

研究課題別評価書

1. 研究課題名

ラマン円偏光二色性分光による生体分子の動的構造解析

2. 氏名

海野 雅司

3. 研究のねらい

タンパク質の機能を分子構造レベルで明らかにするためにはその立体構造を知ることが必須であり、X線結晶構造解析やNMRなどが有力な研究手段となる。一方、結晶構造解析などでは判別出来ない微細な構造の違いや短寿命化学種の構造などを解析するため、さまざまな分光学的手法も併用していく必要がある。なかでもラマン散乱などの振動分光は分子の構造や周辺環境の違いに鋭敏で、例えば図1に示した4-ビニルフェノラートの場合、振動スペクトルから水素結合のない構造Aと水素結合を形成した構造Bを容易に区別することができる。しかしタンパク質の機能を解明するためにはしばしば水素結合の向きの違い(構造BとCの違い)など更に高次の構造情報が鍵を握るが、従来の手法では区別ができなかった。そこで我々は従来の限界を超えるブレークスルーとしてラマン円偏光二色性分光(Raman Optical Activity, ROA)に注目した。

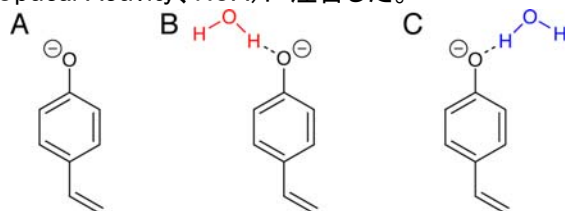


図1. 4-ビニルフェノラートの構造。BとCでは水分子と水素結合を形成しているが、その向きが異なる。

ラマン円偏光二色性分光は右回りと左回りに円偏光した励起光により測定したラマン散乱光の強度差が鏡像異性体では異なる点を用いた分光法である。ラマン円偏光二色性スペクトルの信号強度はただでさえ微弱なラマン散乱光より数桁(10^{-3} ~ 10^{-4} 以下)も小さいためその測定は容易ではない。しかし、タンパク質をはじめとした生体分子の多くは光学活性であり、格好の応用例である。実際、最近の技術的な進展によってタンパク質などの生体分子への応用例が報告されるようになってきた。しかし、本手法の生体分子への応用は未だ限定的なものとなっている。その理由の一つは蛍光を発する試料には適用できない点である。これはラマン分光全般に当てはまる問題であるが、試料自身または試料に含まれる微量の夾雑物が励起レーザー光を吸収してそのエネルギーを蛍光として放出すると微弱なラマンスペクトルを覆い隠してしまい測定が不可能となる。またラマン円偏光二色性分光に特有の問題として、励起光の波長と試料の電子吸収帯の波長が一致したいわゆる“共鳴ラマン分光”の条件下では有益な構造情報を与えるラマン円偏光二色性スペクトルを測定できないという問題がある。このため従来の可視光を励起光としたラマン円偏光二色性分光では可視域に吸収のある試料には適用できず、例えばヘムタンパク質や光受容タンパク質などのような活性中心として色素分子を含んだタンパク質などへの応用はなかった。

そこで、我々は上記の蛍光と光吸収の問題を克服してさまざまな生体分子への応用を実現するため、近赤外励起のラマン円偏光二色性分光装置を開発することにした。本研究で開発した計測技術をさらに発展させ、短寿命化学種や生体組織・ナノ材料などへの応用への道を切り拓くことが本研究の究極の目標である。

4. 研究成果

A. 可視光励起ラマン円偏光二色性分光装置の開発

さまざまな生体分子に応用可能な近赤外励起のラマン円偏光二色性分光装置の開発が本研究の目的であるが、ラマン円偏光二色性スペクトルの信号強度は励起光の波長の4乗に

反比例するため、可視光励起に比べて近赤外光励起の測定はより難しいものとなる。そこで、我々はまず可視光(532 nm)を励起光源とするラマン円偏光二色性分光装置を開発してノウハウを蓄積したあとに近赤外励起(785 nm)の装置を開発することにした。

本研究で開発した入射円偏光型の可視光励起ラマン円偏光二色性分光装置では、光源には発振波長 532 nmの半導体励起固体(DPSS)レーザーを用い、 $\lambda/4$ 波長板または液晶可変位相差板を用いて直線偏光を円偏光に変換した。ラマン散乱光は後方散乱方式で観測し、エッジフィルターでレーリー散乱光を除去したあとバンドルファイバーを用いて分光器に導入し、電子冷却型CCD検出器で測定した。ラマン円偏光二色性スペクトルはその信号強度が非常に小さいことから偽信号(アーチファクト)の影響を受けやすい。そこで偽信号を除去するため、 $\lambda/2$ 波長板を用いたスペクトルの補正機構を導入した。実験は右回りまたは左回りに円偏光した励起光で測定したラマンスペクトル I^R と I^L を交互に測定し、これらの和($I^R + I^L$)がラマンスペクトル、差($I^R - I^L$)がラマン円偏光二色性スペクトルとなる。CCD検出器や液晶可変位相差板などの機器類は自作の測定プログラムから制御できるようにし、全自動で一連の測定ができるようにした。

生体関連試料の測定に先立ち、性能評価のために測定した(-)- α -ピネンと(+)- α -ピネンのラマンおよびラマン円偏光二色性スペクトルを図 2 に示した。ラマン円偏光二色性スペクトルの信号強度はラマンスペクトルの約 1000 分の 1 程度と小さいが、既報と一致する結果が得られた。また二つの鏡像異性体ではスペクトルの符号が反転して区別できることが確認できた。

次に生体関連試料としてアミノ酸(L-アラニン)とタンパク質(リゾチーム)についてラマン円偏光二色性スペクトルを測定した。図 3 左に示したようにL-アラニンについてもラマン円偏光二色性スペクトルを測定することができた。しかし、ピネンのような有機化合物に比べると水溶液試料であるL-アラニンでは信号強度が小さい上にスペクトルのバックグラウンドが大きいため、測定には長時間の積算が必要であった。図 3 右に示したようにリゾチームについても既報のラマン円偏光二色性スペクトルと一致する結果が得られることを確認できた。

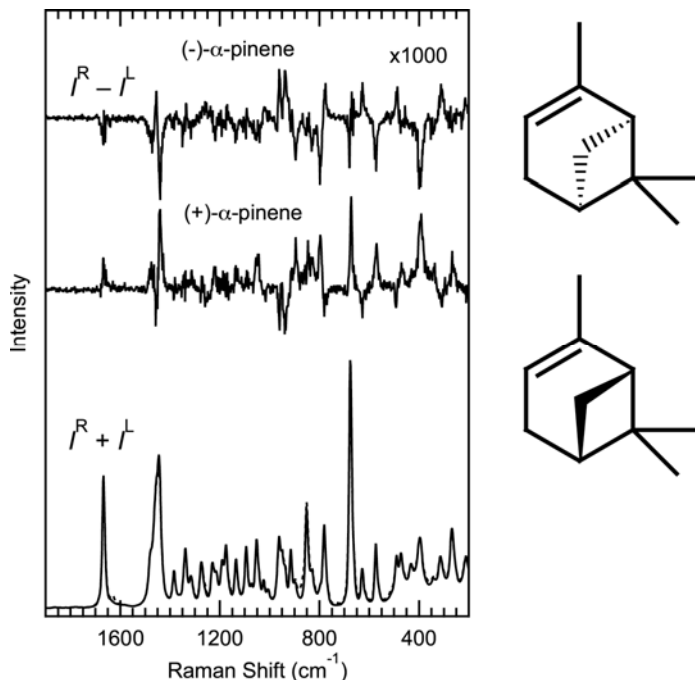


図 2. (-)- α -ピネンおよび(+)- α -ピネンのラマンスペクトルとラマン円偏光二色性スペクトル。励起波長 532 nm。

B. 近赤外光励起ラマン円偏光二色性分光装置の開発

上記のように可視光励起の装置を開発し、信号-雑音比(SN比)の点などで更なる改良が必要なものの、ラマン円偏光二色性スペクトルを測定できることを確認した。そこで本研究の目的であるさまざまな生体分子に応用可能な近赤外励起のラマン円偏光二色性分光装置の開発を行った。近赤外用装置の基本設計は可視光用装置と同じであるが、光源には半導体レーザー(発振波長 785 nm)を用い、分光器をはじめとした各種光学部品類に近赤外光用に最適化されたものを用いた。その結果、785 nm 励起においても可視光用装置と比べても遜色のないスペクトルを得られるようになった。

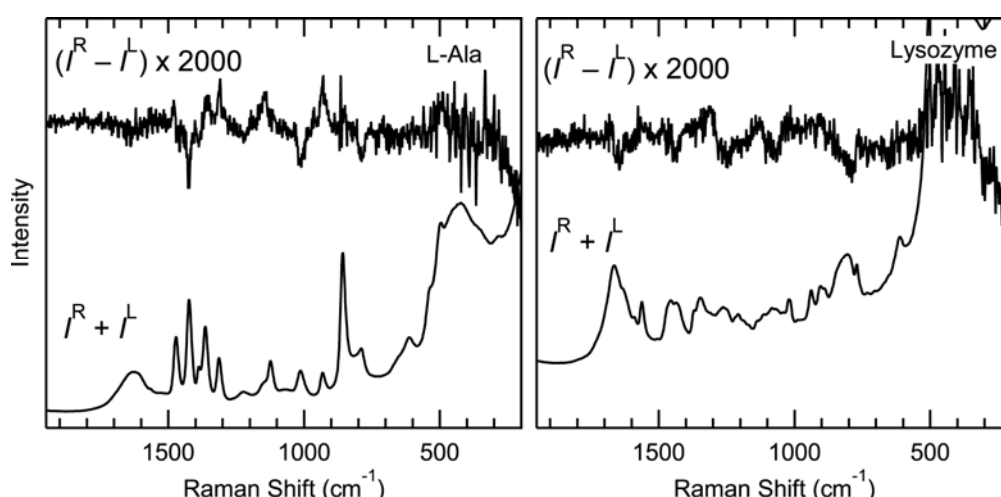


図 3. L-アラニン(左)とリゾチム(右)のラマンスペクトルとラマン円偏光二色性スペクトル。励起波長 532 nm。

開発した近赤外用装置を用いて測定した(-)- α -ピネンと(+)- α -ピネンのラマンおよびラマン円偏光二色性スペクトルを図4に示した。まずラマンスペクトルを図2の励起波長 532 nmでの測定結果と比べると 785 nm 励起においても同様のスペクトルが観測されていることがわかる。しかし、785 nm 励起のスペクトルでは高波数側のバンド強度が相対的に低くなった。可視光用装置と同じく近赤外用装置においても検出器として CCD を用いたが、CCD の検出感度は長波長側になるに従って減少するため、高波数側のバンド強度が小さくなっていると考えられる。

つぎに図2と4のラマン円偏光二色性スペクトルを比較すると、ラマンスペクトルと同様に 532 nm 励起に比べると 785 nm 励起で観測したスペクトルは高波数側のバンド強度が小さくなっている以外は類似の結果が得られた。しかしラマンスペクトルに対するラマン円偏光二色性スペクトルの強度比 $(I^R - I^L)/(I^R + I^L)$ は約半分になっており、可視光励起に比べるとより難しい測定であることが確認された。また可視励起ラマン円偏光二色性分光装置と同様に、近赤外用装置についても L-アラニンとリゾチムへの応用を試み、ラマン円偏光二色性スペクトルを測定できることを確認した。

以上のように、本研究において近赤外ラマン円偏光二色性分光装置の開発を行うことができた。そこで、開発した装置を用いて近赤外励起用装置でしか測定できない可視部に吸収をもつタンパク質試料としてバクテリオロドプシンとハロロドプシンについて測定を行い、ラマン円偏光二色性スペクトルの測定に世界で初めて成功した。

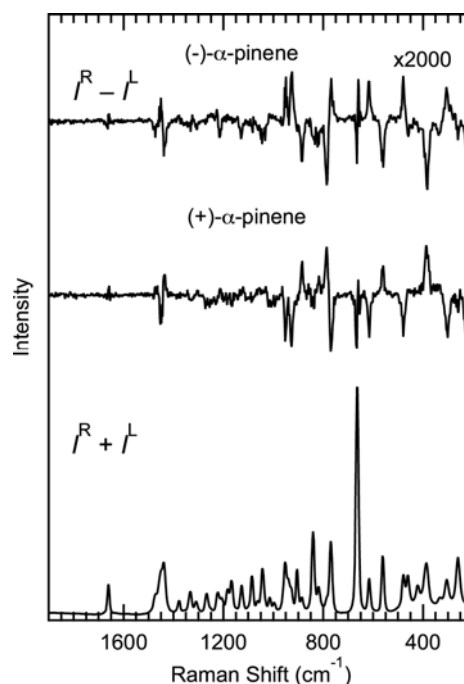


図 4. (-)- α -ピネンおよび(+)- α -ピネンのラマンスペクトルとラマン円偏光二色性スペクトル。励起波長 785 nm。

5. 自己評価

本さがけ研究では(1)可視光励起のラマン円偏光二色性分光装置と(2)近赤外光励起のラマン円偏光二色性分光装置を開発することができた。本研究の主目的である近赤外光励起ラマン円偏光二色性に関しては、従来の可視光励起の装置では測定できなかった色素タンパク質の代表例として、バクテリオロドプシンとハロロドプシンへの応用に世界で初めて成功した。しかし得られたラマン円偏光二色性スペクトルの解釈を含め、データの解析法の開発に関してはほとんど手つかずの状態である。また従来では測定できなかった生体関連試料への応用も少ない。今後は装置性能の更なる向上を図ると同時に、さまざまな生体関連試料に応用し、本手法の有用性を実証していく必要がある

6. 研究総括の見解

ラマン円偏光二色性分光装置の作製をともかく仕上げたことは評価出来る。量子化学計算でシミュレーションした分子を実際に測定してどのような情報が得られるかを示して欲しかった。バクテリオロドプシンに応用し、暗状態と明状態でのスペクトルの違いを微弱な信号ながら観測したが、その解釈がないのは残念だ。今後感度向上に向けて特段の工夫を行い多成分系の測定まで発展させれば新しい分野を開拓することになる。

7. 研究成果リスト

A. ささがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Unno, M., Kumauchi, M., Tokunaga, F., & Yamauchi, S. Vibrational Assignment of the 4-Hydroxycinnamyl Chromophore in Photoactive Yellow Protein. *J. Phys. Chem. B.* 111, 2719-2726 (2007).

・Kikuchi, S. Unno, M., Zikihara, K., Tokutomi, S., & Yamauchi, S. Vibrational Assignment of the Flavin-Cysteiny Adduct in a Signaling State of the LOV Domain in FKF1. *J. Phys. Chem. B.* 113, 2913-2921 (2009).

・Unno, M., Kikuchi, S. & Masuda, S. Structural Refinement of a Key Tryptophan Residue in the BLUF Photoreceptor AppA by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy. *Biophys. J.* in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)学会発表

学会発表(国際)

・Unno, M., Masuda, S., Ono, T., & Yamauchi, S. Light-induced structural changes in the BLUF domain of AppA Revealed by Raman Spectroscopy. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11. Naha, Japan

・Unno, M., Kikuchi, S., Zikihara, K., Tokutomi, S., & Yamauchi, S. Raman Spectra and Vibrational Assignment for a Signaling State of FKF1 LOV Domain. In Proceedings of the XX1st International Conference on Raman Spectroscopy. Withnall, R., and Chowdhry, B. Z., Eds. 817-818, IM Publications (2008).

学会発表(国内)

・菊池 定人、海野 雅司、直原 一徳、徳富 哲、山内 清語. シロイズナズナ FKF1-LOV ドメインにおけるフラビンのラマンスペクトルと基準振動解析. 第 34 回生体分子科学討論会. 2007.6. 仙台

・菊池 定人、海野 雅司、直原 一徳、徳富 哲、山内 清語. LOV ドメインにおけるフラビンのラマンおよび IR スペクトルとその振動解析. 日本生物物理学会第 45 回年会. 2007.12. 横浜

・立石 裕介、中尾 雄高、加茂 直樹、海野 雅司. ファラオニスフォボロドプシン光反応中間体の共鳴ラマン分光法による解析. 第 36 回生体分子科学討論会. 2009.6. 札幌

・海野 雅司、立石 裕介、中尾 雄高、田母神 淳、加茂 直樹. 共鳴ラマン分光法によるファラオニスフォボロドプシン N 中間体の検出. 日本生物物理学会第 47 回年会. 2009.10. 徳島

・新ヶ江 貴人、海野 雅司. 近赤外励起ラマン円偏光二色性分光装置の開発. 日本化学会第 90 季年会. 2010.3. 大阪

(4)招待講演

招待講演(国際)

・Unno, M. Structural Changes during the Photocycle of Photoactive Yellow Protein Monitored by Ultraviolet Resonance Raman Spectra of Tyrosine and Tryptophan. Japan-China Crossover Science Symposium (JCCSS) 2006.10., Mito, Japan

・Unno, M. Flavin-Containing Blue-Light Receptor BLUF Protein Studied by Mutagenesis, Spectroscopy, and Quantum Chemical Calculations. 3rd International Forum: IFSC 2006 Winter. New Waves in Supramolecular Chemistry and Superstructured Materials, Kumamoto, Japan 2006.12., Kumamoto, Japan

・Unno, M. Flavin-Containing Blue Light Photoreceptor Proteins Studied by Raman Spectroscopy. International Symposium on the Biological Application of Vibrational Spectroscopy, 2007.3. Hyogo, Japan

招待講演(国内)

・海野 雅司、振動分光と第一原理計算からタンパク質の動的構造を明らかにする. (社)新化学発展協会、ライフサイエンス技術部会講演会. 2007.6. 東京

・海野 雅司、ラマン円偏光二色性分光によるタンパク質の高次構造解析法の開発. 日本生物物理学会北海道支部会講演会. 2007.9. 札幌

・海野 雅司、分光学の立場から見た蛋白質合成法への期待-振動分光による光センサータンパク質の研究. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質合成法の最近の進歩と生命科学」2008.9. 吹田

・海野 雅司、ラマン分光法で迫るフラビタンパク質の光反応機構の解明. 日本生物物理学会第 47 回年会 シンポジウム「フラビン型青色光受容体の多様な光反応と機能」. 2009.10. 徳島

・海野 雅司、フラビンを発色団としてもつ光受容タンパク質の光反応機構の解明-ラマン分光法によるアプローチ. 平成 21 年度 物理化学インターカレッジセミナー. 2009.12. 福岡

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

• Nishihara, H., Yang, Q.-H., Hou, P.-X., Unno, M., Yamauchi, S., Saito, R., Paredes, J. I., Martinez-Alonso, A., Tascon, J. M. D., Sato, Y., Terauchi, M., & Kyotani, T. A Possible Buckybowl-Like Structure of Zeolite Templated Carbon. *Carbon* 47, 1220–1230 (2009).