タンパク質ダイナミクス観測のための時間分解共鳴ラマン分光計開発

水野 操, 水谷 泰久

大阪大学大学院 理学研究科 (〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-1)

Development of Time-Resolved Resonance Raman Spectrometer for Observation of Protein Dynamics

Misao MIZUNO and Yasuhisa MIZUTANI

Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043

(Received April 20, 2009)

Proteins function by changing their structures, and external stimuli facilitate the sequential change of specific structural sites. To understand the mechanism of protein functions, it is essential to clarify how external stimuli can bring about these site-specific structural changes. Time-resolved ultraviolet resonance Raman spectroscopy probes the structural dynamics of specific sites in protein structure by selectively enhancing the vibrational Raman bands assignable to aromatic amino acid side chains as well as polypeptide bonds. We have constructed a picosecond time-resolved ultraviolet resonance Raman spectrometer to observe ultrafast protein dynamics.

Key Words: Resonance Raman spectroscopy, Time-resolved spectroscopy, Protein dynamics

1. はじめに

タンパク質は、安定な立体構造を保持しつつも柔軟かく構造を変化させ、機能している。多くのタンパク質分子には、外部からの刺激を感知する部分と、機能に直接関わる部分が、それぞれ別々に存在している。たとえば、光刺激により機能を発揮する光センサータンパク質は、発色団とよばれる小分子の補欠分子族が光吸収し、構造が変化する。この構造変化が引き金となり、補欠分子族から離れた部位にまで、段階的な構造変化が伝播し、活性が制御されると概念的に考えられている。タンパク質が機能を発現する機構を理解するには、分子構造の決定が必要不可欠である。このためには、第一に、タンパク質がどのような立体構造をしているのかを理解しなければならない。X線回折法やNMR分光法による立体構造の決定が行われ、多くのタンパク質の「静的」な構造が明らかにされた。機構解明のためには、その次のステップとして、どのように構造が変化し、構造変化が伝播するのか、「動的」な構造を明らかにしなければならない。タンパク質は、サブピコ秒から秒までの幅広い時間スケール、数ナノメートルから数百ナノメートルまでの幅広い空間スケールにおよぶ、複雑に連動した過程からなる構造ダイナミクスを示す。このようなダイナミクスを明らかにするためには、タンパク質中で逐次的に起こる構造変化を、部位ごと、段階ごとに観測しなくてはならない。筆者らは、時間分解共鳴ラマン分光法をもちい

て、タンパク質ダイナミクスに関する研究を行っている。本稿では、共鳴ラマン分光法の特色と、タンパク質ダイナミクスの観測を行うためのピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光計について解説する。また、研究結果の一例として、イエロープロテインの光反応初期過程における構造ダイナミクス観測を紹介する。

2. 共鳴ラマン分光法

ラマン分光法は、振動分光法的一种である。振動分光法は、結晶構造解析とは異なり、分子中における各原子の位置情報を直接的に得ることができない。しかし、振動スペクトルに観測されるバンドの振動数や強度から、化学結合の微小変化を鋭敏に検出できる特徴がある。ただ、タンパク質のような高分子の振動スペクトルはそのままでは複雑すぎるため、個々の分子振動を区別して観測し、構造解析を行うことは非常に困難である。

タンパク質分子中の個々の部位における構造変化を選択的に観測するためには、共鳴ラマン効果を利用することが有効である。共鳴ラマン効果は、ラマン散乱の励起光(プローブ光)の波長を分子の電子吸収に合わせることによって、散乱光強度が 10^4 - 10^6 倍に増強される現象をさす。散乱光の強度増大は、電子遷移に関わる分子団にのみ起こる。その結果、タンパク質においても、プローブ光の波長を適切に選択することで、特定の一部の分子団に由来する振動バンドのみのスペクトルが、部位特異的

に高感度検出される。たとえば、可視光の波長領域のプロブ光をもちいると、可視領域に吸収帯をもつ補欠分子族の振動スペクトルが選択的に観測される。一方、プロブ光に紫外光の波長領域の光を選択すると、タンパク質部分に含まれる芳香族アミノ酸(トリプトファン・チロシン・フェニルアラニン)側鎖やペプチド結合に由来する振動バンドが共鳴ラマン効果を受ける¹⁾。さらに、ポンプ・プロブ法をもちいた時間分解測定と組み合わせることにより、光パルスをトリガーとしたタンパク質の化学反応において、「どの部位で、どのような時間スケールで、どのように構造変化するのか?」という情報を得ることができる。時間分解能は、使用するレーザーのパルス幅で決まる。このため、時間分解共鳴ラマン分光法によって、ピコ秒から的高速タンパク質ダイナミクスを観測することが可能になる。

以下に、プロブ光の波長を紫外光の波長領域にしたときに得られる、タンパク質の紫外共鳴ラマンスペクトルについて説明する。

2.1 芳香族アミノ酸側鎖

ラマン散乱の励起波長として、210-250 nmの光を用いると、芳香族アミノ酸の側鎖芳香環の振動モードが観測される¹⁻³⁾。芳香族アミノ酸残基は、水素結合ネットワークの一部をなしたり、分子内電子移動を担ったりするなど、タンパク質の生理機能に重要な役割を果たす。このため、タンパク質ダイナミクス観測の際の、よいプロブとなる。側鎖芳香環の電子構造は、分子の対称性により変化する。このため、たとえば225 nmで励起したタンパク質の紫外共鳴ラマンスペクトルでは、トリプトファンの振動バンドが著しい強度増大を示す。一方で、プロブ光の波長が、より長波長の240 nm、または、より短波長の210 nmである場合には、トリプトファンのバンド強度が減少し、代わってチロシンやフェニルアラニンのバンドの相対強度が増大する。適切なプロブ光の波長設定により、タンパク質中の特定部位にあるこれらの芳香族アミノ酸側鎖の選択的観測が可能となる⁴⁾。

芳香族アミノ酸側鎖の紫外共鳴ラマンスペクトルは、タンパク質内における残基周囲の環境変化の指標となる。ラマンバンドの振動数については、トリプトファンでは、1550 cm⁻¹に現れるW3バンドは、インドール環の配向角により振動数がシフトする⁵⁾。チロシンでは、1620 cm⁻¹付近に現れるY8aおよびY8bバンド、1200 cm⁻¹付近に現れるY7aバンドの振動数が、ヒドロキシル基のプロトン供与能や水素結合強度に敏感である。また、1180 cm⁻¹付近に現れるY9aバンドの振動数は、水素結合強度が増加する場合や、ヒドロキシル基の構造歪みに対して変化する⁶⁾。また、ラマンバンドの強度については、トリプトファンでは、W3バンド、および1000 cm⁻¹、870 cm⁻¹、760 cm⁻¹にそれぞれ現れるW16、W17、W18バンドが、チロシンでは、Y8a、Y9a、およびY7aバンドが、側鎖周囲の環境変化に応じてその強度を変える。これは、水素結合強度や疎水性相互作用の変化によって励

起プロフィールのシフトが起こるため、これらのバンド強度の変化を調べることによって、側鎖周囲の環境変化を知ることができる⁷⁾。1350 cm⁻¹付近に現れるW7バンドは、トリプトファンダブレットと呼ばれている。観測される2本のバンドの強度比が疎水性の指標となっている²⁾。

2.2 ペプチド結合

タンパク質の主鎖を形成するペプチド結合(-CONH-)は、アミド振動とよばれるいくつかの特徴的な振動モードを示す⁸⁻¹⁰⁾。この振動数は、側鎖の構造の影響をほとんど受けず、ポリペプチド主鎖の構造をよく反映する。ペプチド結合のカルボニル基は、その π - π^* 吸収帯を極大波長190 nm付近にもつ。したがって、ラマン散乱の励起光の波長をこの吸収帯に合わせると、アミド振動モードや、さらに α 炭素に結合した水素原子の面内変角振動(C α -H bend)モードに起因するラマンバンドが強度増大する。このため、これらのモードのバンド強度や振動数は、タンパク質の二次構造の指標となる。さまざまなタンパク質のアミド振動バンドの共鳴ラマンスペクトルの測定から、その振動数や強度との相関にもとづいて二次構造を決定できることが示されている¹¹⁾。また、アミドⅢバンドおよびC α -H bendバンドのスペクトルは、ポリペプチド鎖のコンフォメーション角に特に敏感であり、二次構造の決定に役立つことが知られている¹²⁾。

3. 時間分解紫外共鳴ラマン分光計

タンパク質ダイナミクスの検出には、得られたラマンスペクトルの微小変化を解析する必要があるため、測定の高感度化が不可欠である。このため、さまざまな工夫が必要となる。ここでは、高感度かつ良質なスペクトルを得るために、筆者らが開発・改良を行ってきたピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光計を紹介し、実験の留意点を説明する。紙面の都合上、補欠分子族の構造ダイナミクス観測に適した時間分解可視共鳴ラマン分光計については、他の文献¹³⁾に譲る。また、他のグループによるタンパク質ダイナミクス観測のための時間分解紫外共鳴ラマン分光計についても簡単に記す。

3.1 筆者らのグループによるピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光計

3.1.1 実験装置

Fig. 1にシステムの概略図を示す。光源には、ピコ秒チタンサファイア再生増幅システム(波長778-820 nm, エネルギー $\sim$ 800 μ J, パルス幅 $\sim$ 2 ps, 繰返し1 kHz)を用いている。レーザー出力の第二高調波を二つに分割し、種々の非線形光学効果による波長変換を行い、調べたいタンパク質に最適な波長のポンプ光およびプロブ光を十分な強度で得る。ポンプ光の光路には光学遅延路を配置している。その後、ポンプ光とプロブ光とを空間的に重ねて、タンパク質試料溶液に後方45度の方向から集光する。試料からのラマン散乱光を主分光器により

Fig. 1 Picosecond time-resolved ultraviolet resonance Raman apparatus. LBO = lithium triborate, L = lens, BS = beam splitter, ND = neutral density filter, HWP = half wave plate, SH = mechanical shutter.

分散し、CCD検出器によって検出する。試料からの光のうち、レイリー散乱光や蛍光成分は、主分光器の前に取り付けられたプリズム分散型分光器により除去しておく。このようにして、光反応によるタンパク質部分の構造変化を、紫外共鳴ラマンスペクトルの変化から観測する。遅延時間の時間原点は、サンプル位置においてBBO結晶をもちい、ポンプ光とプローブ光の差周波を発生させることで決定する。

ふたつの光パルスの相互相関時間幅は、3-4 psである。得られるスペクトルのスペクトル分解能は、約 20 cm^{-1} である。これらの時間幅・スペクトル幅の関係は、フーリエ変換限界に近いので、本装置は時間分解振動スペクトル測定においてほぼ極限にあるといえる。

3.1.2 実験の留意点

(a) 光源

タンパク質ダイナミクス観測のため、個々の部位における振動スペクトルを高感度を得るには、出力が安定したプローブ光を紫外波長領域で広範囲かつ連続的に得なければならない。芳香族アミノ酸側鎖およびペプチド結合に由来する振動バンドを観測するには、およそ200-250 nmの範囲のプローブ光が必要になる。筆者らは、時間分解ラマン分光計の光源として、最終出力のパルス幅が2 ps程度になるようなピコ秒再生増幅システムを利用している。このシステムでは、光強度を増幅するために、パルス伸長・増幅・圧縮を段階的に行う。システム内部の光学部品の制約から、部品交換を行わない場合の波長可変範囲は、778-820 nmに限られる。このため、誘導ラマン散乱と高調波・和周波発生を組み合わせた波長変換を行い、波長206-247 nmの範囲の連続した紫外光を、安定で十分な出力(試料位置において、 $0.5 \mu\text{J}$ 以上)で得る。パルスレーザーと誘導ラマン散乱を利用した波長変換は、時間分解共鳴ラマン測定において、適当な波長のプローブ光を発生させる際によくもちいられている¹⁴⁾。これは、波長変換した光が、振動スペクトルを測定するのに十分狭いスペクトル幅の状態が発生するためである。誘導ラマン散乱の発生は、プローブ光発生用の光を、高圧のメタンガスまたは水素ガスを封入したラマンシフトに

集光することで行う。このとき、入射光エネルギーから、メタン分子の全対称伸縮振動モード(2916 cm^{-1})、または水素分子の伸縮振動モード(4155 cm^{-1})のエネルギー分だけ低エネルギー側に、1次ストークス誘導ラマン散乱光がコヒーレントに発生する。得られた1次ストークス誘導ラマン散乱光の第二高調波発生から、波長219-233 nm(メタン)および232-247 nm(水素)のプローブ光が得られる(Fig. 2 (a))。また、メタンのラマンシフトによる1次ストークス誘導ラマン散乱光とレーザー光第二高調波の和周波発生により、波長206-218 nmのプローブ光が得られる(Fig. 2 (b))。誘導ラマン散乱による波長変換において、ラマンシフト内のガスの圧力や入射する光の強度を適切に調整し、さらにエタロンを光路上に配置することで、得られるプローブ光のスペクトル幅は 20 cm^{-1} 程度に抑えることができる。

光反応によるスペクトル変化の検出効率を向上させるためには、プローブ光発生用の波長変換とは独立に、可視光を吸収するさまざまな補欠分子族に対して、ポンプ光の波長を吸収極大付近になるように調整する必要がある。レーザー光第二高調波(389-410 nm, Fig. 3 (a))、およびメタンガスおよび水素ガスのラマンシフトの1次ストークス誘導ラマン散乱光(メタン: 439-465 nm, 水素: 464-494 nm, Fig. 3 (b))のほかに、光パラメトリック発生・増幅光(530-600 nm, Fig. 3 (c))¹⁵⁾を使用し、可視光のほぼ全波長領域をカバーする。これにより、さまざまなタンパク質(たとえば、ヘムタンパク質、イエロープロテイン、フラビンタンパク質、およびレチナールタンパク質など)の光応答による構造変化の高感度追跡が可能になった。

波長変換にもちいた光パラメトリック発生・増幅について簡単に説明する。光パラメトリック発生では、温度制御されたLBO結晶にレーザー光第二高調波を集光し、そのシグナル光を得る。あるレーザー発振波長に対するシグナル光の波長可変範囲は約20 nmであり、結晶温度を30-150 °Cの間で変えて波長選択する。シグナル光と、LBO結晶を透過した残りのレーザー光を同軸でBBO結晶に入射し、増幅を行う。光パラメトリック発生・増幅では、発生した光のスペクトル幅が約 200 cm^{-1} と広がるため、単純にプローブ光にもちいることはできない。しかし、光反応を効率よく起こすためには十分なスペクトル

Fig. 2 Probe arm in Fig. 1. Left: Optical configuration for (a) the frequency doubling of the output of Raman shifter and (b) the frequency mixing of the output of Raman shifter and second harmonic of the laser output. L = lens, BS = beam splitter, DM = dichroic mirror, BBO = β -barium borate, PB = Pellin-Broca prism. Right: Wavelength region of the probe pulse.

Fig. 3 Pump arm in Fig. 1. Left: Optical configuration for (a) the second harmonic of laser output, (b) the output of Raman shifter, and (c) the optical parametric generation (OPG)/amplification (OPA). L = lens, LBO = lithium triborate, BBO = β -barium borate, PB = Pellin-Broca prism. Right: Wavelength region of the pump pulse.

ル幅である。また、サンプル位置におけるレーザー光強度は、10 μ J以上あり、十分な割合のタンパク質試料分子に対して光反応を起こすことができる。

ピコ秒パルスの場合、試料に照射される光電場は非常に大きくなる。このため、使用する光の強度には十分な注意が必要である。プローブ光の強度が大きすぎると、プローブ光強度とラマン散乱強度の線形性が崩れる、いわゆる「飽和現象」が起きる。また、強いプローブ光による光反応で副生成物が生成し、そのスペクトルが観測されることがある^{16,17)}。ポンプ光の強度が大きすぎると、タンパク質試料の誘電破壊や、熱による変性・凝集が起きるため、試料が著しく劣化する。このようなことが起こると、正しいダイナミクス観測が不可能になる。これを避けるためには、測定前に実験条件を十分に検討し、NDフィルター等による光強度の調節が必要である。

(b) ラマン散乱光の検出

タンパク質の良質な紫外共鳴ラマンスペクトルを得るためには、試料からのレイリー散乱光や蛍光などによる迷光を最大限に除去し、ラマン散乱光の強度ロスをするだけ最小限にとどめる必要がある。可視共鳴ラマン測定では、ラマン散乱光を分散するシングル分光器の入射スリットの直前に、ノッチフィルターやバンドパスフィルターなどの光学フィルターを配置して、迷光除去を行っている。一方、紫外共鳴ラマン測定の場合、ラマン散乱光のみが効率よく透過する光学フィルターがないため、これを用いた迷光除去は困難である。このため、光透過率が高いリトロープリズムを用いた前置分光器¹⁸⁾を、シングル分光器の直前に配置し、プレフィルターとして使用する。

ラマン散乱光を検出するCCD検出器の量子効率も、良質なスペクトルを得るための重要な要素である。ラマン測定では、光の照射面に対して酸化シリコン製の電極が裏面に配置された背面照射型CCDをよく使用する。さらに、素子上に反射防止コーティングを施すことで、量子効率の向上を図っている。

(c) タンパク質試料

ラマン分光法は、試料の形態による測定の制限が少なく、目的に合わせてこれを選択できる。タンパク質のラ

マンスペクトル測定においても例外ではなく、生体内に近い環境で質のよいスペクトルを得ることができる。これは、ラマン分光法の大きな利点である。

パルスレーザーを用いた時間分解共鳴ラマン測定では、パルスごとに光反応に対してフレッシュな試料への光照射を常にしなくてはならない。このため、溶液状態のタンパク質試料はフローさせる必要がある。筆者らが使用しているフロー装置(ワイヤガイドノズル法¹⁹⁾, Fig. 4)について説明する。上部の液溜めにある試料は、重力により2本のワイヤ間を落下し均質な液膜を形成する。下部に流れた溶液は、ポンプにより送液され、再び液溜めに戻る。溶液の循環により、少量のタンパク質試料の繰り返し測定を行うことができる(本装置における1回の積算の必要量は、最小で6 mLである)。この装置の光照射面にはガラスセルや石英セルがないため、エネルギーが高いピコ秒パルス光を用いる測定に適している。また、液膜の厚さは100-500 μ m程度に調節できるので、試料中の光路長が短くなり、紫外波長領域のタンパク質の強い吸収による共鳴ラマン散乱の自己吸収効果を小さく抑えられる利点がある。また、ごく少量の試料(1 mL程度)や、ガス置換を行うために気密性が必要な場合は、石英製NMRチューブを回転ホルダーに固定した回転セルをもちいている。

3.2 他のグループの時間分解紫外共鳴ラマン分光計

チタンサファイアレーザー発振器は、およそ700~1000 nmの幅広い波長可変範囲を有する。このため、サブナノ秒以降のタンパク質ダイナミクス観測には、チタンサファイアレーザーの出力からの第四高調波を利用する方法が、一般的に行われている(波長変換にもちいるBBO結晶の位相整合条件により、とくに206 nm以下の波長の光を得るためには、基本波と第三高調波の和周波により第四高調波を得る)²⁰⁻²³⁾。これらの装置は、時間分解能が低下した分、スペクトル分解能が向上し、より精度の高いタンパク質構造情報を得ることができる。

サブナノ秒時間分解測定において、Kuboらは、サブナノ秒チタンサファイア再生増幅システム(時間分解能<0.5 ns)の出力を光源とした、時間分解ラマン分光計を製作した²⁰⁾。サブナノ秒パルスは、増幅時に光学部品へダメージを与えないため、再生増幅器内にパルス伸長・圧縮器を必要としない。このため、チタンサファイ

Fig. 4 Flowing system by a wire-guided nozzle. R = reservoir, SST = stainless steel tube, WG = wire guide, TT = Teflon tube.

アレーザ発振器同様の幅広い波長可変範囲をもつ。この装置では、二つに分割したレーザー光の第四高調波(206-244 nm)および第二高調波(412-488 nm)を、それぞれプローブ光とポンプ光にもちいている。遅延時間は光学遅延をもちいて設定し、 -1 nsから $+10$ nsの時間分解測定を行う。ナノ秒以降のタンパク質ダイナミクス測定では、プローブ光には、Qスイッチレーザーで励起したチタンサファイアレーザー発振器の出力の第四高調波をもちいる²¹⁻²³。ポンプ・プローブ測定には、2台のナノ秒レーザーをもちいて、遅延時間はデジタルパルス発生器で制御する。ポンプ光の光源には、プローブ光用のレーザーとは独立したレーザーをもちいることができるため、さまざまな波長のポンプ光を用いることが可能である。遅延時間の設定範囲は、レーザーの繰り返しにより決定される。

このほかに、高出力QスイッチNd:YAGレーザーの第三高調波を光源にして、水素のラマンシフトの5次アンチストークス誘導ラマン散乱光(波長204 nm)を、紫外プローブ光にもちいる方法も報告されている²³。

4. 研究紹介

筆者らはこれまでに、本稿で説明したピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光計をもちいて、ミオグロビンのリガンド光解離^{24,25}、イエロープロテインの光反応初期過程²⁶、グルコース酸化酵素の光誘起電子移動²⁷、およびバクテリオロドプシンのレチナル異性化に伴う構造ダイナミクス²⁸を観測してきた。詳細は参考文献²⁴⁻²⁸を参照されたい。ここでは、紫外共鳴ラマンスペクトルの高感度測定のための工夫を試行錯誤するきっかけとなった、イエロープロテインの光反応初期過程の観測について簡単に紹介する。

イエロープロテイン(Fig. 5 (a))は、紅色光合成細菌中に含まれ、この細菌が示す負の走行性の光センサーであると考えられている。このタンパク質の発色団(*p*-クマル酸)とタンパク質部分における構造ダイナミクスが、どのように連動しているのかを調べることを試みた。Fig. 5 (b)に、イエロープロテインの光励起後3 psの時間分解紫外共鳴ラマン差スペクトル(各スペクトルの上段)と、ポンプ光未照射状態の紫外共鳴ラマンスペクトル(各スペクトルの下段)を示す。プローブ光の波長を選択することにより、部位特異的観測を行った。光照射後3 psのスペクトルは、*p*-クマル酸が電子励起状態にあるときのタンパク質構造を反映している。差スペクトルに見られる負のバンドは、ポンプ光未照射状態のスペクトルと比較して、バンド強度が減少していることを表している。芳香族アミノ酸側鎖については、チロシンはY8a, Y7a, およびY9aバンドに、トリプトファンはW3, W7, W16, およびW18バンドに明らかな強度減少が観測された。ペプチド結合については、アミドIIIバンドに強度減少が観測された。観測されたスペクトル変化から、光照射3 ps後において、*p*-クマル酸とチロシン(Tyr42)側鎖間の水素結合の強化、*p*-クマル酸から離

Fig. 5 (a) Molecular structure of photoactive yellow protein (PDB ID = 2PHY). (b) Time-resolved ultraviolet resonance Raman difference spectra and ultraviolet resonance Raman (probe-only) spectra of photoactive yellow protein in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). Each probe-only spectrum has been divided by a factor of 30. Probe and pump wavelengths: (top) 236 and 446 nm, (middle) 230 and 460 nm, (bottom) 206 and 439 nm. Delay time: 3 ps.

れた位置にあるトリプトファン(Trp119)側鎖周辺の疎水性の減少、二次構造の変化、が起きたことがわかった。光反応初期における二次構造変化は、局所的に起こることが予想される。このため、S/N比が非常に高いスペクトルの測定をしなければ、スペクトル変化の観測はきわめて困難である。本研究により、ピコ秒時間領域における二次構造変化に由来するスペクトル変化を初めて観測することに成功した。

5. まとめ

この数年の研究を通じて、時間分解共鳴ラマン分光法をもちいたタンパク質ダイナミクス観測は、「ダイナミクスを観測する」ことを研究目的に掲げる時期はすでに終了したと考えられる。タンパク質の初期構造ダイナミクスに関する情報は、赤外吸収スペクトルや円二色性スペクトルからも、共鳴ラマンスペクトルと相補的に得ることができる。しかし、これらの分光手法は、溶質の他の振動モードや溶媒の吸収、試料からの蛍光や光散乱などの影響を受けやすいため、実験条件に対する制約が多い。共鳴ラマン測定は、これらの制約が小さいため、生理的な環境に近い状態でのタンパク質の構造情報をより多く得られると期待できる。この利点を活かして、「ダイナミクスがいかに機能と関連しているか」を検討し、タンパク質の機能発現のしくみを明らかにすることが、次のタンパク質の分子科学研究の重要な課題となると考えられる。

参考文献

- 1) T. Kitagawa and S. Hirota: in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* ed. J. M. Chalmers and P. R. Griffiths, Vol. 5 (John Wiley & Sons, Chichester, 2002) p.3426.
- 2) I. Harada and H. Takeuchi: in *Spectroscopy of Biological Systems* ed. R. J. H. Clark and R. E. Hester (John Wiley & Sons, Chichester, 1986) p.113.
- 3) T. Kitagawa: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **58** (1992) 1.
- 4) R. P. Rava and T. G. Spiro: *J. Phys. Chem.* **89** (1985) 1856.
- 5) T. Miura, H. Takeuchi, and I. Harada: *J. Raman Spectrosc.* **20** (1989) 667.
- 6) H. Takeuchi, N. Watanabe, Y. Sato, and I. Harada: *J. Raman Spectrosc.* **20** (1989) 233.
- 7) Z. Chi and S. A. Asher: *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 9595.
- 8) T. Miyazawa, T. Shimanouchi, and S. Mizushima: *J. Chem. Phys.* **29** (1958) 611.
- 9) S. Krimm and J. Bandekar: *Adv. Protein Chem.* **38** (1986) 181.
- 10) R. A. Copeland and T. G. Spiro: *Biochemistry* **26** (1987) 2134.
- 11) Z. Chi, X. G. Chen, J. S. W. Holtz, and S. A. Asher: *Biochem.* **37** (1998) 2854.
- 12) S. A. Asher, A. Ianoul, G. Mix, M. N. Boyden, A. Karnoup, M. Diem, and R. Schweitzer-Stenner: *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 11775.
- 13) 水谷 泰久: *生物物理* **47** (2007) 288.
- 14) Y. Uesugi, Y. Mizutani, S. G. Kruglik, A. G. Shvedko, V. A. Orlovich, and T. Kitagawa: *J. Raman Spectrosc.* **31** (2000) 339.
- 15) Y. Uesugi, Y. Mizutani, and T. Kitagawa: *Rev. Sci. Instrum.* **68** (1997) 4001.
- 16) S. A. Asher, M. Ludwig, and C. R. Johnson: *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 3186.
- 17) C. R. Johnson, M. Ludwig, and S. A. Asher: *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 905.
- 18) S. Kaminaka and R. A. Mathies: *Appl. Spectrosc.* **52** (1998) 469.
- 19) M. J. Tauber, R. A. Mathies, X. Chen, and S. E. Bradforth: *Rev. Sci. Instrum.* **74** (2003) 4958.
- 20) M. Kubo, T. Uchida, S. Nakashima, and T. Kitagawa: *Appl. Spectrosc.* **62** (2008) 30.
- 21) X. Zhao, R. Chen, C. Tengroth, and T. G. Spiro: *Appl. Spectrosc.* **53** (1999) 1200.
- 22) X. Zhao, C. Tengroth, R. Chen, W. R. Simpson, and T. G. Spiro: *J. Raman Spectrosc.* **30** (1999) 773.
- 23) S. Bykov, I. Lednev, A. Ianoul, A. Mikhonin, C. Munro, and S. A. Asher: *Appl. Spectrosc.* **59** (2005) 1541.
- 24) A. Sato and Y. Mizutani: *Biochem.* **44** (2005) 14709.
- 25) A. Sato, Y. Gao, T. Kitagawa, and Y. Mizutani: *Proc. Natl. Sci. Acad. Sci. USA* **104** (2007) 9627.
- 26) M. Mizuno, N. Hamada, F. Tokunaga, and Y. Mizutani: *J. Phys. Chem. B* **111** (2007) 6293.
- 27) A. Fujiwara and Y. Mizutani: *J. Raman Spectrosc.* **39** (2008) 1600.
- 28) M. Mizuno, M. Shibata, J. Yamada, H. Kandori, and Y. Mizutani: *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 12121.

レーザーワード

ラマン分光法(Raman spectroscopy)

ラマン分光法では、分子に単色光を照射し、その散乱光を測定する。散乱光の中には、照射した光の振動数(E_i)とは異なる振動数(E_s)を持つものがあり、両者の差($E_i - E_s$, これをラマンシフトとよぶ)は振動準位間のエネルギー差と等しい。したがって、散乱光のスペクトルから振動スペクトルを得ることができる。これがラマン

散乱スペクトル(略してラマンスペクトル)である。スペクトルからは、主に分子構造に関する情報が得られる。また、照射する光の振動数が分子の電子遷移の振動数に近づくと、散乱光の強度が非常に強くなる。この現象を共鳴ラマン効果とよび、得られる振動スペクトルを共鳴ラマンスペクトルとよぶ。(水谷 泰久)