

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21740313

研究課題名（和文） タンパク質周辺における水分子のピコ秒ゆらぎの観測

研究課題名（英文） Study of picosecond-timescale fluctuation of water molecules around proteins

研究代表者

山口 真理子 (YAMAGUCHI MARIKO)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：50521738

研究成果の概要（和文）：水はタンパク質の構造を安定化するだけでなく機能発現にも重要な役割を果たしている。そのためタンパク質の機能発現機構を解明するためには水のゆらぎを理解することが重要である。本研究では、テラヘルツ時間領域分光法を用いてタンパク質周辺の水のゆらぎを調べた。その結果、タンパク質分子に強く結合した少量の水分子は、タンパク質の一部とみなせるような運動をしていることが分かった。水素結合ネットワークを形成するような水和量で、水分子としてのゆらぎが顕著になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Water is important for proteins because it stabilizes protein structure and also makes proteins active. Water fluctuation needs to be clarified in order to understand the mechanisms of protein function. In this work water fluctuation around proteins has been studied by using terahertz time-domain spectroscopy. Water molecules tightly bound to proteins do not change protein modes so much but move together with proteins. Water molecules need to form hydrogen network to attain large fluctuation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学、生物物理・化学物理

キーワード：テラヘルツ、タンパク質、水和

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は水中に存在し、機能を発現する。水和はタンパク質の構造を安定化するのみならず、機能発現に必要な構造変化にも重要な役割を果たしていると考えられている。水分子のゆらぎがタンパク質全体のゆらぎを助長し、構造変化を促進すると推測されている。そのため、タンパク質が構造変化し活

性を示すメカニズムを明らかにするためには、タンパク質のゆらぎだけでなく水分子のゆらぎも併せて理解する必要がある。タンパク質周辺の水のゆらぎを測定する手段として誘電分光がある。誘電分光で観測する時間領域では、水分子とタンパク質分子の運動が比較的分離されており、誘電スペクトルから、タンパク質由来のモードと水分子由来のモ

一ドのアサインが試みられてきた。その結果、タンパク質周辺には大きく分けて二種類の水分子が存在し、強く結合した水は数十メガヘルツ(10^6 Hz)の時間領域にモードを持ち、緩く結合した水はギガヘルツ(10^9 Hz)の時間領域にモードを持つことが明らかにされた。ゆらぎの観点から二種類の水が存在することが明らかになったが、それらの水がタンパク質にどのように結合しており、タンパク質とどのような相互作用をしながら運動しているのかは明らかではない。タンパク質との相互作用を調べるためには、双方の運動が共存するテラヘルツ(10^{12} Hz)の時間領域で測定する必要がある。

テラヘルツ領域のタンパク質と水のゆらぎは、非弾性中性子散乱で詳細に調べられてきた。中性子散乱では水和量を制御したタンパク質粉末の測定から、タンパク質のゆらぎを大きく変化させる水分子数には閾値があることが明らかになった。閾値の前後で、水分子のゆらぎがタンパク質のゆらぎをどう変化するかを明らかにするためには、水分子自体のゆらぎを調べる必要がある。水分子由来の中性子散乱を抽出した報告はあるが、水分子のゆらぎをスペクトルから詳細に議論した報告はなかった。そのため、タンパク質と相互作用している水分子のテラヘルツスペクトルの情報が望まれていた。

近年急速に発達しているテラヘルツ時間領域分光法は、 $3\sim 150\text{ cm}^{-1}$ のスペクトルを高感度で測定できる数少ない分光法である。近年Havenithらによって特に 90 cm^{-1} 付近の水和水に関する研究が行われ、タンパク質周辺で水分子の双極子がそろっていることが報告された。これはタンパク質によって影響される水分子のゆらぎを明らかにしたうえで興味深い。タンパク質のゆらぎとの相互作用には踏み込んでいなかった。さらに、タンパク質の非調和的なモードは、ボゾンピークがある 30 cm^{-1} よりも低周波数側の領域に存在することから、 30 cm^{-1} 以下の水のゆらぎを観測する必要があると考え、本研究を遂行することを着想した。

2. 研究の目的

タンパク質の構造変化には、タンパク質と水分子との相互作用が大きく影響している。そのため、タンパク質の構造変化が起きるメカニズムを明らかにするためには、まずタンパク質と水がどのように相互作用してゆらいでいるのかを調べる必要があった。タンパク質と相互作用する水分子のモードは、誘電分光によって測定されているが、タンパク質と水分子の相互作用を明らかにするためには、タンパク質と水分子のゆらぎが共存するテラヘルツ領域における水分子のゆらぎを解明する必要があった。さらに、タンパク質

と相互作用する水が自由水とどのように異なるのかを解明するためには、水分子のスペクトルを詳細に調べることが必要であった。本研究では、これらの目的を達成するために、テラヘルツ領域の水分子のスペクトルを高S/Nで測定できるテラヘルツ時間領域分光法を用い、タンパク質周辺の水分子のスペクトルを抽出することを目的とした。

そのために、テラヘルツ時間領域分光装置の構築を目指した。また、これまで測定してきたリゾチーム粉末のテラヘルツスペクトルをさらに詳細に解析し、粉末状態においてタンパク質に結合した水分子が持つスペクトルを抽出することを試みた。

3. 研究の方法

本研究では、水分子のピコ秒ゆらぎを観測するために、テラヘルツ時間領域分光法を用いた。そのために図1に示すような分光測定装置の構築を行った。本章では、測定装置の概要について述べ、次章で構築した光学系において特筆すべき点を挙げる。

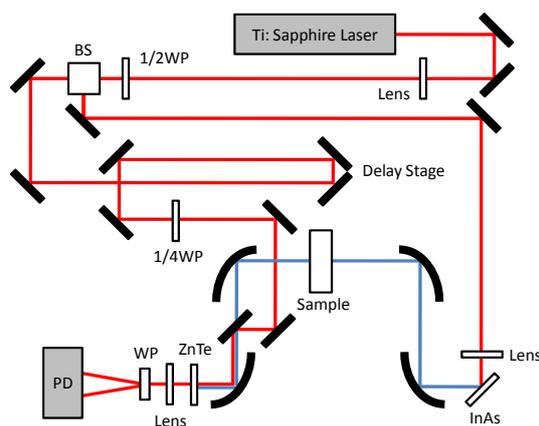


図1. 測定システムの模式図

本研究では、フェムト秒パルスレーザーを用いてテラヘルツ電磁波の発生と検出を行う方法を採用した。その模式図を図1に示す。フェムト秒パルスレーザーはCoherent社製Miraを用い、キャビティダンパーによって繰返周波数を 100 kHz 以下まで落として用いることにした。テラヘルツ電磁波はInAs (111)の表面に波長 800 nm のフェムト秒パルスを照射することで発生させ、4つの金コート放物面鏡を経由させたのち、ZnTe (110)で検出した。シリコンビームスプリッターを用いてプローブ光をテラヘルツ電磁波と同軸にし、ZnTeに入射させた。テラヘルツ電磁波によってZnTeに複屈折が生じ、プローブ光の偏光の楕円率が変化するため、その楕円率の変化からTHz電磁波の電場強度を測定した。プローブ光の楕円率を求めるために、ZnTe直後のウォラストンプリズムでプローブ光を2つの偏

光成分に分け、2つのフォトディテクタで差分検出を行った。キャビティダンパーからのトリガー信号を用いてフォトディテクタからの差分信号をロックイン検出した。プローブ光には光学遅延を設け、ポンプ光に対しプローブ光を遅延させながら測定を行い、THz電磁波の時間波形を取得した。時間波形を取得するためのプログラムはVisual Basic2008 Express Editionを用いて作成した。

4. 研究成果

テラヘルツ時間領域分光装置の構築を行うとともに、これまで測定してきたタンパク質のテラヘルツスペクトルから水分子由来のモードを抽出する方法を検討した。以下では、(1)分光装置の構築、(2)水分子由来のモードの抽出、(3)今後の展望、について順に説明する。

(1) 分光装置の構築

本研究では、テラヘルツ電磁波の発生にInAs(111)、検出にZnTe(110)を用いた。半導体表面からのテラヘルツ電磁波発生については多くの文献があり、InAs(111)からの発生効率が一番良いことが分かっているため、InAs(111)を採用した。ZnTeのポッケルス効果を用いたテラヘルツ電磁波の検出では、検出帯域はZnTeの厚さに大きく依存する。本研究では、2 THz以下の帯域を高S/Nで測定することを目指し、2 mm厚のZnTeを用いることにした。

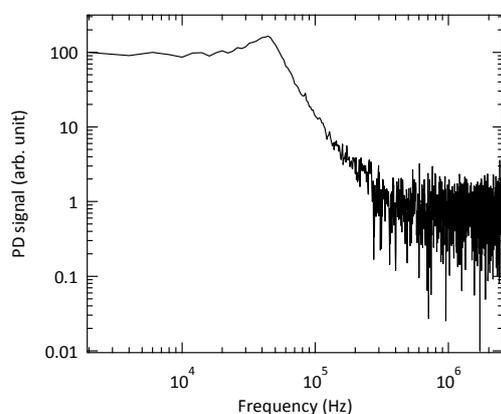


図2. 光信号増幅回路の周波数特性

フォトディテクタからの信号を増幅する回路を製作し、周波数特性を検証した。キャビティダンパーの周波数を掃引しながらフォトディテクタからの信号をオシロスコープで取得した。得られた周波数特性を図2に示す。40 kHz以下の周波数で良好な応答を示すことが分かった。しかし40 kHz付近で回路からの共振ノイズが増加するため、40 kHz以上の繰返周波数で測定を行うには検出回路

の改良が必要である。ロックインアンプの応答周波数が100 kHzまでであるため、今後、100 kHzに近い周波数での検出を試みる予定である。

(2) 水分子由来のモードの抽出

タンパク質のスペクトル測定は水溶液中で行う場合が多いが、テラヘルツ領域での測定は、自由水による大きな吸収のため、タンパク質と水の水のスペクトルを議論することが難しい。一方、中性子散乱などでは、水和させたタンパク質粉末を用いた測定が多数行われている。タンパク質粉末を用いた測定では自由水の影響を大幅に減らすことができるため、タンパク質や水和水に由来するスペクトルが得られる。異なる水含量のトリ卵白リゾチーム粉末のTHz-TDS測定結果から、リゾチーム由来の誘電率と水和水由来の誘電率を求めることを検討した。

まず、乾燥したリゾチーム粉末と少ない水含量のリゾチーム粉末についてテラヘルツスペクトルを比較したところ、水和したリゾチーム粉末のテラヘルツスペクトルには、自由水に特徴的な0.6 cm⁻¹の緩和モードがほとんど存在しないことが分かった(図3)。このモードの由来はまだ明らかでないが、水分子が形成する水素結合ネットワークが関係する緩和モードであると考えられている。測定したリゾチーム粉末の水含量は、リゾチームの表面を覆うのに必要な水分子の量よりも十分に少ない。その為、水分子は他の水分子と水素結合を形成しているのではなく、リゾチーム表面の側鎖と個別に水素結合を形成していると考えられる。

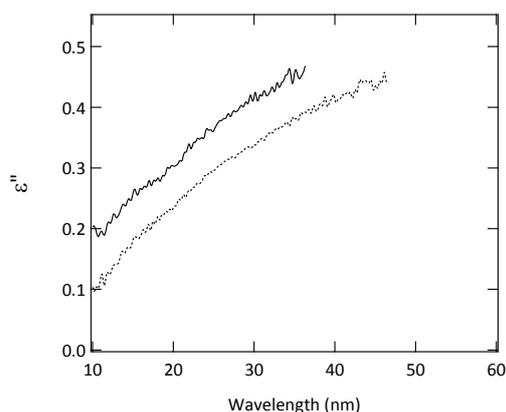


図3. 水和したリゾチーム(実線)と乾燥したリゾチーム(破線)の室温におけるテラヘルツスペクトル。

個別に水素結合した水分子がリゾチーム分子のテラヘルツモードに与える影響を調べるため、低温でのテラヘルツスペクトルを比較した。低温では、吸収強度は水和によつ

て大きく変化しないが、水和によるテラヘルツモードの高周波数シフトが観測された(図4)。吸収強度の変化が少ないことから、水分子が結合してもリゾチームのモードは大きく変化していないと考えられる。一方、水分子の結合によって高周波数シフトが見られたことから、水分子が介在した付加的な結合が加わって、より分子内の非共有結合が強化されたと考えられる。この効果は中性子散乱の結果と一致する。水和による高周波数シフトが室温では観測されないのは、ダンピングが大きくなるためであると考えられる。

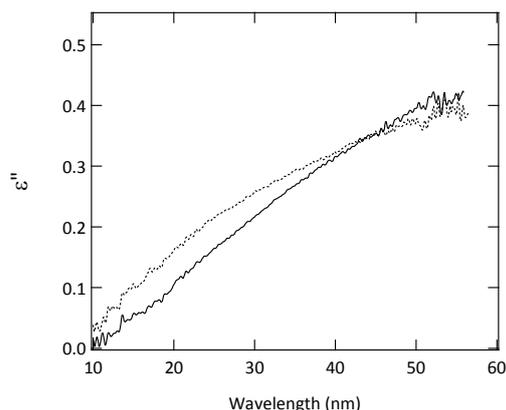


図4. 水和したリゾチーム(実線)と乾燥したリゾチーム(破線)の10 Kにおけるテラヘルツスペクトル。

さらに水和量を増やしたリゾチーム粉末のテラヘルツスペクトルについても考察を行った。水和量を増やしたリゾチーム粉末のスペクトルでは、低周波数側の吸収強度が大きく増加していることから、緩和モードが付加されていると予想される。

(3) 今後の展望

リゾチーム粉末のテラヘルツ時間領域分光測定によって得られた知見をもとに、ビーズと水の混合液のスペクトルを今後測定し、水和した水分子のテラヘルツスペクトルの分離を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① Rumi Shiba, Mika Umeyama, Sayaka Tsukasa, Hironari Kamikubo, Yoichi Yamazaki, Mariko Yamaguchi, Masahiro Iwakura and Mikio Kataoka, “Systematic alanine insertion reveals the essential regions that encode structure formation and activity of dihydrofolate reductase”, *Biophysics*, **7**, 1-10 (2011), 査読有
- ② Mariko Yamaguchi, Takeshi Ikeda, Kohji Yamamoto, Akira Matsushita, Michiaki

Tatsuno, Yukio Minami, Masahiko Tani, Masahiko Hangyo, “Discrimination of Inflammable Liquids by Two-Dimensional Mapping of Complex Refractive Indices in the Terahertz Range”, *Japanese Journal of Applied Physics*, **49**, 102401(1-4) (2010), 査読有.

- ③ Masahiko Tani, Toshiyuki Koizumi, Hisashi Sumikura, Mariko Yamaguchi, Kohji Yamamoto, and Masanori Hangyo, “Time-Domain Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Signal Detection for Terahertz Vibrational Spectroscopy Using Chirped Femtosecond Pulses”, *Applied Physics Express*, **10**, 072401 (1-3) (2010), 査読有.

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① Yusuke Kishi, Takuya Muto, Mariko Yamaguchi, Issei Iijima, Yoichi Yamazaki, Hironari Kamikubo, Takahiro Hohsaka, and Mikio Kataoka, “FRET analysis of structural changes in staphylococcal nuclease”, The 4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", 2010.12.1, Otsu, Japan.
- ② Mariko Yamaguchi, Yoichi Yamazaki, Hironari Kamikubo, and Mikio Kataoka, “Measurements of loop formation in the denatured state of staphylococcal nuclease”, The 4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", 2010.11.30, Otsu, Japan.
- ③ Yusuke Kishi, Mariko Yamaguchi, Issei Iijima, Yoichi Yamazaki, Hironari Kamikubo, Takahiro Hohsaka, and Mikio Kataoka, “FRET analysis of Staphylococcal nuclease structural changes”, 日本生物物理学会第48回年会, 2010.9.22, Sendai, Japan.
- ④ Mariko Yamaguchi, Yoichi Yamazaki, Hironari Kamikubo, and Mikio Kataoka, “Urea denaturation of staphylococcal nuclease monitored by tryptophan-cysteine distance”, 日本生物物理学会第48回年会, 2010.9.20, Sendai, Japan.
- ⑤ Mariko Yamaguchi, Yoichi Yamazaki, Hironari Kamikubo, and Mikio Kataoka, “Local Structure Characterization of Staphylococcal Nuclease by Lifetime measurement of tryptophan triplet state, The 3rd International Symposium”, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, 2009.12.21, Nagoya, Japan.
- ⑥ Mariko Yamaguchi, Takeshi Ikeda, Kohji Yamamoto, Akira Matsushita, Michiaki Tatsuno, Yukio Minami, Masahiko Tani, and Masanori Hangyo, “Two-dimensional mapping of refractive indices for

discrimination of inflammable liquids”,
International Symposium on Frontier of
Terahertz Spectroscopy III -Next generation
technology in THz frequency region and its
application to THz sensitive spectroscopy
and sensing-, 2009.10.23, Fukui, Japan.

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 真理子 (YAMAGUCHI MARIKO)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学
研究科・助教
研究者番号：50521738

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：