

## テラヘルツ時間領域分光法によるミオグロビンの低振動ダイナミクス

(1 : 神戸大院理、2 : 神戸大分子フォト)  
 ○ 金子 梓<sup>1</sup>、神原 大<sup>2</sup>、田村 厚夫<sup>1</sup>、富永 圭介<sup>1, 2</sup>

【序】タンパク質は、機能発現に伴い、しばしばその構造を大きく変化させる。この変化は、タンパク質内の原子が集団的に運動することで起こるが、この集団的な運動は水素結合や疎水相互作用、ファンデルワールス力などの弱い相互作用を媒介とした運動で、数十  $\text{cm}^{-1}$  程度の低振動運動に相当する。そのため、この波数領域のスペクトルを調べることで、タンパク質の機能と関連する運動に関する情報が得られると考えられる。ミオグロビン (Mb) は筋肉中に存在し、酸素と結合するヘムタンパク質で、ネイティブな状態の Mb をホロ体 (図1)、その活性中心であるヘムを抜き取った Mb をアポ体という。Mb は機能を発現する際、酸素の出入りを助けるためにヘムを固定する疎水側鎖が大きく移動するような構造変化を起こし、ヘムの存在がその構造変化に重要であることが示唆されている。本研究では、テラヘルツ時間領域分光法を用いて Mb のホロ体、アポ体の低振動数領域のスペクトルを水和量と温度を変化させて測定し、Mb のホロ体、アポ体の低振動ダイナミクスの水和、温度依存性を調べることで、ヘムがタンパク質の低振動ダイナミクスにどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的としている。

テラヘルツ時間領域分光法では、試料を透過したテラヘルツ波と参照となる電磁波の電場の時間依存性を測定し (図2)、これをフーリエ変換することにより、スペクトルを得ることができる。この電場の振幅の変化と位相の変化から試料の吸光係数と屈折率などの物理量を求めることができる。



図1.ミオグロビン (Mb) ホロ体

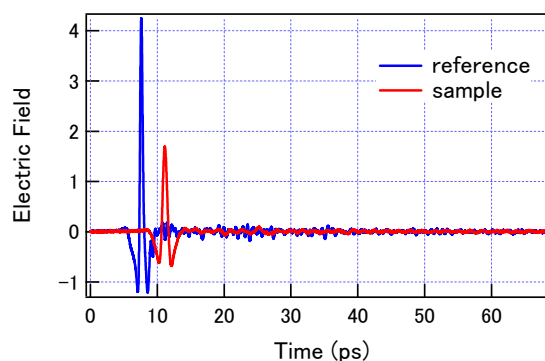


図2.電場の時間変化

【実験】Mb のホロ体を Milli-Q 水に溶かし、さらに 2-ブタノンを加えてヘムを抽出しアポ体を得た。このアポ体の二次構造を CD 測定により調べ、ネイティブな状態に類似した二次構造をとることを確認し、ホロ体の溶液とアポ体の溶液の吸収スペクトル

を測定してアポ体のホロ体による汚染率を求めた。テラヘルツ電磁波は水分子によって強く吸収されるため、本研究では水溶液試料を用いない。また、電磁波がその波長サイズの物体によって散乱されるため、固体試料の粒子径はそれ以下にしなければならない。そこで、ホロ体の溶液、アポ体の溶液をそれぞれ凍結乾燥させ、メノウ乳鉢を用いて粉末にした後、加圧してペレット状にし、真空乾燥機で乾燥させた。このペレット状の試料は湿度を調整した容器内に数時間放置することで水和させた。テラヘルツ電磁波の発生、検出にはフェムト秒レーザーパルス（中心波長 800 nm）と光伝導アンテナを用いた。

**【結果と考察】** 常温でホロ体とアポ体の乾燥させたペレットをテラヘルツ時間領域分光法で測定し、吸光係数と屈折率のスペクトルを得た。吸光係数は波数とともに単調増加した。このスペクトルから式(1)を用いて、換算吸収断面積（Reduced Absorption Cross Section : RACS）を定義した<sup>1</sup>。

$$\begin{aligned} \sigma_R(\tilde{\nu}) &\equiv \frac{\beta h c \tilde{\nu}}{\rho \ln 10 (1 - e^{-\beta h c \tilde{\nu}})} n(\tilde{\nu}) \alpha(\tilde{\nu}) \quad (1) \\ &= \frac{2\pi^2 c N_A}{3\epsilon_0 N} \beta \tilde{\nu}^2 \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{-i2\pi\tilde{\nu}t} \langle \mathbf{M}(0) \cdot \mathbf{M}(t) \rangle \end{aligned}$$

ここで、 $\tilde{\nu}$ は波数、 $n(\tilde{\nu})$ は屈折率、 $\alpha(\tilde{\nu})$ は吸光係数、 $\rho$ は密度、 $c$ は光速、 $N$ は系の分子数、 $\mathbf{M}(t)$ は系の全双極子モーメントである。**RACS**は全双極子モーメントの時間相関関数のスペクトルに波数の二乗をかけたものに比例する。スペクトルの変化を記述する物理量として、**RACS**の強度に注目した。図3は常温、乾燥状態のホロ体とアポ体についてそれぞれ**RACS**を求めた結果である。このグラフから常温、乾燥状態のホロ体、アポ体の**RACS**には差がないことがわかる。

図4は乾燥状態のホロ体、アポ体をテラヘルツ時間領域分光法で-100°Cから0°Cまで温度を変化させて測定し、それぞれ**RACS**を求め、 $20 \text{ cm}^{-1}$ での**RACS**の強度を温度に対してプロットした図である。この結果からも、温度を変化させると**RACS**の強度が増加し、また温度を変化させても乾燥状態のホロ体、アポ体への**RACS**の強度の変化には差がないことがわかる。発表では水和させたホロ体、アポ体の低振動スペクトルを示し、さらに得られた結果について詳細に議論する。

文献 1, K. Yamamoto, K. Tominaga, H. Sasakawa, A. Tamura, H. Murakami, H. Ohtake, and N. Sarukura (2005) *Biophys. J.* 89, L22-L24.

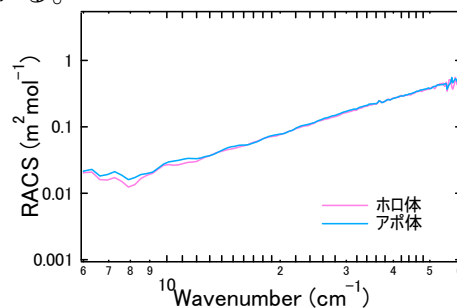


図3.乾燥試料のRACS

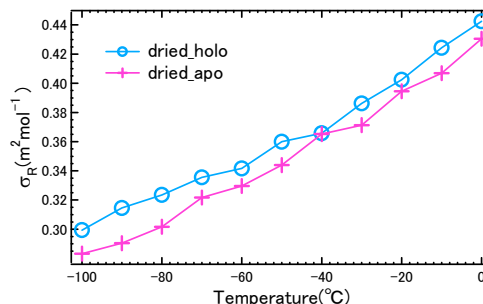


図4.乾燥試料のRACSの強度の温度変化