

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25400436

研究課題名(和文) テラヘルツ帯振動円偏光二色性計測による蛋白質高次構造ダイナミクスの観測

研究課題名(英文) Observation of higher-order structure dynamics of proteins by using vibrational circular dichroism at THz frequency region

研究代表者

野竹 孝志 (Notake, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・研究員

研究者番号：70413995

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)：テラヘルツ周波数領域では、水素結合やファンデルワールス力等の比較的弱い相互作用に基づく低周波分子間振動スペクトルが豊富に観測される。本研究は、テラヘルツ帯における振動円偏光二色性分光計測手法を開拓し、生体高分子である蛋白質等のコンフォメーションの差異やダイナミクスを観測する事、更に、高強度THz光照射によりコンフォメーションを制御する可能性も探索することである。構造的複屈折を利用した円偏光制御素子を開発し、THz二色性計測を試みたが現状では十分なSN比が得られず、有意な信号は得られなかった。しかしながら高強度THz光照射によるタンパク質コンフォメーション変化を示唆する興味深い実験データを得た。

研究成果の概要(英文)：In terahertz spectrum region, many low frequency intermolecular vibrational modes based on weak interaction such as hydrogen bonding and Vander Waals force can be observed. The purpose of this research is to develop circular dichroism measurement system at THz region and then, to observe conformational dynamics of proteins. Besides, to seek possibility of conformation control of proteins by using intense coherent THz wave. We successfully developed THz circular dichroism system with form birefringence waveplate. Signal of circular dichroism measurement at THz frequency region were not obtained with sufficient SN ratio in the experiment, however, spectrum difference in UV circular dichroism and fluorescence measurements which imply conformational transition due to intense THz radiation can be observed.

研究分野：非線形光学

キーワード：テラヘルツ タンパク質 生物物理

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 狂牛病等の様々な神経性難病は、体内の蛋白質の高次立体構造 (コンフォメーション) が異常な状態へと変化し、それらが蓄積されていく事で引き起こされる。しかしながら、これらの変化を引き起こす要因は良く理解されていない。そこで、蛋白質のコンフォメーション変化を直接観測する手法を確立出来れば、これら難病の原因究明や新薬開発に大きく貢献出来るだけでなく、コンフォメーションとその生体機能に関する研究が大きく進展する事が期待できる。

蛋白質は、基本構成要素である 20 種類のアミノ酸が鎖状に多数連結してできる高分子化合物である。アミノ酸の平面的な配列順序を一次構造といい、一次構造形成後に、アミノ酸残基が水素結合などを介して二次構造を形成する。更に、これら二次構造群が巧妙に折りたたまれ、単純蛋白質の固有立体構造となる三次構造を形成する。特に、二次構造と三次構造は関係が強く、これらは総称してコンフォメーションと呼ばれる。哺乳類だけでも蛋白質の種類は 10 万を超えているが、各蛋白質が発揮する機能は、一次構造では無く、高次構造であるコンフォメーションで決まる。一次構造を媒介するペプチド結合は強固な共有結合であるが、コンフォメーション形成に寄与するのは、水素結合やファンデルワールス力等の比較的弱い相互作用である為、様々な擾乱によりコンフォメーションは変化しやすい。蛋白質は適切な生体機能を発揮する為に、室温程度の熱揺らぎの下で適切にコンフォメーションを制御・維持している。この際何らかの要因により、コンフォメーションが異常な状態へ変化すると蛋白質の機能も異常をきたし、この事が様々な神経性難病を引き起こす要因になっていると考えられる

2. 研究の目的

蛋白質のコンフォメーションはキラリティを有しており、電磁波の左・右円偏光に対して異なる吸収を示す。従って、コンフォメーションに極めて敏感な円偏光二色性 (CD) 分光計測を適用する事で、コンフォメーションの差異やそのダイナミクスを計測出来る。蛋白質が細胞内で合成される過程において、どのような高次コンフォメーションを形成していくかは、系のエネルギーが最も安定となるように決まると考えられるが、蛋白質は明らかに多自由度・多成分系である。従ってそのダイナミクスは、室温においては非調和的なポテンシャルに支配されており、エネルギー的にほぼ等価な多数のエネルギー極小状態間を、室温程度の熱揺らぎにより遷移すると考えられる。このように、蛋白質の高次コンフォメーションのダイナミクスは室温程度の熱エネルギー揺らぎに支配され、室温の熱エネルギーレベルは周波数に換算す

るとテラヘルツ帯である。また、蛋白質等の高分子においては、水素結合や静電相互作用などに基づく高次構造の低周波振動もテラヘルツ周波数帯に極めて豊富に存在する事が知られている。従って、蛋白質のコンフォメーション変化やダイナミクスを観測する上で、テラヘルツ周波数帯の CD 分光計測 (THz-CD) を行う事は極めて本質的で重要である。本研究の目的は、THz 周波数帯における偏光制御素子を開発し、タンパク質等の生体高分子に対して円偏光二色性計測を行い、更には高強度テラヘルツ光によるコンフォメーション制御の可能性を検証することである。

3. 研究の方法

本研究においてはまず、信頼性の高い THz-CD 分光計測システムを開発する事に注力する。その為に優れた THz 光源の開発と THz 帯における偏光制御素子の開発が必要となるが、光源に関しては、ピコ秒励起光注入型のテラヘルツパラメトリック発生光源を、また、偏光制御素子に関しては構造性複屈折を利用した波長板の開発に取り組む。これらを組み合わせて THz-CD 分光計測システムを構築後に、まずは明白なキラリティを有する事が分かっているアミノ酸を試料として THz-CD 計測を行い、システムの健全性を確認する。その後、いくつかの蛋白質に対して THz-CD 分光を適用し、コンフォメーション変化に対応する有意な THz-CD スペクトル変化を検出する事を目標とする。

また、水素結合などの弱い相互作用を介して振動している蛋白質の高次コンフォメーションや、その熱エネルギー揺らぎに共振するような高強度 THz 光を照射する事で、コンフォメーションを能動的に制御できる可能性がある。これにより、異常なコンフォメーションに変性してしまった蛋白質を、正常な状態へと修復させる事も可能となるかもしれない。本研究では、高強度テラヘルツ光とタンパク質分子間振動モードとの相互作用を通して、タンパク質のコンフォメーション制御の可能性についても検討を行う。コンフォメーションの違いを様々な検出法 (円二色性や蛍光変化) で検出することで、高強度コヒーレントテラヘルツ光によるコンフォメーション制御の可能性を探る。

4. 研究成果

本研究においてはまず、信頼性の高い THz-VCD 分光計測システムを構築することが重要である。その為に優れた THz 光源の開発と THz 帯における偏光制御素子の開発が必要となるが、初年度はまず、構造性複屈折を利用した偏光制御素子の開発に取り組んだ。従来の光領域や低周波 THz 領域では、偏光制御の為に波長板として主に自然複屈折を有する石英が用いられてきたが、3 THz

以上では透過率が極めて低くなり、適用が困難である。我々は、THz帯で透過率の高い高抵抗シリコンを材料に用いて、構造的複屈折を利用した波長板の開発を行った。有効媒質近似の下では、サブ波長スケールの周期構造は、周期を持つ方向と持たない方向に対する偏光に対して異なる実効屈折率を付与し、人工的な複屈折性を発現する。この人工複屈折は、格子形状を最適化する事により周波数分散を制御可能であり、波長板としてアクロマティックな動作も原理的に可能となる。数値計算により様々な格子形状と複屈折の周波数分散を精査し、実際にシリコン基板上に、ピッチ・深さともにマイクロオーダーの異なる格子形状を有する複数の素子を、光リソグラフィにより製作した。そのSEM画像を図1に示す。良好なグレーティングが製作できている事が確認できる。

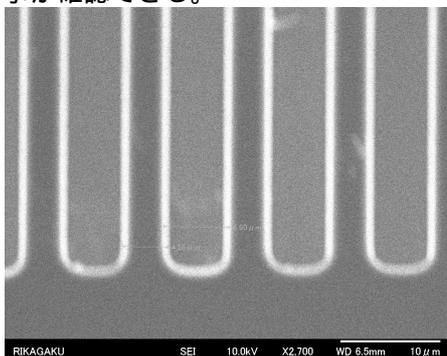


図1. グレーティングのSEM画像

次にDAST差周波光源を用いて、製作した人工複屈折波長板の動作特性を調べた。検出器前段に偏光子を設置し、入射直線THz偏光に対して波長板格子軸方向を回転させながら透過光強度を計測した結果から位相遅延を評価したところ、図2に示すように計算通りの動作を確認した。

これにより、テラヘルツ周波数帯で円偏光を作成することが可能となった。

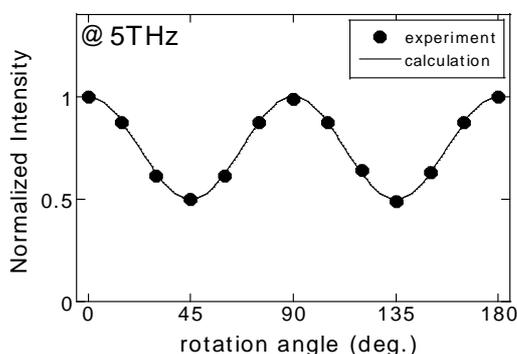


図2. 5THzにおけるλ/4板の試験結果

その後、実際に血清中の輸送タンパク質であるアルブミンを用いて、その二次構造の変化を検出する手法を確立することに注力した。従来から二次構造の診断に広く利用されている円偏光二色計測と、蛍光分光光度計を用いた検証を試みた。

アルブミン試料は凍結乾燥された試料を用いた。アルブミン試料と蒸留水によりそれぞれに最適な濃度の水溶液を作成し計測を行った。アルブミンの二次構造はアルファヘリックスが支配的であることが知られており、円偏光二色性計測においては図3に示すようにアルファヘリックスに特徴的なスペクトルが観測されたが、高強度テラヘルツ光を照射した試料に対しては円偏光二色性の信号強度が減衰したデータが得られた。これは高強度テラヘルツ光によりアルファヘリックス構造が破壊された、あるいはランダムコイルなどの他の二次構造へ変化した可能性を示唆するものである。今後テラヘルツ周波数帯の振動遷移に基づく二色性計測を実現することで、より詳細な解析が可能となる事が期待できる。また、蛍光分光測定に関しても、図4に示すように高強度テラヘルツ光を照射した試料に関してはいわゆる蛍光のクエンチングが観測された。アルブミンの蛍光は構成アミノ酸の一つであるトリプトファンに起因すると考えられるが、トリプトファンを取り巻く周囲環境が変化し、蛍光特性が変化した可能性がある。これも二次構造の変化を示唆するものである。

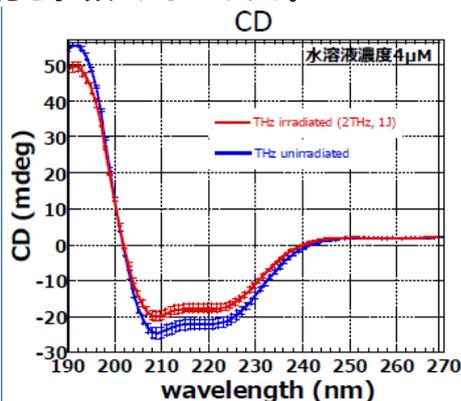


図3. 円偏光二色性の結果

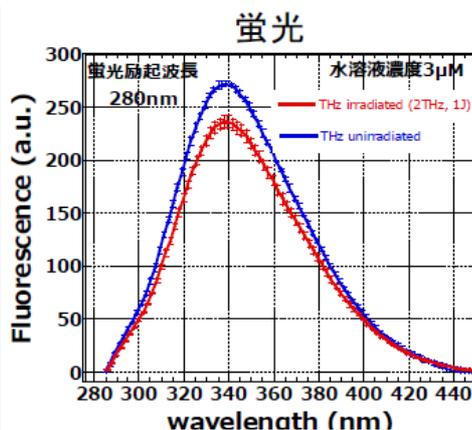


図4. 蛍光スペクトルの変化

実際にテラヘルツ周波数帯において、タンパク質の振動円偏光二色性計測にも取り組んだ。開発した偏光制御素子を用いて、光注入型テラヘルツパラメトリック発生器から

の直線偏光を、高精度で左右両円偏光へと変換し、ペレット化したアルブミン蛋白試料に照射して左右両円偏光に対する透過率の差異を計測した。しかしながら、エラーバーの範囲内で有意な差は観測できなかった。一般にテラヘルツ周波数帯における振動円偏光二色性の信号強度は、電子遷移に基づく紫外や可視領域の電子円二色性強度に比べて 1/1000 程度となる事が理論的にも予想されており、世界的にも前例のない極めてチャレンジングな計測である。今後は、テラヘルツ帯の左右両円偏光を作成するだけでなく、これらを高速で変調する技術の開発が必要であり、ロックイン検出などと組み合わせた計測に取り組む。

更に我々は、タンパク質コンフォメーション制御の理論的な可能性検討も行った。タンパク質分子 1mol の室温における熱エネルギー揺らぎは、例えばタンパク質分子 1 個の質量を 5×10^{-20} g、定圧比熱を $1.3 \text{ JK}^{-1}\text{g}^{-1}$ と仮定すると約 160 kJ/mol 程度となる。当然熱揺らぎは等方的かつ非選択的であるため、平均的なタンパク質系の振動等の内部自由度を 100000 程度と考えると、これらに 160 kJ/mol を割り振れば 1 自由度あたり 1.6 J/mol の熱揺らぎである。更に現実的な条件として 1 mg のアルブミンタンパク (分子量 66,000) を考えると、1 自由度あたり 24 nJ の熱揺らぎとなる。一方で我々の開発したテラヘルツ光源は最大 $10 \mu\text{J}$ のパルスエネルギーを有し、かつコヒーレントで周波数可変である為、選択的な振動モード励振が可能である。従って高強度テラヘルツ光照射により、熱揺らぎを超えてコンフォメーション制御できる可能性を理論的にも明らかにした。

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 2 件)

1. T. Notake, B. Zhang, Y. Gong and H. Minamide, "Development of a Stokes Polarimeter System for High Terahertz Frequency Region" Japanese Journal of Applied Physics 53, 092601 (2014). 査読有り
<http://iopscience.iop.org/article/10.7567/JJA.P53.092601/pdf>
2. Takashi Notake, Rihei Endo, Kaori Fukunaga, Iwao Hosako, Chiko Otani, and Hiroaki Minamide, "State-of-the-art Database of Terahertz Spectroscopy based on Modern Web Technology" IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology, vol.4, No.1 pp110-115 (2014). 査読有り
DOI: 10.1109/TTHZ.2013.2284862

[学会発表](計 6 件)

1. 野竹孝志、縄田耕二、瀧田佑馬、時実悠、韓正利、小山美緒、南出泰亜 "高強度コヒーレントテラヘルツ光によるタンパク質コンフォメーション制御への挑戦" 電子情報通信学会テラヘルツ応用システム研究会 2016 年 2 月 5 日理化学研究所 (埼玉県・和光市)
2. NOTAKE Takashi, NAWATA Kouji; TAKIDA Yuma; TOKIZANE Yu; HAN Zhengli; MINAMIDE Hiroaki, "Attempt to conformation control of biological proteins by using intense coherent THz-wave," Aug. 30, Hamamatsu, Japan, FTT2015
3. T. Notake, K. Nawata, Y. Takida, Y. Tokizane, Z. Han, and H. Minamide, "Study on Effect of Intense THz-Wave Irradiation for Protein Conformation" The 4th Advanced Lasers and Photon Sources, April 22, Yokohama, Kanagawa (2015)
4. T. Notake, B. Zhang, H. Dong, Z. Chen, Y. Gong, and H. Minamide, "Development of a Stokes polarimeter by using silicon wave plate based on form birefringence", CLEO 2014, San Jose, USA, June 8, (2014)
5. 野竹孝志、縄田耕二、Feng Qi, Fan Shuzhen, 瀧田佑馬、南出泰亜 「テラヘルツ帯広帯域分光ストークス偏光計測システムの開発と応用」第 61 回応用物理学会春季学術講演会 2014 年 3 月 17 日、青山学院大 (神奈川県・厚木市)
6. 野竹孝志、Zhang Banghong, Gong Yandong, 南出泰亜 「サブ波長格子構造によるテラヘルツ光の偏光制御と偏光計測」電子情報通信学会テラヘルツ応用システム研究会 2013 年 8 月 6 日、北海道大学 (札幌市・北海道)

[図書](計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野竹 孝志 (NOTAKE Takashi)
理化学研究所・光量子工学研究領域・研究員
研究者番号：7 0 4 1 3 9 9 5

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：