トピックス

フェムト秒時間領域ラマン分光法を用いた
光受容・発光タンパク質の反応ダイナミクスの
研究倉持 光^{1,2,3}, 藤澤知績^{1,2}, 竹内佐年^{1,2}, 田原太平^{1,2}¹理化学研究所田原分子分光研究室²理化学研究所光量子工学研究センター³JST さきがけ

1. はじめに

光応答性タンパク質は我々生物が生命活動を維持する上で重要なだけでなく、生体イメージングにおけるプローブや、オプトジェネティクスにおける神経伝達の制御手段として用いられるなど、様々な研究領域におけるツールとしても欠かすことができない。こうした光応答性タンパク質の機能を正しく“理解”し、“使う”ためには、その精緻な動作機構を分子論的に明らかにすることが必須である。特に、光応答性タンパク質の機能は光反応に伴う活性部位の構造変化と密接に関わるため、その機能発現機構を明らかにするには、反応の進行に伴って時々刻々と変化していくタンパク質の活性部位の構造を知ることが欠かせない。しかし多くの光応答性タンパク質において、フェムト〜ピコ秒の時間スケールで起こる光反応初期の構造ダイナミクスに対する知見は実験的な困難から極めて限られている。本稿では近年我々が発展させたフェムト秒時間分解“時間領域”ラマン分光法を用いて明らかにできた光応答性タンパク質の超高速構造ダイナミクスを紹介する。

2. フェムト秒時間分解インパルス誘導ラマン分光法

分子に分子振動の周期 (10 ~ 300 fs) よりも短い時間幅を持った超短パルス照射すると、分子の振動運動を強制的に誘起し分子を一斉に揺さぶることができる。これはインパルス誘導ラマン散乱過程と呼ばれ、この分子の揺れ (振動) はもう一つの超短パルスを用いて吸光度変化等の形として直接時間領域で観測することが可能である。このようにして時間領域で得

られる信号には周波数、位相、振幅などの分子振動に関する全ての情報が含まれており、これをフーリエ変換すれば分子のラマンスペクトルが得られる。また、用いる超短パルスの波長を分子の電子遷移に近づけることで、電子遷移が局在する部位のラマン信号強度を共鳴効果によって増大させることが可能であり、これによってタンパク質中の発色団のみの構造情報を引き出すといった部位・分子選択的な測定が可能となる。

このような超短パルスによるラマン計測をフェムト秒の光励起と組み合わせて反応過渡種に適用したのが、我々が開発したフェムト秒時間分解インパルス誘導ラマン分光法 (Time-Resolved Impulsive Stimulated Raman Spectroscopy: TR-ISRS) である^{1),2)}。TR-ISRSでは反応開始用の超短パルスで分子を励起した後、任意の遅延時間でインパルスラマン信号を計測することで、分子を揺さぶった瞬間における反応過渡種のラマンスペクトルが得られる。この手法の利点は、反応開始後に分子を揺さぶるタイミングをフェムト秒の遅延時間精度で変えながら時間分解ラマンスペクトル測定を行える点であり、従来の自発ラマン分光法では不可能であったフェムト秒領域の分子構造変化を追跡することができる。時間領域での分子振動の計測は近年まで高波数領域の測定には不向きと考えられてきたが、我々は高安定 6 fs パルス光源を製作してこれを用いることで分子振動の全域を高い検出感度で計測できる装置を開発し、従来の振動数領域の方法を凌駕するレベルまでTR-ISRSを高めた³⁾。このTR-ISRSを用いることで、以下に述べるような、これまで観ることができなかった光応答性タンパク質の超高速構造ダイナミクスの観測が実現した。

Femtosecond Time-Resolved Raman Study of Photoresponsive Proteins

Hikaru KURAMOCHI^{1,2,3}, Tomotsumi FUJISAWA^{1,2}, Satoshi TAKEUCHI^{1,2} and Tahei TAHARA^{1,2}¹Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN²RIKEN Center for Advanced Photonics (RAP)³JST PRESTO

3. | イエロープロテインの超高速水素結合構造ダイナミクスとねじれた中間状態の観測

イエロープロテイン (Photoactive Yellow Protein: PYP) は紅色光合成細菌の負の走光性を担う光受容タンパク質である。PYPはサイズも小さく (14 kDa)、水溶性で、容易に結晶化が可能ことから、光受容タンパク質における機能・構造相関を調べる格好の対象として精力的に研究されてきた⁴⁾。PYPの機能は発色団 p-クマル酸 (pCA) の trans-cis 光異性化反応を起点として、タンパク質のミリ秒領域に渡るコンフォメーション変化を通じて発現するとされている。しかしながら実際に光励起直後、特に発色団の光異性化が起こるとされているフェムト秒～ピコ秒の時間スケールで分子にどのような構造変化が生じているのかは明らかにされていなかった。我々は、この PYP の機能発現の原点となる構造ダイナミクスを TR-ISRS を用いて詳細に調べた⁵⁾。

図 1A に光励起後各遅延時刻 ΔT において得られた TR-ISRS 信号を示す。これらの時間領域信号は、それぞれの遅延時刻において超短パルスを用い誘起、検出された反応過渡状態にある分子の振動に対応し、フーリエ変換を通じて時間分解ラマンスペクトルを与える (図 1B)。得られたスペクトルには電子励起状態に由来する多数のラマンバンドが観測されており、これらは励起状態の寿命 (~ 2.4 ps) に対応して減衰していくが、この間に分子の骨格構造を鋭敏に反映する指紋領域のスペクトル形状には大きな変化は見られなかった。すなわち、励起状態において大きな骨格構造の変化は起こっておらず、元の trans 構造が保たれている

図 1 (A) PYP から得られた TR-ISRS 信号。(B) TR-ISRS 信号のフーリエ変換により得られたフェムト秒時間分解ラマンスペクトル。(C) 量子化学計算から示唆された光サイクルの最初の基底状態中間体 I_0 状態の構造。

ことが示唆された。一方で、発色団周辺の水素結合構造のマーカーと考えられている、発色団と、発色団と水素結合したアミノ酸残基との間の分子間振動を含むモードに帰属されるバンド (135 cm^{-1}) の強度が他のバンドより著しく速く、励起後 1 ps 以内に大きく減衰する様子が観測された。これによって、これまでは PYP 発色団の光反応初期過程は励起状態で進行する trans-cis 異性化と考えられてきたが、励起状態では発色団は trans 構造を保っており、まず発色団近傍の水素結合構造の変化が起こることが明らかになった。

また、我々は PYP の光サイクルの最初の基底状態中間体、 I_0 状態の構造を分光学的に初めて明らかにすることにも成功した。 $\Delta T > \sim 10$ ps の遅い遅延時刻で現れる I_0 状態に帰属されるラマンスペクトルは、 600 cm^{-1} 付近のバンド ($C_{\text{ar}} = C_{\text{ar}}$ 結合部位の水素の面外振動) が強く現れる極めて特徴的なスペクトル形状を示すが、我々は結晶構造をベースとした量子化学計算を援用することによって、この I_0 状態は異性化が既に完了した cis 体でありながら分子骨格が大きく面外にねじれた構造をとっていると結論した (図 1C)。興味深いことに、この I_0 状態の構造は最先端の大型放射光施設を用いた時間分解 X 線結晶構造解析による研究でも明確に構造が決まらず、世界的な論争となっていた。我々のデータはこのうち一方の構造を強く支持しており、TR-ISRS が最先端の時間分解 X 線結晶構造解析でも捉えきれない、速い、本質的であるが小さい構造変化を検出することができる強力な手法であることを示している。

4. | コヒーレントな低波数振動が緑色蛍光タンパク質のプロトン移動を誘起する？

オワンクラゲに由来する Green Fluorescent Protein (GFP) は生体イメージングにおける細胞のラベルとして欠かすことができない蛍光タンパク質である⁶⁾。GFP は折り畳み過程で自己触媒的に形成される発色団 (p-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノン) を持つ。この発色団は近紫外光吸収に伴い励起状態プロトン移動を起こし、そのフェノール部位のプロトンが水素結合網を経由して近接するアミノ酸に数ピコ秒で移動する (図 2A)。このようにして生じるアニオン型発色団がイメージング実験に用いられる明るい緑色蛍光を発する。

およそ 10 年前に、この発色団の特定の低波数振動が発色団近傍の水素結合強度を周期的に大きく変え、それによってプロトン移動がコヒーレントに (つまり位相を揃え同期した形で) 誘起されているという提案がされ、大きな注目を集めた⁷⁾。しかし GFP のような

複雑な分子において、本当に単一のコヒーレントな振動によって反応が誘起されているか否かについては、実験的な困難からこれまで直接検証されてこなかった。そこで今回、我々はTR-ISRSを用いてこの提唱の真偽を初めて実験的に検討した⁸⁾。

実験ではまず110 fsの時間幅を持った近紫外光(390 nm)でGFPを励起し、プロトン移動反応を開始させた。この励起光はGFPの励起状態を生成させるだけではなく、励起分子のコヒーレントな低波数振動($< \sim 300 \text{ cm}^{-1}$)も誘起することができる。このように励起状態分子が低波数振動を続けている状態で各遅延時刻においてラマンスペクトル測定を行った。図2Bに示すように、得られた一連のフェムト秒時間分解ラマンスペクトルは、プロトン移動に伴った発色団の構造変化を反映したスペクトルの変化を明瞭に捉えている。このデータにおいて中性型発色団(A^* 状態)のフェノールCH変角振動バンド(1142 cm^{-1})に着目すると、このバンドの強度が遅延時刻 ΔT に対し約300 fs周期で大きな変調を示しており、反応前駆体では確かに励起光によってコヒーレントな低波数振動が誘起され、これによって分子構造が変調されていることがわかる(図2C, 下)(このモードがプロトン移動を促進していると提唱されたモードであり、発色団のフェノール部位が面外に揺れるwagモードであると帰属されたものの、この帰属の詳細は明らかではな

い⁷⁾)。一方、励起状態プロトン移動反応の生成物であるアニオン状態(I^* 状態)のフェノレートCO伸縮振動バンド($\sim 1296 \text{ cm}^{-1}$)が立ち上がる様子に着目すると、このバンドの強度は遅延時刻 ΔT に対して単調な増加を示すのみである(図2C, 上)。もしコヒーレントな低波数振動がプロトン移動反応を促進するのであれば、反応生成物であるアニオン状態の生成速度には周期的な変動が観測されるはずであり、その結果、階段状に信号強度が増大すると予想されるが、我々の実験結果はこれと一致しない。つまり、少なくとも室温においては、発色団の単一の低波数振動がプロトン移動反応を促進するのではなく、水素結合網に沿った内部水やアミノ酸残基などの多様な熱的な運動が反応の進行に寄与していると結論できる。

5. | おわりに

超短パルス光を用いた独自の超高速分光により、従来法では困難であった、光励起直後にタンパク質内で起こる速い、小さな構造変化を観測することが可能になった。本手法により、今後様々な光応答性タンパク質の初期構造ダイナミクスを明らかにできると期待される。こうして得られる構造的知見が、光応答性タンパク質の機能発現機構の理解を深化させるだけでなく、より高い機能を持つ新しい光応答性タンパク質を創成するための一助となれればと思う。

最後に、本稿で紹介したPYPに関する研究は奈良先端科学技術大学院大学の片岡幹雄教授、上久保裕生教授、米澤健人博士と、またGFPに関する研究は東邦大学の細井晴子准教授とともに行ったものである。この場を借りて御礼申し上げる。

文 献

- 1) Fujiyoshi, S. *et al.* (2003) *J. Phys. Chem. A* **107**, 494-500. DOI: 10.1021/jp0270856.
- 2) Takeuchi, S. *et al.* (2008) *Science* **322**, 1073-1077. DOI: 10.1126/science.1160902.
- 3) Kuramochi, H. *et al.* (2016) *Rev. Sci. Instrum.* **87**, 043107. DOI: 10.1063/1.4945259.
- 4) Hellingwerf, K. J. *et al.* (2003) *J. Phys. Chem. A* **107**, 1082-1094. DOI: 10.1021/jp027005y.
- 5) Kuramochi, H. *et al.* (2017) *Nat. Chem.* **9**, 660-666. DOI: 10.1038/nchem.2717.
- 6) Tsien, R. Y. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509.
- 7) Fang, C. *et al.* (2009) *Nature* **462**, 200-204. DOI: 10.1038/nature08527.
- 8) Fujisawa, T. *et al.* (2016) *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3942-3945. DOI: 10.1021/jacs.5b11038.

図2 (A) GFPにおける励起状態プロトン移動反応。(B) TR-ISRSにより得られたGFPのフェムト秒時間分解ラマンスペクトル。(C) 中性型発色団とアニオン型発色団に由来するラマンバンド強度の時間変化の比較。

倉持 光

倉持 光 (くらもち ひかる)

現・JST さきがけ専任研究者

2013 年東京工業大学大学院理工学研究科博士後期課程修了。博士 (理学)。理化学研究所基礎科学特別研究員などを経て 18 年 4 月より現職。

研究内容: 先端の超高速分光による複雑分子系の反応ダイナミクス研究

連絡先: 〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

E-mail: h.kuramochi@riken.jp

URL: <https://spectroscopy.riken.jp/>

藤澤知績

藤澤知績 (ふじさわ ともつみ)

現・佐賀大学理工学部准教授

2008 年京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了。博士 (理学)。理化学研究所基礎科学特別研究員などを経て、18 年より現職。

研究内容: 振動分光法を用いた光受容タンパク質の研究

連絡先: 〒 840-8502 佐賀市本庄町 1

E-mail: tfuji@cc.saga-u.ac.jp

URL: http://biophysics.chem.saga-u.ac.jp/Fujisawa_webpage/Tfujisawa.html

竹内佐年

竹内佐年 (たけうち さとし)

現・兵庫県立大学物質理学研究科教授

1995 年東京大学大学院理学系研究科物理学専攻博士課程修了。博士 (理学)。理化学研究所専任研究員などを経て 2018 年 4 月より現職。

研究内容: 超高速分光, 非線形分光, 超短パルス発生

連絡先: 〒 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

E-mail: stake@sci.u-hyogo.ac.jp

田原太平

田原太平 (たはら たへい)

理化学研究所田原分子分光研究室主任研究員

1989 年東京大学大学院博士課程修了。博士 (理学)。分子科学研究所助教授などを経て 2001 年より現職。

研究内容: 物理化学, 分子科学, 特に先端的な分光計測の開発と応用

連絡先: 〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

E-mail: tahei@riken.jp

URL: <https://spectroscopy.riken.jp/>