

## タンパク質のテラヘルツ分光

大阪大学レーザーエネルギー学研究センター

山口真理子、山本晃司、谷正彦、萩行正憲

**[はじめに]** タンパク質の低振動モード(ピコ秒オーダーの振動周期や緩和時間をもつモード)は、タンパク質内の原子の集団運動やタンパク質全体の非調和的な運動に由来するものであり、これらの運動はタンパク質が機能を発現するうえで重要であると考えられている[1,2]. これまで低振動モードの観測手段として、主に非干渉性中性子散乱が用いられてきた[3,4]. 特にエネルギー移動を伴う非干渉性非弾性中性子散乱には、主に拡散に関係した準弾性散乱と振動モードに関係した非弾性散乱がある. 準弾性散乱は、タンパク質の周囲に存在する水分子の緩和モードや水分子と水素結合した側鎖の緩和モード、及びタンパク質全体の非調和な運動から起こる過減衰振動モードなどによる散乱である. 一方非弾性散乱は、タンパク質の調和的な振動から起こる減衰振動モードなどによる散乱である. いずれの散乱もタンパク質のダイナミクスに関係した重要な情報である[1,5,6]. 近年、中性子散乱と同じ周波数領域の現象を観測する手段としてテラヘルツ時間領域分光法(THz-TDS)が提案されている. THz-TDSは、フェムト秒パルスレーザーを用いて広帯域テラヘルツ電磁波パルスを発生させ、試料透過前後のテラヘルツ電磁波パルスの振幅と位相の変化を測定する分光法である[7]. 1 THzを波数、エネルギーに換算するとそれぞれ $33.3 \text{ cm}^{-1}$ 、 $4.13 \text{ meV}$ である. THz-TDSでは状態密度そのものを求めることはできないが、 $3\text{--}100 \text{ cm}^{-1}$ のスペクトルデータを比較的短時間で得ることができる. そのため、頻繁に実験することが困難な中性子散乱の非弾性散乱スペクトルデータに対する相補的なデータとして期待できる. 一方で中性子散乱の結果から、タンパク質のテラヘルツ領域のスペクトルは鋭い吸収バンドをもたない非常にブロードな構造であることが分かっている[1]. また、タンパク質の活性・不活性の境界温度とされる約200 K前後で、スペクトルのline shape及び平均自乗変位に変化が見られているものの、異なるタンパク質間でのスペクトルの違いはほとんど観測されていない[3,4,8]. THz-TDSにおいても中性子散乱と同様に、タンパク質の活性化に伴うスペクトルのline shapeの変化を観測できると考えられるが、ブロードなスペクトルのline shapeの緩やかな温度変化から、タンパク質のダイナミクスに重要なモードの情報を取り出すことは非常に困難である. そのため、特徴的なテラヘルツスペクトルが期待されるアミノ酸やペプチドの分子結晶について測定を行い、タンパク質を含む柔らかい分子に共通した性質や、小さな分子とタンパク質の性質の違いを知ることが、タンパク質のダイナミクスを理解する一つの手段として考えられる. 本稿では、我々がこれまでに行ってきたアラニンオリゴマー分子結晶の低振動モードに関する研究と、最近測り始めたリゾチーム粉末のTHz-TDSの結果を紹介する.

**[実験方法]** テラヘルツ電磁波の発生は、GaAs基板上に分子線エピタキシャル法で低温成長させたGaAs薄膜に金属のアンテナを蒸着させた光伝導スイッチを用いて行った. バイアス電圧(変調周波数20 kHz)をアンテナ電極間に印加した状態で、アンテナ電極間にフェムト秒のポンプパルス(幅約100 fs, 中心波長約800 nm)を照射すると、およそ1周期のテラヘルツ電磁波パルスが放射される. 放射さ

れたテラヘルツ電磁波パルスをもつ放物面鏡を用いて試料に集光し、試料を透過したテラヘルツ電磁波パルスをさらに2つの放物面鏡を用いてテラヘルツ電磁波の検出器に集光した。検出器は発生器と同様の光伝導スイッチを用いた。検出では、プローブパルスが照射した時に到達したテラヘルツ電磁波パルスの電場に比例した電流がアンテナ電極間に流れる。プローブパルスに光学遅延をかけながらアンテナ電極間に流れる電流をロックイン検出することにより、テラヘルツ電磁波パルスの時間波形を測定することができる。試料の複素屈折率または複素誘電率は、試料挿入前後のテラヘルツ電磁波パルスの時間波形を用いて以下のように導出した。試料挿入前後の時間波形のフーリエスペクトルをそれぞれ  $E_{ref}(\nu)\exp(-i\phi_{ref}(\nu))$ 、 $E_{sam}(\nu)\exp(-i\phi_{sam}(\nu))$  とすると、パワー透過スペクトル  $T(\nu)$  と位相差スペクトル  $\Delta\phi(\nu)$  は

$$T = \left( \frac{E_{sam}}{E_{ref}} \right)^2, \quad \Delta\phi = \phi_{ref} - \phi_{sam}$$

と書き表される。ただし  $\nu$  は周波数を表す。すると試料の複素屈折率  $\tilde{n}(\nu) = n(\nu) - i\kappa(\nu)$  は

$$\sqrt{T} \exp(-i\Delta\phi) = \frac{4\tilde{n}}{(1+\tilde{n})^2} \exp\{-i2\pi\nu(\tilde{n}-1)d\} \sum_{l=0}^N \left\{ \left( \frac{\tilde{n}-1}{\tilde{n}+1} \right) \exp(-i2\pi\nu\tilde{n}d) \right\}^{2l}$$

を解くことで得られる。ただし  $d$  は試料の厚さである。試料内の多重反射の回数を表す  $N$  は、反射したテラヘルツ電磁波が減衰により無視できると考えられる十分大きな値をとった。複素誘電率  $\tilde{\epsilon}(\nu) = \epsilon'(\nu) - i\epsilon''(\nu)$ 、吸収係数  $\alpha(\nu)$  は複素屈折率から

$$\epsilon' = n^2 - \kappa^2, \quad \epsilon'' = 2n\kappa, \quad \alpha = 4\pi\nu\kappa$$

により求められる。

**[実験結果と考察]** 図1に10 KにおけるL-アラニン( $\text{H}_3\text{N}^+\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-COO}^-$ )分子結晶の吸収スペクトルを示す。テラヘルツ領域では、74, 83, 91, 104  $\text{cm}^{-1}$ に鋭いバンド(図1のA, B, C, D)が観測される。アラニン分子結晶はアラニン分子どうしが水素結合によってつながり、結晶が形成されている。テラヘルツ領域のバンドは主として、アラニン分子間の振動モードによる共鳴吸収であると考えられる[9]。テラヘルツ領域のバンドの帰属を行うため、重水素置換したL-アラニン分子結晶(L-アラニン- $d_3$ :  $\text{D}_3\text{N}^+\text{-CD}(\text{CD}_3)\text{-COO}^-$ , L-アラニン- $d_4$ :  $\text{H}_3\text{N}^+\text{-CD}(\text{CD}_3)\text{-COO}^-$ )について測定を行った。重水素置換したアラニン分子結晶の吸収スペクトルも図1にあわせて示している。すべてのバンドが重水素置換によって低周波数シフトしている。バンドの周波数は通常、それぞれの振動モードに対応した換算質量の平方根に逆比例する。74, 91  $\text{cm}^{-1}$ のバンド(図1のAとC)は、分子量を分子間伸縮振動モードの換算質量値としたときのバンドシフトの値と非常によく一致しており、ほぼ純粋な分子間振動モードであることを表している。これに対し83, 104  $\text{cm}^{-1}$ のバンド(図1のBとD)は、分子量を分子間伸縮振動モードの換算質量値としたときに想定されるバンドシフトよりも大きなシフトを示している。よってこれらのモードは分子内振動を含んでいることが示唆される。さらに、L-アラニン- $d_4$ の結果から分かる通り、メチル基を重水素置換するとバンドは大きくシフトすることから、分子間振動モードは特にメチル基に関係した分子内振動を含んでいると考えられる。つまり、多数のアラニン分子が参加する非局所的な運動は、一

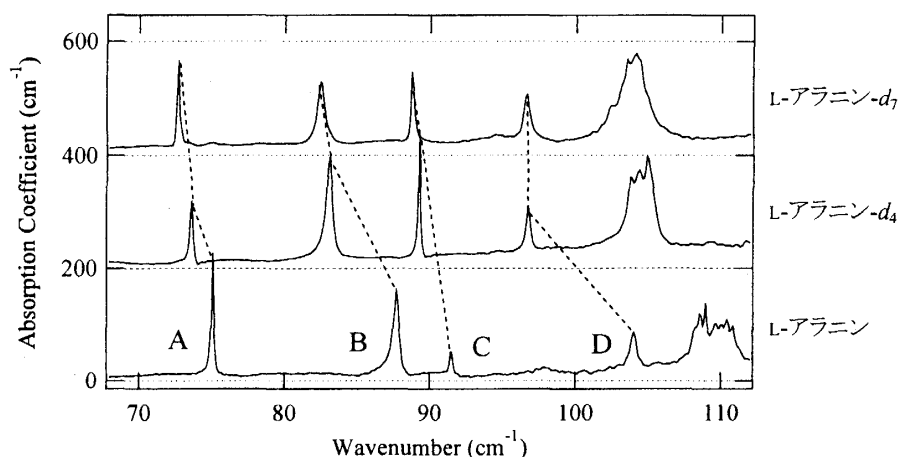


図1 10 KにおけるL-アラニン分子結晶及びその重水素置換体の吸収スペクトル。図中A(74 cm<sup>-1</sup>), B(83 cm<sup>-1</sup>), C(91 cm<sup>-1</sup>), D(104 cm<sup>-1</sup>)はL-アラニン分子結晶の吸収バンドを表し, AとCがほぼ純粋な分子間振動によるバンド, BとDが分子内振動の影響を受けた分子間振動によるバンドである(本文参照)。

アラニン分子の局所的な運動にわずかながら影響されていると考えられる。この結果は、タンパク質における集団的な構造のゆらぎは、アミノ酸分子の側鎖などの局所的なゆらぎに影響される可能性があることを示しているといえる。アラニン分子は側鎖が小さいため、分子内振動の分子間振動に与える影響は小さいが、側鎖の大きなアミノ酸分子では、さらにアミノ酸分子内振動の分子間振動に与える影響が大きくなると考えられる。また図2-(a)にL-アラニン分子結晶の吸収スペクトルの温度変化を示しているが、分子間ポテンシャルの非調和性によるバンドの温度変化(温度上昇による低周波数シフト及びバンド幅の増加)が観測されるものの、構造変化など大きな変化は観測されていない。これに対し、中赤外スペクトルの温度変化では、約200 K以下で500 cm<sup>-1</sup>に存在するアミノ基のねじれ振動に関係したバンドなどのスプリットングが観測されている[10,11]。このスプリットングは、L-アラニン分子結晶の結晶構造が低温でひずむことによって、水素結合のプロトンの位置がわずかにずれるため[10]、またはアミノ基のねじれ振動の対称性が破れるため[11]におこると考えられている。そのためこのスプリットングは、結晶のひずみによって分子内相互作用がわずかながら修正を受けていることを示唆しているといえる。一方、テラヘルツ領域のバンドは分子間振動モードによる寄与が大きいいため、本来は結晶構造の変化に敏感であるにもかかわらず、中赤外のスペクトルのような変化は観測されていない。そのため、アラニン分子間相互作用は結晶のひずみの影響をほとんど受けていないと考えられる。以上のような中赤外スペクトルとテラヘルツスペクトルの温度変化の違いと、アラニン分子結晶における分子内相互作用と分子間相互作用の結晶のひずみに対する影響の違いから、アラニン分子結晶においては、分子内相互作用と分子間相互作用が比較的同じ強さで釣り合っており結晶が保持されていると考えられる。

図1, 2-(a)の結果から、アラニン分子結晶では、分子内相互作用と分子間相互作用が均衡しているため、観測している温度領域では安定な構造が保持されていることが分かった。分子を大きくして(ここではアラニンの残基数を増やして)より多くの自由度を与えてやることで、分子内相互作用と分子間相互作用の均衡が崩れ、構造が不安定化することが期待される。この仮説に基づき、アラニンオリゴマーについてTHz-TDS測定を行った。L-アラニル-L-アラニン(アラニン二量体)は1つのアミド結合、L-アラニントリペプチド(アラニン三量体)は2つのアミド結合をもち、アミド結合の周囲にある二面角によってアラニン単量体よりも分子構造が変化しやすくなっている。そのため、アラニンオリゴマーの残基数によって分子の構造の安定性を変化させることができると考えられる。アラニン二量体分子結晶とアラニン三量体分子結晶の吸収スペクトルを図2-(b), (c)にそれぞれ示す。10 Kでは、L-アラニン分子結晶の

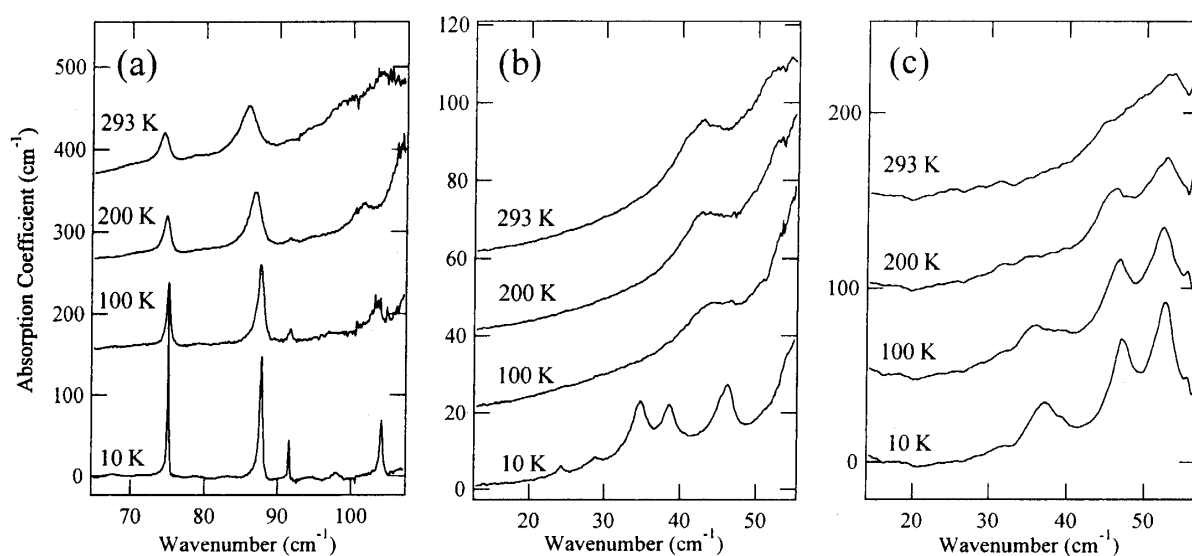


図2(a)L-アラニン分子結晶, (b)L-アラニル-L-アラニン分子結晶, 及び(c)L-アラニトリペプチド分子結晶の吸収スペクトル.

吸収スペクトルと比べてバンド幅が全体的に大きくなっているものの、複数の吸収バンドがアラニン二量体、アラニン三量体いずれのスペクトルにおいても観測されている。特徴的なのは、二量体に観測される100 K以下でのスペクトル変化である。100 K以下のスペクトルの温度変化を詳細に測定した結果、10 Kで安定な構造と常温で安定な構造は異なる構造であり、各温度での安定な構造へ変化していることが分かった。このような状態変化はこれまで測定を行ってきたアミノ酸分子結晶においては観測されなかった変化である。そのためアミノ酸分子結晶には存在しない二面角の自由度がもたらした変化であると考えられる。一方2つのアミド結合をもつアラニン三量体では、アラニン二量体に観測されたような急激なスペクトル変化は観測されなかった。測定している温度領域においてアラニン三量体の構造は変化していないと考えられる。このことから、アラニン二量体は残基数が少なく分子内に水素結合を作ることができないため、アラニン単量体やアラニン三量体に比べて分子構造が不安定であるが、残基数が増加するにしたがって分子内で水素結合を作ることができるようになり、分子構造が安定化されると考えられる。この結果は、水溶液中のアラニンオリゴマーの分子構造の計算結果と一致する[12]。ポリアラニンなどで見られる $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シート構造などの二次構造[13]はタンパク質中に多く存在する。タンパク質中の二次構造は比較的硬い部分であり、ループ状の部分が柔軟性を生み出している[2]。アラニン三量体が示す硬い性質は二次構造の形成を示唆するものであり、一方アラニン二量体の柔らかい性質は、ループで見られる性質を表していると考えられる。

またアラニン単量体、アラニン二量体、アラニン三量体の連続的な吸収帯とバンド幅の温度変化を図3-(a), (b)にそれぞれ示す。図3-(a)において、連続的な吸収帯は温度が上昇してもほとんど増加していない。このことから、連続的な吸収帯の大部分は、本来禁制である振動モードが結晶の乱れによって観測されるようになったためだと考えられる。また、連続的な吸収帯の形状も大きく温度変化していないことから、結晶の乱れの状態も大きく温度変化していないと考えられる。結晶の乱れが温度変化しない場合、図3-(b)の10 Kでのバンド幅が結晶構造の乱れによる不均一幅であり、温度依存するバンド幅は非調和性によるものであると考えられる。アラニン単量体と比べて、アラニン二量体、アラニ

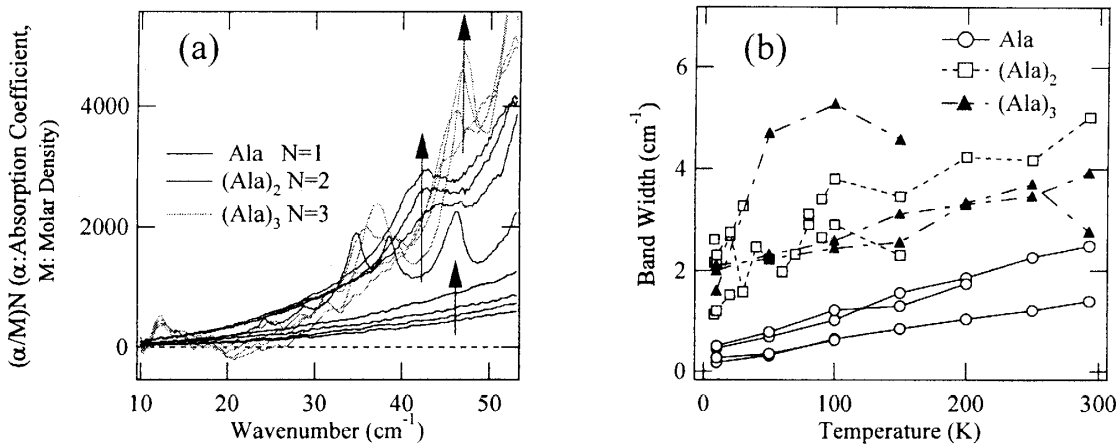


図3 L-アラニン分子結晶, L-アラニル-L-アラニン分子結晶, L-アラニトリペプチド分子結晶における(a)連続的な吸収帯の温度変化と(b)バンド幅の温度変化. ただし(a)の矢印は温度変化の方向(順に 10 K, 100 K, 200 K 及び 293 K)を表す.

ン三量体のバンド幅は10 Kでも大きな値を示しており, 結晶の乱れが大きいことを示している. この原因は, アラニン二量体, アラニン三量体はアラニン単量体よりも多くの安定な分子構造をもっており, 結晶中でも複数の分子構造をとって結晶構造に乱れが生じるためだと考えられる. 一方, 構造変化が見られなくなる100 K以上のバンド幅の温度変化については, アラニン単量体, アラニン二量体, 及びアラニン三量体の間で大きな違いは見られない. このことからバンド幅の温度変化を決めている非調和性に関しては, アラニンオリゴマー間で大きな違いがないと考えられる.

図4-(a)にリゾチーム凍結乾燥粉末の複素誘電率の温度変化を示す. 粉末はポンプで真空引きしながらペレット状に成型し, 約3日間の測定も真空中で行った. そのため粉末は乾燥状態であると考えられる. 複素誘電率の実部の分散から,  $20\sim 30 \text{ cm}^{-1}$ に減衰振動モードによるものと考えられるモードが存在することが分かる. リゾチームのバンドがアラニンオリゴマーのバンドと比べてブロードなのは, 大きな不均一幅を持った振動モードによる複数のバンドが重なってスペクトルを形成しているためであると考えられる[1,5]. 温度が上昇するとバンドは低周波数シフトし, 吸収を表す複素誘電率の虚部は増加する. これらの温度変化は, 温度の上昇に伴って結合が弱くなり, ゆらぎが大きくなることを示していると考えられる. また図4-(a)に示した複素誘電率の虚部を温度因子  $(1 - \exp(-h\nu/k_b T))$  で割った値を図4-(b)に示す. これは中性子散乱の動的構造因子に相当する[14]. 水分を含んだリゾチーム粉末における中性子散乱測定では, 200 K以上で準弾性散乱が増加するが[8], 図4-(b)では低周波数側に急激な吸収の増加は観測されない. このことから今回測定したリゾチーム粉末においては, conformational substate間を行き来するような運動はおこっていないと考えられる. また乾燥状態のタンパク質粉末の動的構造因子[15]と比較してみても, 温度変化に違いが見られる. この原因の一つは, 動的構造因子は状態密度を表しているのに対し, 図4-(b)で観測しているのは, 双極子に由来する重みを状態密度にかけたものであるためであると考えられるが[14], はっきりとした原因の解明にはいたっていない. このため今後は, 湿度調整を行ったタンパク質粉末の測定も行い, 動的構造因子との相関を詳しく調べていく必要がある.

**【おわりに】** タンパク質の低振動モードに関する研究については, 測定手法やスペクトルの解釈の困難さから, 実験結果だけでは理解が乏しく, 主に計算結果と実験を比較するという形で研究が進めら

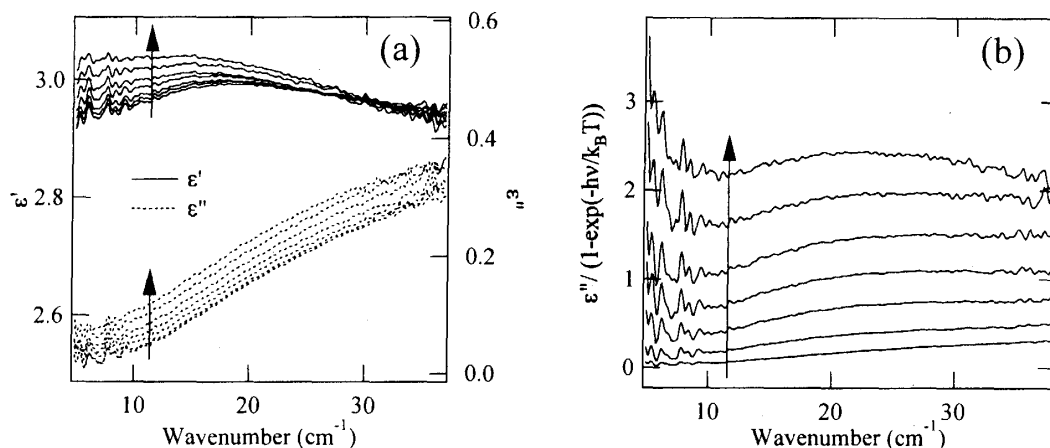


図4 (a)リゾチーム凍結乾燥粉末の複素誘電率と(b)複素誘電率の虚部を温度因子  $(1 - \exp(-h\nu/k_B T))$  で割った値。ただし図中の矢印は温度変化の方向(順に 10 K, 50 K, 100 K, 150 K, 200 K, 250 K 及び 293 K)を表す。

れてきた。THz-TDSを用いてより多くの実験データが得られるようになって、タンパク質のダイナミクスを理解するためにはさまざまな理論計算は必要不可欠である。そのような中で、計算を行わなくても分かる“タンパク質らしさ”をテラヘルツスペクトルから見つけ出すことを目的として、アミノ酸・ペプチド分子結晶のTHz-TDS測定を行ってきた。アミノ酸・ペプチドを、自由度が全く異なるタンパク質と直接比較することはできないが、タンパク質のスペクトルを眺める助けとなり得ると考えられる。今後タンパク質のテラヘルツスペクトルが数多く測定され、低振動モードについての議論が活発になることが期待される。

#### References

- [1] J. C. Smith, *Quart. Rev. Biophys.* **3**, 227 (1991).
- [2] S. Hayward and N. Go, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **46**, 223 (1995).
- [3] M. Kataoka, H. Kamikubo, J. Yunoki, F. Tokunaga, T. Kanaya, Y. Izumi, and K. Shibata, *J. Phys. Chem. Solid.* **60**, 1285 (1999).
- [4] J. Smith, K. Kuczera, B. Tidor, W. Doster, S. Cusack, and M. Karplus, *Physica B* **156 & 157**, 437 (1989).
- [5] M. Diehl, W. Doster, W. Petry, and H. Schober, *Biophys. J.* **73**, 2726 (1997).
- [6] S. Hayward, A. Kitao, F. Hirata, and N. Go, *J. Mol. Biol.* **234**, 1207 (1993).
- [7] D. Grischkowsky, S. Keiding, M. van Exter, and Ch. Fattinger, *J. Opt. Soc. Am. B* **7**, 2006 (1990).
- [8] A. Paciaroni, S. Cinelli, and G. Onori, *Biophys. J.* **83**, 1157 (2002).
- [9] M. Yamaguchi, F. Miyamaru, K. Yamamoto, M. Tani, and M. Hangyo, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 053903 (2005).
- [10] M. Rozenberg, G. Shoham, I. Reva, and R. Fausto, *Spectrochim. Acta Part A* **00**, 1 (2003).
- [11] M. Barthes, A. F. Vik, A. Spire, H. N. Bordallo, and J. Eckert, *J. Phys. Chem.* **106**, 5230 (2002).
- [12] R. Destro, R. E. Marsh, and R. Bianchi, *J. Phys. Chem.* **92**, 966 (1988).
- [13] K. Yamamoto, K. Tominaga, H. Sasakawa, A. Tamura, H. Murakami, H. Ohtake, and N. Sarukura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **75**, 1083 (2002).
- [14] D. A. McQuarrie, “*Statistical Mechanics*” University Science Books, Sausalito (2000).
- [15] M. Ferrand, A. J. Dianoux, W. Petry, and G. Zaccai, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 9668 (1993).