Spectroscopy", J. Phys. Chem. B, 査読有, 119, 2015, 5957-5961.

DOI: 10.1021/jp512994q

R.Nakamura, N. Hamada, "Vibrational Energy Flow in Photoactive Yellow Protein Revealed by Infrared Pump-Visible Probe Spectroscopy", Ultrafast Phenomena XIX, 査読無, 162, 2015, 524-527.

R.Nakamura, N. Hamada, K. Abe, M. Yoshizawa, "Structural Evolution in Photoactive Yellow Protein Studied by Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy", Ultrafast Phenomena XVIII, 査読無, 41, 2013, 07008(3 pages).

R.Nakamura, N. Hamada, K. Abe, M. Yoshizawa, "Ultrafast Hydrogen-Bonding Dynamics in the Electronic Excited State of Photoactive Yellow Protein Revealed by Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy", J. Phys. Chem B, 査読有, 116, 2012, 14768-14775.

DOI: 10.1021/jp308433a

M. Yoshizawa, R. Nakamura, O. Yoshimitsu, K. Abe, S. Sakai, K. Nakagawa, R. Fujii, M. Nango, H. Hashimoto, "Femtosecond stimulated Raman spectroscopy of the dark S1 excited state of carotenoid in photosynthetic light harvesting complex", Acta Biochim. Plo., 査読有, 59, 2012, 49-52.

[学会発表](計8件)

畑秀文, 中村亮介, 濱田格雄, 神村共住, "チャープパルスアップコンバージョンを用いた中赤外領域の時間分解分光", 第62回応用物理学会春季学術講演会, 2015年3月11-14日, 東海大学

N. Hamada, N. Inazumi, R. Nakamura, "Influence of steric limitations around chromophore in protein cage of photoactive yellow protein", 16th International Conference on Retinal Proteins, 2014年10月5-10日, 長浜  
中村亮介, 濱田格雄, "中赤外光励起によるタンパク質内包色素分子の振動ダイナミクスの研究", 日本物理学会2014年秋季大会, 2014年9月7-10日, 中部大学

R. Nakamura, N. Hamada, "Vibrational Dynamics in Photoactive Yellow Protein Revealed by Mid-IR Pump/Visible Probe Spectroscopy", 19th International Conference on Ultrafast Phenomena, 2014年7月7-11日, 沖縄

中村亮介, 濱田格雄, "光受容タンパク質の光誘起構造変化と水素結合ダイナミクス", 日本物理学会第69回年次大会, 2014年3月27-30日, 東海大学

R. Nakamura, N. Hamada, K. Abe, M. Yoshizawa, "Ultrafast hydrogen-bonding dynamics in the electronic excited state of photoactive yellow protein", The 16th International Conference on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy, 2013年5月19-24日, 別府

中村亮介, 濱田格雄, 阿部健太, 吉澤雅幸, "共鳴フェムト秒誘導ラマン分光による光受容蛋白PYPの励起状態構造ダイナミクスの研究", 第6回分子科学討論会, 2012年9月18-21日, 東京大学

R. Nakamura, N. Hamada, K. Abe, M. Yoshizawa, "Structural Evolution in Photoactive Yellow Protein Studied by Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy", 18th International Conference on Ultrafast Phenomena, 2012年7月8-13日, Lausanne, Switzerland

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 亮介 (NAKAMURA Ryosuke)  
大阪大学・産学連携本部・特任講師  
研究者番号：70379147

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：