

1P090

テラヘルツ時間領域分光を用いた天然および変性タンパク質における低振動ダイナミクスの観測 -温度、水和依存性-

(神戸大・分子フォト¹, 神戸大院・理²) 山本 直樹¹, 田村 厚夫², 富永 圭介^{1,2}

Low-frequency dynamics of native and denatured proteins by using terahertz time-domain spectroscopy -temperature and hydration dependence-

(Kobe Univ.) Naoki Yamamoto, Atsuo Tamura, Keisuke Tominaga

【序】タンパク質は熱浴のなかで絶えず揺らぎながらその機能を発現する。機能発現にはしばしば大きな構造変化を伴うことから、揺らぎの中でも特にタンパク質全体が大きく揺らぐような運動が機能に重要であると考えられる。そのような運動は中赤外領域にみられるような局所的な振動運動とは異なり、より低振動側の遠赤外領域において観測されることが種々の理論計算から予想されてきた¹。テラヘルツ分光はこの振動数領域をカバーすることから、揺らぎと機能の関連性を明らかにするために適した分光法であると考えられる。テラヘルツ分光における吸収スペクトルは系の全双極子モーメント $\mathbf{M}(t)$ により以下の式で表わされる²。

$$\alpha(\omega) = \frac{2(1 - e^{-\beta\hbar\omega})\omega}{3\hbar c n(\omega)} \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{-i\omega t} \langle \mathbf{M}(0) \cdot \mathbf{M}(t) \rangle$$

ここで ω は振動数、 $n(\omega)$ は屈折率、 $\beta = k_B T$ (k_B 、 T は、それぞれ、ボルツマン定数と絶対温度)、その他の記号は一般的な物理量をそれぞれ表す。したがってテラヘルツ吸収スペクトルから低振動運動に関する情報を得ることができる。近年テラヘルツ波パルスの発生および検出方法が目覚ましく発展し、テラヘルツ時間領域分光法を用いたタンパク質等の生体分子のテラヘルツ分光が盛んに行われるようになった³。水和および温度など機能と関連するパラメータを変化させた種々の測定が行われた結果、水和させた時のみ 200 K 付近で動力学転移と呼ばれる揺らぎの活性化が引き起こされることが明らかとなってきた⁴。動力学転移は、例えば吸収スペクトルでは転移点付近での急激な吸光係数の増大を伴い、低振動運動の非調和性により大振幅振動が誘起された結果であると考えられている⁵。動力学転移は中性子散乱を始め数多くの手法を用いて観測されており、タンパク質において一般的に観測される現象であることが明らかとなっている。一方、水和が動力学転移にどのような役割を果たしているか、また水和そのものがタンパク質にどのような影響を与えているかなど、まだ明らかになっていない点が多い。さらには構造状態の違いと水和構造の関係も興味深い点の一つである。そこで本研究では天然状態と変性状態リゾチームについてテラヘルツスペクトルの水和・温度依存性を調べ、両者の比較を行った。【実験】天然タンパク質としてニワトリ卵白由来のリゾチームを用いた。このリゾチームに存在する構造形成に重要な4個のジスルフィド結合を還元してカルボキシメチル化することにより変性リゾチームを得た。これらの試料を透析により脱塩して pH を調整したのち凍結乾燥することで得た粉末試料をマイクロ錠剤成形器を用いて加圧することによりペレット状にしたものをテラヘルツ分光測定に用いた。試料の水和はペレットを飽和蒸気圧環境下に任意時間静置することにより達成した。試料の水和量は水の質量をタンパク質の質量で割った値である h を用いて表現される。温度変化は液体窒素ク

ライオスタット(Oxford 社製)を用いて 83K から 293K の範囲で行った。テラヘルツ時間領域分光装置は株式会社先端赤外より購入したものを用いた。この装置では Integral 社製チタン-サファイアレーザー(Integral 社製、パルス幅~10 フェムト秒、中心波長 800nm、繰り返し数 80MHz)を光源として用い、レーザー光を1対の光伝導アンテナに照射することによりテラヘルツ波パルス発生および検出を行っている。

【結果と考察】 Fig.1 に天然状態リゾチームの吸収スペクトルを示す。吸収スペクトルは観測振動数領域において特徴的な吸収帯を持たない単調増加なものとなっているが、これはそもそもこの領域に多くの振動バンドが存在することと、タンパク質構造の多形に由来すると考えられる。乾燥状態($h = 0.11$)では温度の上昇とともに各振動数での吸光係数がほぼ直線的に増加していく。これに対して水和状態($h=0.52$)では約 190 K で吸光係数の増加の割合が大きくなり、乾燥状態と比較して非線形的な増加を示すことがわかる。この現象は動力学転移に対応し、低振動運動間の大きな非調和性による大振幅振動の発現に対応していると考えられている⁵。変性リゾチームも天然リゾチームとほぼ同様の温度・水和依存性を示した。水和が吸収スペクトルにもたらす影響を調べるため、各温度において水和状態から乾燥状態のスペクトルを差し引いた差スペクトルを算出した。天然リゾチームにおける差スペクトル結果を Fig.2 に示す。動力学転移より十分高い温度では差スペクトル強度は温度に対して単調増加なものとなり、水和により活性化されたタンパク質の運動および水和水そのものの寄与を含んでいると考えられる。一方動力学転移以下での低温状態では正と負双方のスペクトル強度を与える成分を用いて初めて解釈が可能であると考えられる。これらの解釈の理論的背景および天然状態と変性状態の差スペクトルの違いについて議論を展開していく予定である。

【引用文献】 1. M. Levitt, C. Sander and P. S. Stern *J Mol Biol*, 181, 423 (1985).
 2. D A McQuarrie, *Statistical mechanics*, University Science Books, Sausalito, Calif. (2000).
 3. K. Sakai, *Terahertz optoelectronics* (Springer-Verlag, Berlin) 1st Ed pp xiii, 387 p (2000).
 4. S. Kawaguchi, O. Kambara, M. Shibata, H. Kandori and K Tominaga *PCCP*, 12, 10255 (2010).
 5. 山本直樹、富永圭介 *日本赤外線学会誌* 22(1), 75 (2012).

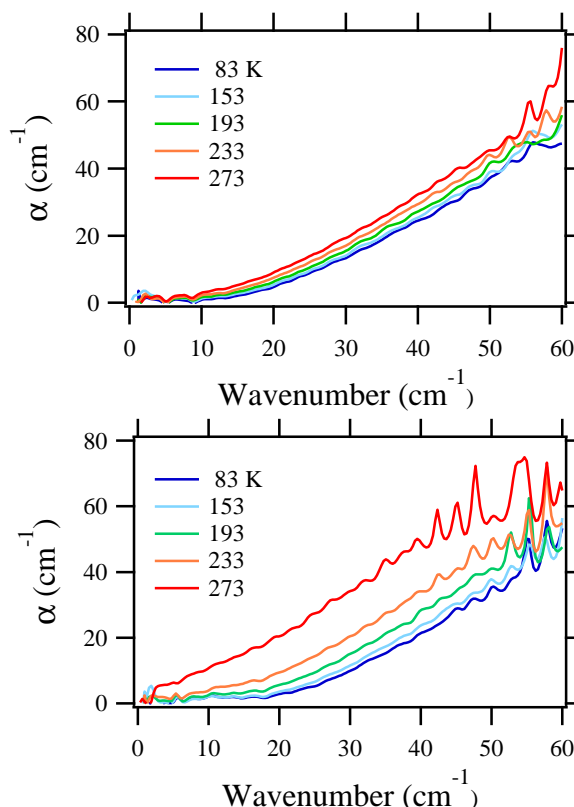


Fig.1 乾燥状態(上)および水和状態(下)での天然リゾチームの吸収スペクトル

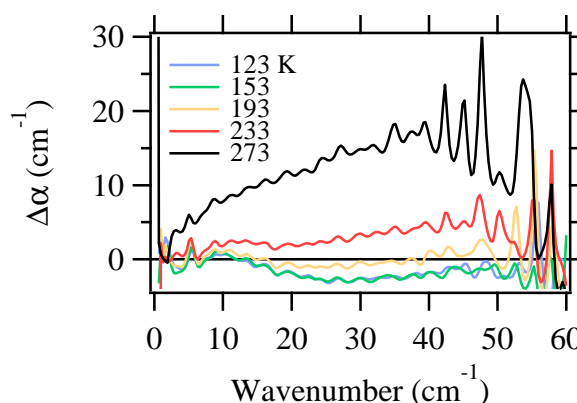


Fig.2 水和状態および乾燥状態の差スペクトル