

テラヘルツ時間領域分光法によるタンパク質低振動ダイナミクスの水和および温度依存性の観測

○山本直樹¹、田村厚夫²、富永圭介^{1,2}

(¹神戸大学分子フォトサイエンス研究センター、²神戸大学大学院理学研究科)

Temperature and Hydration Dependence of Low-frequency Dynamics of a Protein studied by Terahertz Time-domain Spectroscopy

○Naoki Yamamoto¹, Atsuo Tamura², Keisuke Tominaga^{1,2}

(¹Molecular Photoscience Research Center and ²Graduate School of Science, Kobe University)

【序】タンパク質は生命活動を営む上で必要不可欠な分子である。タンパク質は常に溶媒である水の熱揺らぎにさらされながら機能していることから、熱揺らぎ程度の分子運動が機能発現と関連していると考えられる。過去の研究より、そのような分子運動は、テラヘルツ領域に観測されることが示唆されてきた¹。ここで、1 テラヘルツ (THz; 1 THz = 10¹² Hz) は約 33.3 cm⁻¹ の振動数に相当する。テラヘルツ時間領域分光法は、テラヘルツ領域の分子運動を観測するための適した手法であり、テラヘルツ波パルス波形を直接観測することにより、強度および位相の両方の情報を得ることが可能である。例えば、テラヘルツ分光における複素誘電率の虚部は全双極子モーメントの時間相関関数、 $\langle \mathbf{M}(0) \cdot \mathbf{M}(t) \rangle$ により以下の式で表される。

$$2n(\nu)\kappa(\nu) = \frac{\pi(1 - e^{-\beta h\nu})}{3\epsilon_0 hV} \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{-i2\pi\nu t} \langle \mathbf{M}(0) \cdot \mathbf{M}(t) \rangle$$

ここでは周波数、 $n(\nu)$ は屈折率、 $\kappa(\nu)$ は消衰係数、 $\beta = k_B T$ (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。これまで種々のタンパク質およびポリペプチドについて、温度および水和量をパラメータとした測定が行われてきた^{2,3}。その結果、水和することによって、約 200 K 付近で吸光係数などの物理量が乾燥状態と比較して飛躍的に増大する現象が観測されてきた。一方、それに寄与するスペクトル成分の解釈はまだ行われておらず、そのためにはより低周波数側のスペクトルを測定する必要があると示唆されてきた。そこで本研究では、典型的な小型球状タンパク質であるリゾチームを用いて、テラヘルツ領域の複素誘電率を温度および水和量依存的に測定するとともに、室温において、サブテラヘルツ領域のスペクトル、およびギガヘルツ領域のスペクトルを測定し、テラヘルツ領域のスペクトルと結合させることによって、テラヘルツ領域に寄与するスペクトル成分の同定を行った。

【実験】市販のニワトリ卵白リゾチームを室温で3時間透析したのち、凍結乾燥することで測定用の粉末試料を得た。測定の際は錠剤成型器を用いてこの粉末試料を加圧してペレット状にし、12時間真空乾燥したものを乾燥状態の試料とした。試料の水和は、ペレット状サンプルを飽和蒸気圧下の箱に任意時間静置することで制御した。ここで、水和量として、水和水の重さをタンパク質の重さで割った値である h を用いた。テラヘルツ時間領域分光計は、時間幅 10 フェムト秒程度のパルスレーザーを1対の光伝導アンテナに誘導し、一方をテラヘルツ波発生、もう一方を検出に用いた。0.3 ~ 1.8 THz (10 ~ 60 cm⁻¹) のスペクトルはダイポール型、0.1 ~ 0.3 THz (3.3 ~ 10 cm⁻¹) のスペクトルについてはスパイラル型の光伝導アンテナを用いることによってテラヘルツ波パルスを得た。また、0.5 ~ 20 GHz (0.017 ~ 0.067 cm⁻¹) の複素誘電率スペクトルは、Agilent 社のネットワークアナライザ E5070 を用いることにより取得した。

【結果と考察】図1にテラヘルツ時間領域分光法によって得られた複素誘電率スペクトルを示す。乾燥状態ではスペクトルは温度と共に線形的に増加する一方、水和状態では約 180 K 付近からスペクトル成分が非線形的に増加することが分かる。特に、低振動数側の増加が著しいことが見て取れる。図2に $h = 0.34$ の時の、室温における 20 GHz ~ 1.8 THz 領域での複素誘電率スペクトルを示す。GHz 領域に大きなスペクトル成分が存在することがわかり、過去の報告と照らし合わせると、水和水の回転緩和成分が大きく寄与していることが示唆される⁴。そこで、以下のモデル関数を用いてスペクトルのフィッティングを行った。

$$\epsilon^*(\nu) = -\frac{\sigma}{i2\pi\nu} + \sum_{j=1}^2 \frac{\Delta\epsilon_j}{1 - (i2\pi\nu\tau_j)^{\beta_j}} + \frac{A_\nu}{\nu_\nu^2 - \nu^2 - i\nu\gamma_\nu} + \epsilon_{\text{inf}}$$

ここで、右辺の第1項は電気伝導の効果(σ は定数)、第2項は2つの誘電緩和成分($\Delta\epsilon_j$, τ_j , β_j はそれぞれ強度、緩和時間、およびブロードニング因子を表す)、第3項はテラヘルツ領域の振動成分(A_ν , ν_ν , γ_ν はそれぞれ強度、中心周波数、および摩擦項を表す)、第4項は周波数無限大での定数項をそれぞれ表す。フィッティング結果は図2に重ね書きしている。この結果より、約5 GHz にピークを持つ誘電緩和成分が、テラヘルツ領域に顕著に侵入していることがわかり、高温領域ではこの誘電緩和成分を考慮に入れてスペクトル成分を解釈する必要が分かった。この結果を踏まえ、テラヘルツ領域の温度依存性スペクトルを、誘電緩和成分を考慮したモデル式でフィッティングし、時定数等の温度依存性を得た。その結果、約 220 K 以上では、誘電緩和の成分が顕著に侵入してくることが明らかになった。

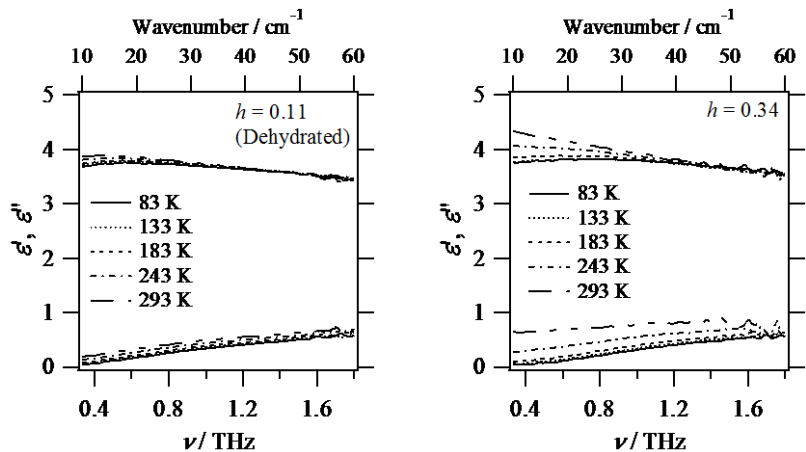


図1. テラヘルツ領域における温度依存性複素誘電率スペクトル左が乾燥状態、右が水和状態。各パネルで上部集団が実部、下部集団が虚部を表している。

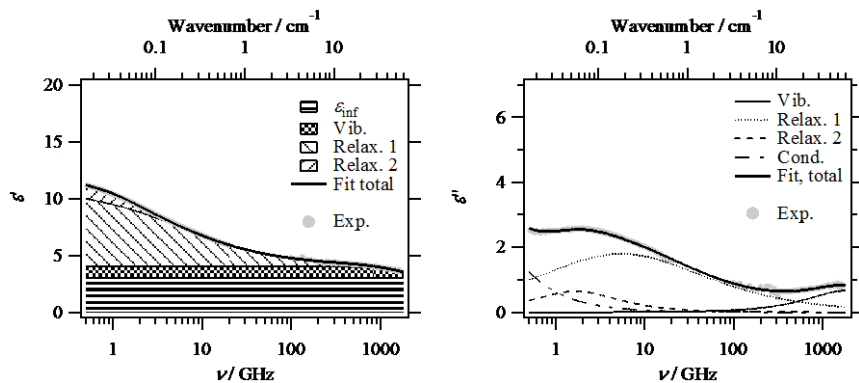


図2. $h = 0.34$, 293 Kにおいて、ネットワークアナライザおよびテラヘルツ時間領域分光計を用いて得られた複素誘電率スペクトルの実部(左)および虚部(右)。実験値(Exp.)は丸印で表している。フィッティング結果のうち、Relax. 1及び2の成分は、誘電緩和の第一及び第二成分を表している。実部は高周波数側からスペクトルを足し合わせる手法で描画している。

【引用文献】1. M. Levitt, *et al.*, *JMB* 181, 423-47 (1985)
 2. S. Kawaguchi, *et al.*, *PCCP* 12, 10255-10262 (2010).
 3. N. Yamamoto, *et al.*, *Soft Matter* 8, 1997-2006 (2012).
 4. S. Khodadadi, *et al.*, *JPC* 112, 14273-14280 (2008).