業績紹介：ペプチド鎖のアミドⅡモードの赤外強度にみられる２次構造依存性と水和効果の解析

鳥居 肇　（静岡大学・A01 公募研究代表者）

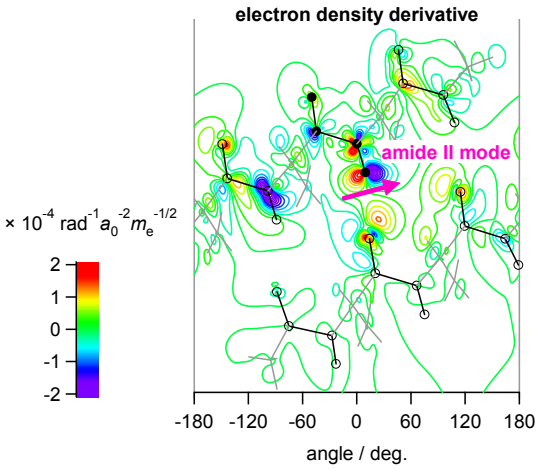
論文題目："Secondary Structure Dependence and Hydration Effect of the Infrared Intensity of the Amide II Mode of Peptide Chains"
著者：Hajime Torii* and Megumi Kawanaka
雑誌巻号：*J. Phys. Chem. B* **120**, 1624-1634 (2016).

アミド II モードは，ポリペプチドや蛋白質の繰返し単位であるペプチド基の特徴的な振動モードの１つであり，主として N–H 変角振動から成る。N–H 結合は水素結合供与基であるため，アミドⅡモードの振動数や赤外強度などは，ペプチド基の水和やペプチド鎖の２次構造に敏感であることが期待でき，実際にそのことを示唆する幾つかの実測例も存在する。しかし，アミド I・III モードと比較して，アミド II モードの性質に関する研究はあまり進んでおらず，さらに研究を進めることが，ペプチド鎖の構造・ダイナミクスの解析におけるアミド II モードの有用性を高めるために必要と考えられる。

本研究は，(1) C_5 構造のアミド II モードに見られる赤外強度増大には鎖長依存性が存在するか，(2) αヘリックス構造において，鎖内のペプチド基間水素結合はアミド II モードの赤外強度にどのように影響するか，(3) 水和ペプチド鎖において，水分子との水素結合はアミド II モードの赤外強度にどのように影響するか，という３点について，理論的解析を行ったものである。このうち (2) の点を解析するためには，鎖内のペプチド基間水素結合が存在する程度の十分な鎖長のペプチド鎖を解析対象とする必要があり，本研究では alanine hexapeptide-d_{26} [CD_3CO-($NHCDCD_3CO$-)$_5$ $NHCD_3$] までの鎖長のペプチド鎖を解析対象としている。(3) の関連では，水分子の角度位置が振動数と赤外強度を決める重要な因子であることを，アミド I モードを対象に最近明らかにしており（ニュースレター平成 27 年 4 月号参照），本研究では同種の解析をアミド II モードに対して行った。また，赤外強度は双極子微分（$\partial\boldsymbol{\mu}/\partial Q_{\mathrm{amII}}$，但し Q_{amII} はアミド II モードの振動座標）の２乗に比例する量であるため，系内の全ての荷電粒子の振舞いが関係する。本研究では電子の振舞いを，電子密度微分 [$\partial\rho^{(\mathrm{el})}(\boldsymbol{r})/\partial Q_{\mathrm{amII}}$] の形で解析した。特に，水素結合等の効果を検討するため，孤立ペプチド基の値を差し引いたもの $\delta(\partial\rho^{(\mathrm{el})}(\boldsymbol{r})/\partial Q_{\mathrm{amII}})$ [$\equiv (\partial\rho^{(\mathrm{el})}(\boldsymbol{r})/\partial Q_{\mathrm{amII}})_{\mathrm{entire_system}} - (\partial\rho^{(\mathrm{el})}(\boldsymbol{r})/\partial Q_{\mathrm{amII}})_{\mathrm{isolated}}$] を解析対象としている。

図に，αヘリックス構造をとる alanine hexa-peptide-d_{26} を対象に計算した電子密度微分を，２次元円筒プロットの形で示している。アミド II モード方向の変位（桃色矢印）によって，当該ペプチド基のみならず，隣接ペプチド基においても，電子密度の変化が誘起されていることがわかる。特に，水素結合相手の C=O 付近の電子密度変化が，双極子微分の打ち消し合い（赤外強度の減少）を引き起こしており，この形状（空間分布）から，静電的な分極によるものと考えられる。一方，C_5 構造のアミド II モードに見られる赤外強度増大は，複数のペプチド基に亘る電荷フラックスに由来することが，電子密度微分（図省略）の解析から分かる。水分子との水素結合の場合でも，角度位置によって，これらと同様の事象が起こる。

このように，詳細な理論的解析から，スペクトル上の特徴と構造の間の関係について，理解を深めることができる。さらに，系内分子のダイナミクスの効果を考慮に入れた解析が，今後望まれる。



図：αヘリックス構造をとるペプチド鎖におけるアミドⅡモード (Q_{amII}) に誘起される電子密度微分 [$\delta(\partial\rho^{(\mathrm{el})}(r,\varphi,Z)/\partial Q_{\mathrm{amII}})$] の２次元円筒プロット。鎖内水素結合の効果を明示するために，孤立ペプチド基における電子密度微分を差し引いている。

業績紹介：ヘモグロビンの N 末端が形成するサブユニット間相互作用はアロステリック転移速度に影響を及ぼす

水野 操　（阪大院理・A02 計画研究分担者）
石川 春人　（阪大院理・A02 計画研究分担者）
水谷 泰久　（阪大院理・A02 計画研究代表者）

論文題目："Effect of the N-terminal Residues on the Quaternary Dynamics of Human Adult Hemoglobin"
著者：Shanyan Chang, Misao Mizuno, Haruto Ishikawa, and Yasuhisa Mizutani
雑誌巻号：*Chem. Phys.* **31-37**, 469-470 (2016).

ヒトヘモグロビンは赤血球に含まれる酸素運搬体タンパク質で、αおよびβサブユニットが 2 つずつ会合した四量体構造をとっている。その酸素運搬に重要な性質は協同的酸素親和性であり、その発現機構の理解には、サブユニット間相互作用がどのようなものであるか、リガンドの脱着に伴ってそれらがどのように変化するかを明らかにすることが必要である。われわれは、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、N 末端残基が形成するサブユニット間相互作用が四次構造変化の速度に影響を及ぼすことを明らかにした。

本研究で用いたヒトヘモグロビン試料は、野生型と各サブユニットの N 末端残基がバリンからメチオニンに置換された変異体であり、ともに大腸菌内で発現したタンパク質である。比較のために、ヒト血液から精製したヘモグロビン試料もあわせて調べた。

時間分解共鳴ラマンスペクトルには、ヘム由来のラマンバンドが観測され、これらは時間とともに強度および波数が変化した。観測されたラマンバンドの中でわれわれは、ヘム鉄とそれに配位したヒスチジン残基間の伸縮振動［ν(Fe-His)］バンドに着目した。それは、このバンドの振動数がヘモグロビンの四次構造に敏感であるからである。振動数の時間変化を詳しく調べたところ、変異体と野生型いずれも 3 段階の指数関数的波数変化が観測された。このうち、1 段階目は三次構造変化に、2 段階目、3 段階目は四次構造変化に由来する。変異体では、野生型に比べ 3 段階目、すなわち四次構造の第二ステップの速度が 2.5 倍速くなることがわかった。一方、野生型とヒト血液由来のヘモグロビンとではこのような違いは観られなかった。これらの実験結果は、N 末端残基が形成するサブユニット間相互作用が四次構造転移に影響を及ぼすことを示している。サブユニット間相互作用における N 末端残基の重要性は、タンパク質構造化学研究のパイオニアである Max Perutz によっても指摘されていたが、それをリアルタイム観測したのはこの研究が初めてである。

N 末端残基の違いによるこの速度差は、実は偶然に発見されたものである。リボソーム中でポリペプチド鎖が生成する際、開始コドンによって N 末端にはメチオニン残基がいったん生じるが、ポリペプチド鎖の伸長過程でこれはアミノペプチダーゼによって切断される。しかし、非大腸菌由来のタンパク質が大腸菌中で発現する場合、N 末端のメチオニン残基は多くの場合切断されない。ヘモグロビンでは N 末端残基がサブユニット間相互作用に関わっていることが知られている。そこで、N 末端メチオニン残基の次のバリン残基を削り、メチオニンが残っていても鎖長が変わらないプラスミドが大腸菌発現にしばしば用いられる。われわれもこれまでの研究ではこのプラスミドを用いてきた。ただし、これは結果的には N 末端のバリン残基をメチオニン残基に置換した変異体を生成することになる。これまで、この置換はヘモグロビンの性質に大きな影響は与えないと考えられていたが、本研究の結果から四次構造変化の第二ステップに影響を与えることが明らかになった。実は当初われわれも影響は小さいと考えて、このプラスミドを用いて研究を開始した。しかし、大学院生 Shanyan Chang さんの丁寧な測定から野生型との明白な違いが見いだされた。なお、野生型ヘモグロビンの大腸菌中での発現には、メチオニンアミノペプチダーゼを共発現するプラスミドを用いている。

タンパク質の協同性は、構造変化、すなわち分子の柔らかさが機能を生む典型例である。構造変化と機能発現との関係を詳しく調べ、機能を生み出す分子の柔らかさを明らかにしていきたいと考えている。

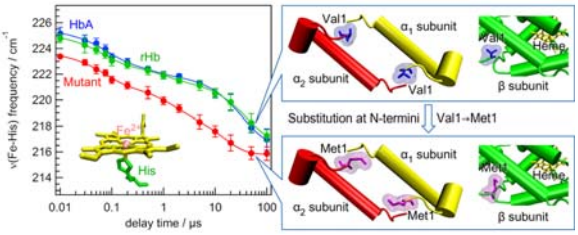


図 1.　タンパク質の高次構造変化を示すν(Fe-His)バンドの時間変化。N 末端残基がつくるサブユニット間相互作用が四次構造変化の速度に影響を及ぼすことを本研究は明らかにした。

第 14 回ワークショップ　開催報告

水野　操　（阪大院理・A02 計画研究分担者）

平成 28 年 3 月 1～2 日に、「柔らかな分子系」第 14 回ワークショップ「ダイナミクス観測からタンパク質の『柔らかさ』を観る」が、大阪府池田市にある不死王閣にて開催された。タンパク質は、幅広い時間および空間スケールで柔らかく動作する。しかし、単一の手法では、タンパク質が動作する姿をすべて明らかにはできない。そこで、本ワークショップでは、実験・理論の双方からのアプローチの模索をめざし、講演者（領域内 5 名、領域外 3 名）に、それぞれの研究手法の原理・利点に重点をおいて講演していただいた。

初日は、はじめに水野より、ワークショップの趣旨説明を行った。引き続き、水野が時間分解共鳴ラマン分光法をもちいた微生物型ロドプシンのタンパク質ダイナミクス研究に関する講演を行った。共鳴効果というユニークな性質をもつラマン分光法のタンパク質ダイナミクス観測に対する利点を紹介し、ピコ秒からミリ秒にわたるタンパク質が動作する過程について報告した。続いて、石井邦彦氏（理研）より、FRET をもちいた二次元蛍光相関分光法によるマイクロ秒領域でのタンパク質の構造揺らぎ観測に関する報告が行われた。石井氏らは、蛍光寿命の揺らぎの時間相関を計測し、平衡関係にある異なる状態間の分布数および交換速度を調べる手法を開発した。これにより、分子シミュレーションとの比較研究への期待が述べられた。休憩をはさみ、上村想太郎氏（東大・領域外）より、Zero-Mode Waveguides 法という次世代シークエンサー技術を応用したタンパク質翻訳過程の一分子蛍光計測についての報告がなされた。この方法では、直径および深さが 100 nm の小さな穴の中に分子一個を固定する。分子を小さな穴に入れることで、従来の全反射型顕微鏡法における背景光の問題をクリアし、生体環境の分子濃度を再現した一分子可視化の研究例が紹介された。引き続き、飯野亮太氏（分子研）より、金ナノ粒子をプローブとした新しいタンパク質一分子計測法が紹介された。金ナノプローブはタンパク質の運動に影響を与えないことから、従来法よりも格段に早い時間分解能で可視化できることが示された。これにより分子モーター・キネシンの片足の詳細な動きが報告された（当日に論文がアクセプトされたとのことで喜ばしいタイミングであった）。初日最後は、菅瀬謙治氏（京大・領域外）により、NMR 緩和分散法による生体高分子の動的構造解析が報告された。緩和分散法の原理がわかりやすく紹介され、定常的にはポピュレーションが小さい複合体形成中間体の結合および解離速度、解離定数を決定できることが示された。

合宿形式のワークショップであったため、各自が夜の研究交流会にて議論を深めた。

2 日目は、秋田総理氏（岡山大・領域外）より、X 線自由電子レーザーをもちいた無損傷結晶構造解析の報告からはじまった。フェムト秒パルス X 線光源をもちいれば、X 線損傷前の結晶構造データが取得できるが、そのためには大型結晶が必要である。質の良い大型結晶から得られた光化学系 II 複合体 S_1 状態の詳細な構造が示された。つづいて、吉田紀生氏（九大）より、3D−RISM 理論をレセプタータンパク質へのリガンド分子の分子認識にもちいた研究例が報告された。吉田氏の方法では、レセプター周辺でのリガンドの分布確率が求められる。また、さらに生体分子の疎水表面や溶媒和配向があらわになる最新の XMOZ 理論への取り組みも紹介された。さらに、高田彰二氏（京大）から、「分子の『柔らかさ』とは何か？」という演題での講演が行われた。高田氏は、分子の「柔らかさ」が変形の時間スケールによって変わることに着目し、「柔らかさ」の定義に粘弾性率をもちいた議論を試みた。本講演は演題変更により行われたが、本領域の本質を考えさせられるたいへん印象的なものであった。最後に、総括班の水谷泰久氏（阪大）より、本ワークショップの趣旨は、タンパク質だけでなく一般的な分子の性質として取り組むべき議題であるという閉会の辞により、ワークショップは締めくくられた。

最後に、講演者はじめ参加者の方々、および開催に対してご助力をいただいた領域事務局の方々に深く感謝申し上げたい。

第 15 回ワークショップ「先端的レーザー技術を用いた分子科学の展開」（日本分光学会先端レーザー分光部会共催）　開催報告

水瀬 賢太（東工大院理工・A02 公募研究代表者）

平成 28 年 3 月 10 日（木）、東京工業大学大岡山キャンパスにて第 15 回ワークショップ「先端的レーザー技術を用いた分子科学の展開」が、日本分光学会先端レーザー分光部会「第 11 回若手研究者による先端的レーザー分光シンポジウム」とのジョイントワークショップとして開催された。

レーザーは物質科学研究において広く使われる強力なツールであるが、その利用研究は細分化、専門化が進んでいる面もある。本ワークショップでは、それぞれの分野における研究の現場で実際にレーザーを駆使している若手研究者に、「専門の違う学部生をも惹きつける」講演を依頼し、深い相互理解を促すこと、そしてレーザー分子科学の広く深い発展につなげることを目的とした。講演者の分野としては、気・液・固相＋表面にわたり、波長ではテラヘルツ～深紫外、時間領域では連続光～数フェムト秒パルスをカバーするものであった。

当日ははじめに、水瀬より開催趣旨を説明したのち、領域内 5 名、領域外 5 名の若手研究者に講演いただいた。以下に講演の概要を示す。

田原進也氏（理研・東工大院）は D3 である氏の博士論文テーマ、光反応構造ダイナミクスの誘導ラマン分光研究について詳説いただいた。続いて八木令於名氏（北里大院）には気相クラスターの冷却過程を積極的に捉える分光研究を紹介いただいた。白井英登氏（分子研）には気体媒質中でのチャープパルス上方置換過程を用いて構築された画期的な赤外分光システムを、非線形光学の基礎から解説いただいた。広く分子科学の利用しうる光源・計測法であることから、昼休みにも大きく食い込む議論の盛り上がりであった。午後のセッションでは、田中駿介氏（京大）がグラフェンプラズモンに関して、アルカリ金属挿入過程による興味深い現象を報告した。川﨑博之氏（東工大）は、パラ水素固体中におけるフッ化メチルーオルト水素クラスターの赤外量子カスケードレーザーによる励起過程の研究報告を行った。奥田祥子氏（慶應大）には、周波数コムを利用した高精度高分解能分光による球対称分子の振動誘起双極子モーメントの測定を紹介いただいた。河野七瀬氏（原子力機構）にはテラヘルツ光パルスの電場波形測定によるシリコン基板中のキャリアダイナミクスの研究を説明いただいた。研究成果はもとより、テラヘルツの基礎から、プラズマ反射といった進んだトピックスまでを詳しく解説いただき、参加した学部生にも好評であった。輪胡宏学氏（東工大）は気相イオンの精密分光に最適なイオントラップの開発とその応用について、豊富な結果とともに発表いただいた。沖野隼之介氏（学習院大）には、共役π系における励起の局在という基礎的かつ重要な問題について、系統的な分光研究を紹介いただいた。近藤正人氏（筑波大）には、氏が大阪大学水谷研（A02 班）にて行ったヘムタンパク質のエネルギーフローに関する研究を発表いただいた。非専門家の若手向けで話してほしいというリクエストに 120%応えつつも、最先端の概念の共有までしていただいた講演は、シンポジウムの締めとして最高の盛り上がりをみせた。

講演終了後、意見交換会では軽食をとりつつ、参加者同士の交流を深めた。途中、本領域担当の文部科学省学術調査官、小島磨准教授（神戸大）より領域研究、若手研究についてコメントいただき、参加者の視野を広げるとともに意識を高めることに一役買っていただいた。

シンポジウムには大学・企業の研究者や技術者、学生、合わせて 76 名の参加があった。分光学会単体の例年のシンポジウムよりも多くの方に参加いただけたこと、初参加の方が多かったこと、そして学部生が 2 割ほどを占めていたことが特徴であった。小さな試みの一つとして、コーヒーブレイクを長めに、こまめに設置し、講演への集中力を高めるとともに、講演の場以外での議論・交流の機会を多くもうけた。学部生を含めた若き研究者の育成、参加者間のネットワーク形成、問題意識の共有につながったものと考えている。

最後に、ワークショップをサポートいただいた日本分光学会と「柔らかな分子系」、そして開催、進行をお手伝いいただいた、東工大大島研に配属予定段階のスタッフ、学生諸君、そして通りすがりで会場の片付けまでご助力いただいた参加者の方々に深く感謝する。