業績紹介：緑色蛍光タンパク質 GFP の励起状態プロトン移動における発色団のコヒーレントな低波数振動の寄与について

藤澤 知績　（理研・A02 計画研究協力者）
倉持　光　（理研・A02 計画研究協力者）
細井 晴子　（東邦大理・A02 班友）
竹内 佐年　（理研・A02 計画研究分担者）
田原 太平　（理研・A02 計画研究代表者）

論文題目："Role of Coherent Low-Frequency Motion in Excited-State Proton Transfer of Green Fluorescent Protein Studied by Time-Resolved Impulsive Stimulated Raman Spectroscopy"
著者：Tomotsumi Fujisawa, Hikaru Kuramochi, Haruko Hosoi, Satoshi Takeuchi, Tahei Tahara
雑誌巻号：*J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3942-3945 (2016).

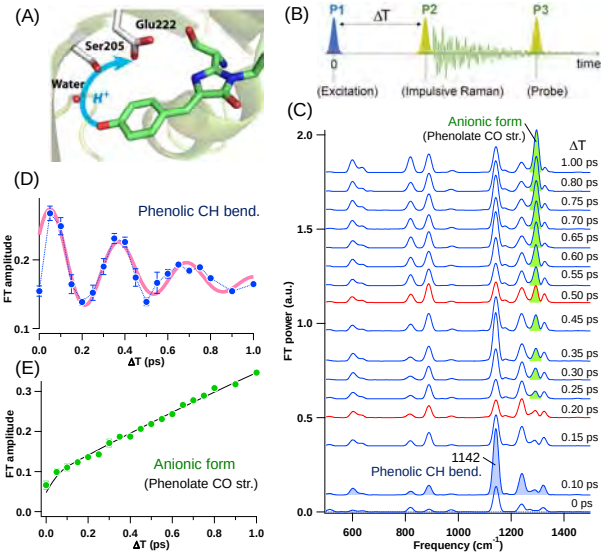
今や生体イメージングに必須となった発光タンパク質の原点は、1962 年に発見されたオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 GFP である。GFP の発色団は自己触媒的に形成された p-hydroxybenzylideneimidazolinone であり、この発色団はタンパク質の中で無輻射失活が抑えられて特異的に明るい発光を示す。大きなストークスシフトを伴う GFP の緑色蛍光の原因が、タンパク質内の水素結合を経由した励起状態プロトン移動であり、発色団のプロトンが内部水と Ser205 を経て Glu222 に移るプロセスが実験的に明らかにされたのは 2000 年代に入ってからのことである（図 A）。

この励起状態プロトン移動に関して、近年 Fang らは「発色団の低波数振動の重要性」を提案して話題をよんだ[1]。彼らはフェムト秒誘導ラマン分光法を用いて、GFP の発色団に非調和性の高い低波数振動モードが存在し、光励起直後のそのコヒーレントな低波数振動が発色団近傍の水素結合を変調してプロトン移動を促進するというメカニズムを主張した。しかし、その真偽は実験的な困難さから明らかにされていなかった。そこで、我々は独自の時間分解インパルシブラマン分光法(TR-ISRS)を用いて、その実験的検証に取組んだ。

TR-ISRS は、3 つのフェムト秒パルス（P1, P2, P3）を用いて、励起状態の振動モードを時間領域で観測する手法である（図 B）。まず GFP を約 110 fs の時間幅の P1 パルス（~390 nm）によって光励起し、任意の遅延時刻ΔT 後に約 7 fs の極短 P2 パルス(520-700 nm)によって励起状態に振動コヒーレンスを誘起する。この振動コヒーレンスによる過渡吸収信号の変調成分を P3 パルスによってプローブし、得られた信号のフーリエ変換から、各遅延時刻ΔT における GFP の励起状態の振動スペクトルを得た（図 C）。

光励起直後のスペクトルには、中性型の発色団の励起状態に由来する複数の振動バンドが観測されている。中でも特徴的な時間変化を示しているのは 1142 cm^{-1} の Phenol CH 変角振動である。この振動モードの強度は約 105 cm^{-1} の周波数で振動しており、これは光励起によって生じた発色団のコヒーレントな低波数振動と Phenol CH 変角振動の間に非調和振動結合が存在することを示している（図 D）。

Fang らが提案したように、この低波数振動がプロトン移動を促進する場合には、その反応速度が周波数 105 cm^{-1} で変調を受けるはずである。しかし、励起状態プロトン移動によって生成するアニオン型発色団の Phenolate CO 伸縮モード（~1300 cm^{-1}）はほぼ単調な増加を示した（図 E）。この結果から、我々は観測された単一のコヒーレントな低波数振動が励起状態プロトン移動を誘起しているわけではなく、室温においては主に発色団周りの他の熱的な運動が反応の進行に寄与していると結論した。



図(A) GFP の励起状態プロトン移動 (B) TR-ISRS で用いる超短パルス列 (C) TR-ISRS から得られた GFP 励起状態の時間分解振動スペクトル (D) Phenol CH 変角振動および(E)プロトン移動により生じるアニオン型発色団の振動バンドの強度の時間変化

文献[1] C. Fang et al., *Nature*, **462**, 200-205 (2009).

業績紹介：フォトクロミックな蛍光タンパク質 Dronpa の発色団決定

水野 操　　（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："Chromophore Structure of Photochromic Fluorescent Protein Dronpa: Acid-base Equilibrium of Two *Cis* Configurations"
著者：Asuka Higashino, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani
雑誌巻号：*J. Phys. Chem. B* **120**, 3353–3359 (2016).

蛍光タンパク質 Dronpa は、蛍光を発する明状態 B state と発しない暗状態 A_2 state との間でフォトクロミズムを示す。また、これらに加えて無蛍光性の A_1 state がある。A_1 state は中性条件で B state と共にわずかに存在し、酸性条件で存在比が増すことが報告されている。各状態での発色団の幾何構造は、B state ではシス形、A_2 state ではトランス形であることがすでにわかっている。しかし、A_1 state の発色団の幾何構造や、発色団のフェノール部分のプロトン化状態については、推測が行われているのみで、構造決定には至っていない。光変換機構を明らかにするためには、溶液試料での詳細な構造解析が必要である。共鳴ラマン分光法はタンパク質中の発色団構造を調べるのに適している。しかし、Dronpa は強い蛍光を発し、可視共鳴ラマンスペクトルの測定が困難であるため、これまでにスペクトルの報告例はなかった。

本研究でわれわれは、共鳴ラマン分光法による Dronpa 発色団の構造決定を行うために、強い蛍光バックグラウンドを除去し、Dronpa 発色団の共鳴ラマンスペクトルの観測を試みた。観測されたスペクトルから、各状態の発色団および周辺アミノ酸残基との相互作用に関する pH 依存性について考察した。

波長 400 nm の励起光で Dronpa の A_1 state と A_2 state、および比較のために蛍光タンパク質 GFP の共鳴ラマンスペクトルを測定した。得られたラマンスペクトルは、強い蛍光のバックグラウンドとともに観測されたが、そのままでも数本のラマンバンドの存在が確認できた。蛍光の寄与を除いたスペクトルには、発色団構造の違いを反映する差が観測された。特に、A_2 state においてのみ 1145 cm^{-1} にバンドが現れた。GFP 発色団のモデル化合物に関する研究では、トランス形のラマンスペクトルでのみ 1125 cm^{-1} 付近にバンドが現れることが報告されている。これらの結果は、A_1 state がシス形の発色団を持つという推定を裏付けた。さらに、Dronpa 中の発色団についても、1145 cm^{-1} のバンドがそのシス形とトランス形を区別するマーカーバンドとして利用できることが明らかになった。また、軽水緩衝液から重水緩衝液に置換することによって、1560 cm^{-1} 付近に現れる C=N 伸縮振動バンドが低波数シフトした。これにより、A_1 state と A_2 state が共に発色団中に交換しうるプロトンをもつことがわかった。

B state の前期共鳴ラマンスペクトルは、その発色団がシス形であることを示した。また、脱プロトン化した発色団を持つ GFP 変異体との比較から、B state の発色団が脱プロトン化していることが明らかになった。

A_1 state と B state との酸塩基平衡を調べるために、吸収、蛍光、および共鳴ラマンスペクトルの pH 依存性を調べた。pH 4 から pH 10 において、A_1 state のスペクトル変化は一段階で起こることがわかり、pK_a が 5.2±0.3 と求められた。GFP の吸収スペクトルは、pH 変化による明確な遷移を示さないことが知られており、Dronpa は GFP と異なる特徴をもつ。これは、発色団周辺の水素結合ネットワークが Dronpa と GFP では異なることに由来すると考えられる。プロトン化している野生型 GFP と比較して、中性で脱プロトン化していることが知られている GFP 変異体（S65T）では、発色団周辺の水素結合ネットワークが変化している。この GFP 変異体と同様に、Dronpa においても野生型 GFP とは異なる水素結合ネットワークが形成されており、これが Dronpa の pK_a が低く、脱プロトン化した発色団が安定である主な原因であると考えられる。脱プロトン化した GFP 変異体の pK_a が 6.0 と、Dronpa の値と比較的近いこともこの解釈を裏付けている。

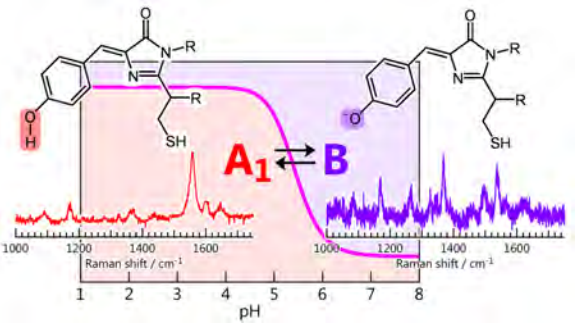


図 1.　Dronpa 発色団の酸－塩基平衡。共鳴ラマンスペクトルから、発色団構造の幾何構造、プロトン化状態が決定できた。

業績紹介：中性型フラビンラジカルがタンパク質中で安定に存在する要因を特定

岩田 達也　（名工大・A03 連携研究者）
神取 秀樹　（名工大・A03 計画研究代表者）

論文題目："Single Hydrogen Bond Donation from Flavin N_5 to Proximal Asparagine Ensures FAD Reduction in DNA Photolyase"
著者：I M. Mahaputra Wijaya, Tatiana Domratcheva, Tatsuya Iwata, Elizabeth D. Getzoff, and Hideki Kandori
雑誌巻号：*J. Am. Chem. Soc.* **138(13)**, 4368–4376 (2016).

フラビンはビタミン B2 及びその誘導体として知られる黄色を呈した（図 1、写真左）補酵素である。フラビンはイソアロキサジン環骨格に糖アルコールであるリビトールが結合している（図 1 上、リビトールは R で示した）。イソアロキサジン環は様々な反応を示すことから、多様な機能を持ったフラビン結合タンパク質が存在する [1]。特にフラビンは電子受容体（最大二電子と二個のプロトンを受容する）であり、酸化還元酵素における電子伝達体として機能する。

タンパク質に結合したフラビンでは一電子還元型の中性セミキノンラジカル（セミキノン型）が安定に観測されることがある（図 1 黒）が、遊離のフラビンではセミキノン型は観測されない。40 年以上前に N5 位のプロトン化により形成される N5–H 基（図 1 上、中央）が強い水素結合を形成することによりセミキノン状態が安定するというモデルが提案された [2]。しかし、適当な計測系がなく実証されるには至らなかった。

今回の研究において、安定なセミキノン型を形成する DNA 光回復酵素というタンパク質を対象に研究を行い、フーリエ変換赤外（FTIR）分光計測と計算科学を組み合わせることでセミキノン型の N5–H 基が強い水素結合を形成していることを明らかにした。

DNA 光回復酵素は紫外線損傷 DNA を近紫外光／青色光を用いて修復する酵素である。DNA 光回復酵素は FAD が完全還元型（図 1 上、右）のときに DNA 修復能をもつ。酸化型やセミキノン型は酵素活性を示さない休止状態であるが、還元剤の存在下で光依存的に還元型へと還元される。セミキノン型の吸収波長は 400–700 nm の広い範囲に及び、セミキノン型が安定に存在できることは、幅広い波長の光を利用して完全還元型へ変化できるという点で重要だと考えられる。

DNA 光回復酵素の N5 位の近傍にはアスパラギンが存在する。このアスパラギン側鎖と FAD との水素結合構造を明らかにする目的で、アスパラギンを同位体標識した DNA 光回復酵素を調製し、光還元反応に伴うアスパラギンの C=O 基の水素結合環境を FTIR 分光法で観測した。その結果、C=O 伸縮振動はセミキノン型で最も低波数に現れ、その次に酸化型、還元型の順で高波数に現れた。このことは、アスパラギンの C=O 基の水素結合がセミキノン型で最も強くなることを示している。これを計算科学により構造最適化と振動数計算を行ったところ、アスパラギン側鎖の C=O 基がセミキノン型 FAD の N5–H 基と水素結合を形成している構造がエネルギー的に安定であり、その際の振動数の計算結果が FTIR スペクトルをよく再現した。

これらの結果より、Hemmerich らの提案 [2]が DNA 光回復酵素において肯定的に示された。他のフラビン酵素ではどうだろうか？ 酸化還元酵素フラボドキシンの結晶構造では、セミキノン型の N5–H 基と近傍の C=O 基の距離が酸化型と比べて短くなっていた [3]。このことは、セミキノン型で N5–H 基は強い水素結合を形成していること、また、これがセミキノン型安定化の一般的な機構であることを強く示唆する結果と言える。

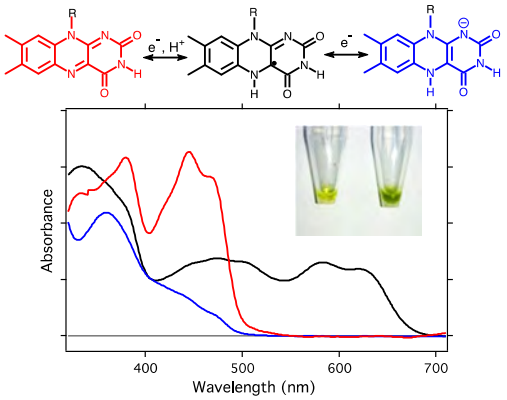


図 1. フラビンの各酸化還元状態の構造式（上）及び DNA 光回復酵素の吸収スペクトル（下）。赤は酸化型、黒はセミキノン型、青は還元型を示す。スペクトル右上の挿入図は酸化型（左）とセミキノン型（右）の DNA 光回復酵素の写真。

引用文献

[1] P. Macheroux, *et al.*, *FEBS J.* **278**, 2625–2634 (2011).
[2] P. Hemmerich, *et al.*, *FEBS Lett.* **8**, 69–83 (1970).
[3] M. L. Ludwig, *et al.*, *Biochemistry* **36**, 1259–1280 (1997).

名古屋工業大学・井上圭一准教授が「日本化学会･平成 27 年度進歩賞」を受賞

神取 秀樹（名工大・A03 計画研究代表者）

A03 計画班神取グループ（名工大）連携研究者の井上圭一准教授が、日本化学会・平成 27 年度進歩賞を受賞しました。本賞は、化学の基礎または応用に関する優秀な研究業績を収めたと認められる 37 歳未満の若手研究者を対象としたもので、井上さんは審査の結果これまでの研究の中で高い成果を達成したことが認められ今回の受賞に至りました。

本受賞の業績題目は「光受容膜タンパク質ロドプシンの光化学の基礎研究と応用」で、これまで井上さんが行ってきた、微生物の持つ光受容膜タンパク質である「微生物型ロドプシン」についての物理化学研究に対するものです。

井上さんはこれまでに光で機能を発現する様々な微生物型ロドプシンについて、時間分解分光法や振動分光法を用い、光反応中間体のダイナミクスや分子構造を詳細に調べ、そのメカニズムの解明に取り組んでこられました。その端緒となった研究が、古細菌が青色光から逃げる「負の走光性」を示すときに光センサーとして働くセンサリーロドプシンⅡ（SRII）とトランスデューサータンパク質（HtrII）との複合体です。井上さんは大学院生の頃、京都大学・寺嶋正秀教授のもとで、過渡回折格子法を用い、光反応に伴う屈折率変化を測定することで、信号伝達時に起こるタンパク質の構造変化の観測に取り組みました。その結果 SRII-HtrII 複合体が光活性化状態になると HtrII の α ヘリックス構造が大きく変化し、複合体の拡散定数が大きく減少することを見出しました。この構造変化は細胞内への信号伝達時に、必須のものと考えられており、生物学的に重要な信号伝達の過程を分光学的に初めて捉えたものとして評価されました[1]。

一方で SRII-HtrII 以外のロドプシンについても、京都大在学中から幅広く研究を展開され、博士号取得後に特任助教として赴任した東京工業大学・藤井正明教授（A02 班）の研究室や、現在の名古屋工業大学・神取研究室においても、多様な種類のロドプシンの機能発現メカニズムについて数多くの知見を報告されました。その対象には H^+ポンプや Cl^-ポンプ、遺伝子制御型、進化中間型、動物型などが網羅され、これらの機能の違いが、全トランスレチナールが結合した 7 回膜貫通型の共通構造を基盤に、どの様にして生み出されるのかについて極めて詳細に研究を行われました。

そして近年ではこれまで自然界に存在しないと考えられていた光駆動 Na^+ポンプを発見し、ロドプシン分野に驚きを与えました[2]。そのメカニズムについても、過渡吸収法や赤外分光法を用いることで、反応と構造的観点から詳細に明らかにし、さらに東大・濡木 理教授、加藤英明博士らとの共同研究では Na^+ポンプの X 線結晶構造を明らかにし、Na^+輸送の鍵となる構造変化過程の解明に成功しました[3, 4]。その上で、得られたモデルをもとに論理的なアミノ酸変異導入によって、K^+や Cs^+を輸送するロドプシンの創成にも成功し、オプトジェネティクス分野への応用も期待されています[3, 5]。

本賞はこれらの業績を賞してのものであり、授賞式は日本化学会第 96 春季年会開催中の平成 28 年 3 月 26 日に同志社大学にて執り行われ、榊原定征日本化学会会長より功績を讃える盾が授与されました。現在、微生物型ロドプシンファミリーにはメタゲノム研究の発展により、5,000 種類以上の分子があると言われ、正に未開拓の沃野が大きく広がっています。井上さんには今回の受賞を励みに、これまでに培った技術と物理化学者としての視点を駆使して、それらのメカニズムを明らかにし、さらなる新規分子の作製へと果敢に挑んでいってもらいたいと思います。そしてさらに自身の研究を発展させ、ロドプシン分野を代表する研究者となる様、今後益々の活躍を期待します。

[1] Inoue, K., et al. *Biophys. J.* (2004), **87**, 2587.
[2] Inoue, K., et al. *Nat. Commun.* (2013), **4**, 1678.
[3] Kato, H. E., et al. *Nature* (2015), **521**, 48.
[4] Inoue, K., et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2015), **54**, 11536.
[5] Konno, M., et al. *J. Phys. Chem. Lett.* (2016), **7**, 51.

※ 私が世話人を務めた複雑系シンポジウムと重なってしまったため、受賞講演を聞けなかったのが残念でした。

写真：授賞式の様子。榊原定征日本化学会会長と共に

名古屋工業大学・井上圭一准教授が 26th IUPAC International Symposium on Photochemistry で「Awards for excellent presentations」を受賞

神取 秀樹（名工大・A03 計画研究代表者）

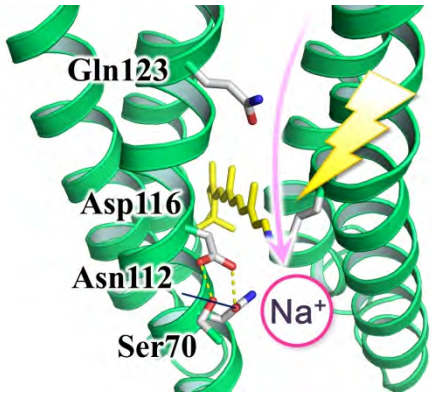
A03 計画班神取グループ（名工大）連携研究者の井上圭一准教授が、26th IUPAC International Symposium on Photochemistry で Awards for excellent presentations を受賞しました。IUPAC International Symposium on Photochemistry は光化学に関連する化学、物理、生物、医薬、材料科学などの幅広い分野の研究を対象としたシンポジウムで、1964 年より隔年で開催され、今年は去る 4 月 3 日～8 日に大阪市の中央公会堂（実行委員長：大阪大学・真嶋哲朗教授）において第 26 回シンポジウムが開催されました。今回井上さんが受賞された“Awards for excellent presentations: Young researcher oral presentation awards”は本シンポジウムにおいて口頭発表を行った特に若手の研究者による 37 件の発表を対象としたもので、審査の結果、井上さんの行った研究内容が、特に光生物学的な観点から重要な知見を与えるものとして今回の受賞に選ばれました。

井上さんの行った研究の題目は“Spectroscopic and structural studies on light-driven sodium pump rhodopsin”で、光でナトリウムイオン（Na^+）を一方向に能動輸送する光受容タンパク質である Na^+ポンプ型ロドプシンの輸送メカニズムについて調べたものです。Na^+ポンプ型ロドプシンは主に海洋性の細菌の細胞膜に存在し、光のエネルギーを用いて細胞内から細胞外側へNa^+イオンを汲み出します。井上さんは 2013 年に、海洋性細菌である *Krokinobacter eikastus* の持つロドプシン（KR2）が Na^+ポンプ機能を持つことを明らかにしました[1]。KR2 の発見はそれまで不可能と考えられていた H^+以外のカチオンを能動輸送する初めてのロドプシンとして、驚きを持って世界に受け入れられました。

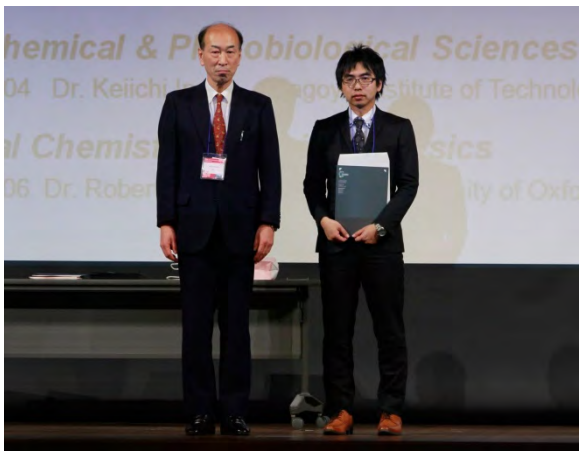
しかし発見当初はどの様にして KR2 が Na^+の輸送を行っているのか、不明な点が多く存在しましたが、井上さんは、その機能発現メカニズムを過渡吸収測定や全反射フーリエ変換赤外分光によって調べ、Na^+の取り込み過程や、Na^+の結合サイトを明らかにしました[1]。そしてさらに昨年、東大・濡木 理教授、加藤英明博士らとの KR2 の結晶構造と機能についての共同研究や[2]、変異体に対する分光研究によって[3]、Na^+がどのようにしてレチナールのプロトン化 Schiff 塩基の正電荷を乗り越えて輸送されるかという NaR 最大の謎の解明に成功しました。そして今回の発表ではそれら一連の研究について講演を行い、その独自性と光生物学的な重要性が高く評価され、受賞に至りました。

授賞式は平成 28 年 4 月 8 日に、シンポジウムの一番最後に執り行われ、本シンポジウムの実行委員長である大阪大学・真嶋哲朗教授より功績を讃える賞状が授与されました。KR2 は Na^+だけでなく、環境の変化やわずかなアミノ酸変化により、H^+や K^+、Rb^+、Cs^+などを輸送することが明らかになっており、その機能には高度な柔らかさが存在しています。今後は本領域内において、Na^+ポンプの機能の柔軟さを生み出すメカニズムの解明が成されることが大いに期待されます。

[1] Inoue, K., et al. *Nat. Commun.* (2013), **4**, 1678.
[2] Kato, H. E., et al. *Nature* (2015), **521**, 48.
[3] Inoue, K., et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2015), **54**, 11536.



今回の研究で明らかになった KR2 の
イオン輸送メカニズム



写真：授賞式の様子。真嶋哲朗実行委員長と共に

国際会議 ACUP 2016 参加報告

近藤 正人　（筑波大数理・A02 石橋グループ・助教 研究協力者）

2016 年 2 月 22 日から 24 日までの日程で、フィリピン大学ディリマン校物理学研究所にて開催された国際会議 ACUP2016 に出席し、招待講演を行った。

ACUP 国際会議は、超高速現象に関してアジア諸国の研究者間で行われる国際会議（Asian Conference on Ultrafast Phenomena）である。超高速光学の最新の進展状況や、その科学や工学への応用に関する議論の場であり、今回で 9 回目の開催となる。3 日間で 23 件の招待講演、および 18 件のポスター発表が行われた。私は、「Vibrational energy flow in hemeprotein monitored by time-resolved anti-Stokes ultraviolet resonance Raman spectroscopy」という題目で研究発表を行った。この内容は、昨年 10 月まで在籍していた阪大水谷グループ（A02 計画班）で博士研究員として行った研究の成果である。

今回は、招待講演ということもあり、30 分程度の講演時間を設けて頂いた。そのため基本的なことから詳細までを講演することができた。質疑の時間のみならずコーヒーブレイクの時間においても、多くの質問と意見を頂いた。私が発表で述べた結論の一つは、“タンパク質という媒体の中で、振動エネルギーは原子接触を通じて伝達する”というものであった。熱拡散という描像や、低振動モードを介した伝達機構など、タンパク質内のエネルギー伝達機構には多くの捉え方がある。私の研究の結論がこれらの捉え方とどのように関わりがあるのかに関して、議論できたことがとても印象に残っている。本会議は、私の慣れ親しんだ分子科学分野の研究者だけでなく、物性物理学分野の研究者も多く参加されていた。そのため、普段とは違う視点からの意見も聞くことができた。また、少し離れた分野の研究者にとって、自分の研究の分かりにくい点がどこかについて改めて知ることができたようにも思う。私が本会議に出席したのは今回が初めてであったが、会議中に、国外における似た分野の研究者と交流できたのは非常に良い機会であった。

招待講演を行ったのは、私にとって今回が初めての機会であった。私は国際会議での口頭講演の経験も少ないため、発表前は相当に緊張していた。そのため、講演後はやや安堵したことを覚えている。幸運なことに（？）、私は二番目の講演者であったため、その後の講演を存分に楽しむことができた。特に、物性物理学分野の研究者の講演は、普段聞くことができないような内容であった。理解が追いつかない点も多々あったが新鮮味があり、とても楽しめた。

最後にフィリピンという場所についての感想を述べたい。私がフィリピンを訪れたのは今回が初めてであった。フィリピン大学の先生方や学生の皆様のおもてなしはとても厚く、食べきれない量の食事、飲みきれない量の水、そして多くの親切を頂いた。とても感謝している。食事で印象に残っているのは、炒飯である。フィリピンの米との相性がよく、朝食にも関わらず食べ過ぎてしまった。帰国後少々の間は、母国の食事がやや物足りなく感じ、フィリピンの食事が恋しくなったことを覚えている。（もちろん、すぐに慣れ親しんだ食事に好みが戻ったが。）また、渡航の際、日本は冬季であった。フィリピンの温暖な気候のおかげで、リフレッシュできたようにも思う。以上のように、本渡航は、私にとって有意義で、研究意欲を多く刺激される機会であった。

講演時の様子について