

解 説

タンパク質分子における“熱”エネルギーの散逸過程

水野 操, 水谷 泰久
大阪大学大学院理学研究科

(受取日: 2013年8月23日, 受理日: 2013年9月13日)

Dissipation Processes of “Heat” Energy in Protein Molecules

Misao Mizuno and Yasuhisa Mizutani
Graduate School of Science, Osaka University

(Received Aug. 23, 2013, Accepted Sep. 13, 2013)

Vibrational energy flow in heme proteins has been examined by picosecond time-resolved anti-Stokes resonance Raman spectroscopy. By taking advantage of the extremely short nonradiative excited state lifetime of heme in the protein (\ll ps), excess vibrational energy of $20000\text{--}25000\text{ cm}^{-1}$ was optically deposited selectively at the heme site. Subsequent energy relaxation in the protein moiety was investigated by monitoring the anti-Stokes Raman intensities of heme and tryptophan residues. Our results demonstrate that the present technique is a powerful tool for studying the vibrational energy flow in proteins.

Keywords: vibrational energy relaxation, time-resolved resonance Raman spectroscopy, anti-Stokes Raman scattering, heme protein



水野 操
Misao Mizuno
E-mail: misao@chem.sci.osaka-u.ac.jp



水谷 泰久
Yasuhisa Mizutani
E-mail: mztm@chem.sci.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

巨視的には、エネルギーの散逸はフーリエの熱伝導の法則で記述される。では、系の空間スケールを原子の大きさまで小さくするとエネルギー散逸はどのようにみえるのだろうか。そんな素朴な疑問から本稿で述べるわれわれの研究はスタートした。原子の空間スケールでは、フーリエの法則で仮定されているような媒質の連続体近似は成り立たない。さらに、そのような統計的分布と異なる過渡的なエネルギー分布を熱と呼ぶことも適切ではないであろう。本稿のタイトルに引用符を付けて熱という語を用いたのはそのためである。

分子ごとに持つエネルギーが統計的分布に従わない場合、温度を定義することはできない。しかし、次のように拡張した温度の考え方がある。仮にある分子が周囲の分子に比べ統計的分布に比べ過剰にエネルギーを持つとすると、そのエネルギーの多くは振動自由度に含まれる。等重率の仮定のもとで、分子が多くの振動自由度を持つ場合（つまり大きな分子の場合）、かつ過剰なエネルギーが大きな場合は、各振動モードのエネルギー分布はボルツマン分布に従う。これは状態密度が非常に密になるためである。このような場合、分子内の振動エネルギー分布は高“温”に相当するパラメーターによって表現されるボルツマン分布を示す。このような“温度”は内部温度と呼ばれる。^{1,2)} この点を念頭に置き、本稿では“熱”エネルギーの散逸過程について述べることにする。

本稿で扱う時間・空間スケールはともに、熱という概念が成立するにはきわめて小さい。しかし、熱を専門として研究しておられる本誌の読者諸氏に興味を持っていただけるよう、本稿のタイトルには引用符を付けつつ敢えて熱という語を用いた。本稿によって、タンパク質内のエネルギーの流れに興味をもっていただければ幸いである。

2. エネルギー散逸の観測手法

われわれの考案した分子間エネルギー移動の観測手法について説明する。原子の空間スケールでエネルギー散逸過程を観測するためには、熱源となる分子（以後、ヒーター分子とよぶ）を用意し、周囲の溶媒分子へのエネルギー移動を実時間観測すればよい。しかし、実際にそれを行うには2つの難しさがある。ひとつは同種の溶媒分子を区別して個々に観測することは極めて困難であるということである。そこで、溶媒分子ではなく、熱エネルギーの伝導を観測するための分子（以後、プローブ分子とよぶ）を用意し、それへのエネルギー移動を観測する。もう一つの問題は、液相中においては拡散によってヒーター分子とプローブ分子の相対位置が時々刻々変化してしまうということである。そのため、ヒーター分子とプローブ分子との距離を人為的にコントロールすることが必要である。したがって、実験のデザインとしては、1分子だけに過剰なエネルギーをもたせた状態をどのように生成するか、分子単位で過渡的なエネルギーをどのように測るか、そして、ヒーター分子とプローブ分子との距離をどのように人為的にコントロールするかがカギとなる。そのためにわれわれは、液相中で三次元構造を安定に保持しているヘムタンパク質を利用した。以下にそのポイントを説明する。

ヘムタンパク質は、ヘム（鉄ポルフィリン錯体の一種）を補欠分子族としてもつタンパク質の総称である。ヘムタンパク質には、酸素運搬体であるヘモグロビンをはじめとして、ミオグロビン、シトクロム類など多くがある。ヘムは可視領域に強い吸収帯をもち、速い無輻射遷移を起こす

ために、光励起後ピコ秒以内に吸収した光子エネルギーは振動エネルギーに変換される。^{3,4)} すなわち、ヘムは非常に効率的なヒーター分子として働く。

次はプローブ分子の過渡的なエネルギーをどのように測るかである。そのために、われわれは時間分解共鳴ラマン分光法を用いている。ラマン分光法は主に振動遷移をみるものであり、ラマン散乱には振動量子数が増える向きの遷移に対応するストークス散乱と振動量子数が減る向きの遷移に対応するアンチストークス散乱の2種類がある。アンチストークス散乱は振動励起状態からのみ生じるため、振動励起状態の選択的なプローブとなる。たとえば、アンチストークス/ストークスバンド強度比より内部温度を求めることができる。

共鳴ラマン効果を利用すると、タンパク質の各部位についてアンチストークス共鳴ラマンスペクトルを測定できる。ラマン散乱では、その励起光が分子のもつ吸収帯付近の波長になると、散乱光強度が 10^4 倍～ 10^6 倍に増大する。これが共鳴ラマン効果と呼ばれる現象である。共鳴増大は吸収帯のもとになる原子団のみに起きるので、タンパク質のように大きな分子であっても、励起光波長を適切に選択することによって、タンパク質の特定の部位のスペクトルを選択的に観測できる。例えば、220-250 nmの紫外光を用いるとタンパク質中に含まれる芳香族アミノ酸残基の共鳴ラマンスペクトルが、400 nm付近の可視光を用いるとヘムの共鳴ラマンスペクトルが選択的に得られる。^{5,6)} 特定の部位のアンチストークス共鳴ラマンスペクトルを時間分解測定することで、タンパク質内部での部位間のエネルギー移動、すなわちエネルギーの流れを実時間測定することができる。このようにしてわれわれは、共鳴効果によってタンパク質の局所的な情報が選択的に得られる、およびアンチストークスラマンバンド強度からエネルギー分布に関する情報が得られる、というラマン分光法の特徴を最大限に活かして、タンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピングに挑んだ。

Fig.1にわれわれのアイディアの概念図を示す。ヘムタンパク質中の、ヘムをヒーター分子に、アミノ酸残基をプローブ分子に用いている。タンパク質は水中で安定な立体構造を保持するので、ヒーター分子とプローブ分子の相対位置を規定してエネルギー散逸過程を観測することができる。また、人工変異体を用いることによって、タンパク質中で望みの位置にトリプトファン残基（プローブ分子）を導入することができる。これはタンパク質を用いることの大きなアドバンテージである。これまで、ヒーター分子とプローブ分子の相対位置を固定するために、反応サイトと観測サイトを共有結合などのリンカーで固定した系が利用されている。^{7,9)} この系はリンカーの長さを調節することで、サイト間の距離を調節できる。しかし、リンカーの長さが長くなるとそのフレキシビリティのために距離を一律に規定できない、フレキシビリティを低下させるためにポリエチレンなどのように二重結合を導入すると、リンカー自身が高効率のエネルギー伝導経路となってしまうなどの問題がある。タンパク質ではそのような問題を回避することができる。

3. これまでの研究

励起分子からのエネルギー放出は、分子内および分子間エネルギー緩和として古くから研究されてきた問題である。我々が行っている実験の原形ともいえる、液相中の振動緩和に関する実験は1972年にKaiserらによって初めて報告された。¹⁰⁾ モード同期法によるピコ秒パルス発生技術が60年代後半にできあがったので、その数年後に彼らは化学

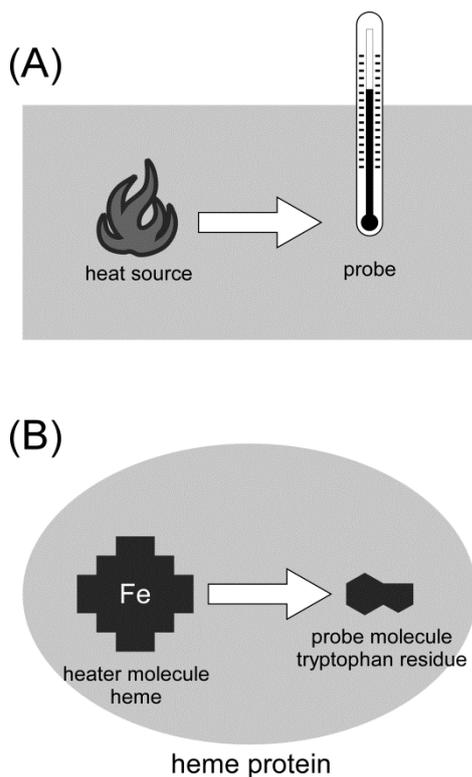


Fig.1 Macroscopic (A) and microscopic (B) view of measurements of “heat” energy dissipation.

の実験研究にこれを利用していたということは注目に値する。その後、Laubereau,^{11,12)} Bakker のグループ^{13,14)} などが精力的な研究を行った。励起方法は赤外励起, 誘導ラマン励起, プローブ法は赤外吸収, アンチストークスラマン強度が用いられている。

励起分子からのエネルギー放出に加えて, エネルギー流入を観測する研究もおこなわれている。Wang らは, アルキル鎖中のエネルギー伝導を調べた。^{15,16)} 彼らは, 金の表面にアルキル鎖の自己組織化単分子膜を作製し, 背面から近赤外パルス光を当てることで金を瞬間的に加熱した後, 赤外吸収分光法によりその熱がアルキル鎖先端のメチル基にどのくらいの速さで到達するかを観測した。アルキル鎖の長さを変えて測定を行い, アルキル鎖中の熱伝搬はフリーエの法則に従わないことを見出した。

以上のように液相中のエネルギー移動について研究は進んでいるものの, ヒーター分子とプローブ分子の相対配置を規定し, かつ 10 Å 以上の幅広い距離にわたってエネルギー移動を観測した研究例はこれまでにない。われわれはヘムタンパク質の特徴を利用することによって, 3 次元的に広範囲にプローブ分子を動かし, タンパク質内のエネルギー散逸の研究に取り組んだ。

4. 実験装置・技術

液相中の振動エネルギー移動は一般にピコ秒の時間領域で起きる。したがって, その分光計測にはピコ秒の時間分解能が必要である。高い時間分解能をもった時間分解測定を行うには, ポンププローブ法とよばれる二種類のパルス光を使った方法が一般的に用いられる。この方法では, 第一のパルス光 (ポンプ光) を使って光反応により分子の変化のトリガーをかけ, 第二のパルス光で共鳴ラマンスペクトルを測定する。二つのパルスの時間間隔を変えていく

ことによって, 分子の状態変化を, 振動スペクトル変化を通して追跡することができる。共鳴ラマンスペクトル計測の時間分解能はパルス光の時間幅によって決まり, 最も高いもので数ピコ秒の分解能が得られる。われわれはチタンサファイアレーザーを基とした安定なピコ秒時間分解可視共鳴ラマン分光装置を世界に先駆けて製作した。^{17,18)} アンチストークスラマン散乱光はストークスラマン散乱光に比べて非常に弱いので測定が難しい。われわれは高性能の分光装置を用いることによって, S/N 比の高い時間分解アンチストークス共鳴ラマンスペクトル測定に成功し, 本稿に述べる成果を取めた。われわれが開発した分光装置の詳細については別稿を参照されたい。^{19,20)}

5. エネルギー散逸のリアルタイム観測

エネルギー散逸の観測実験に, われわれは代表的なヘムタンパク質のひとつであるミオグロビンを主に用いた。対象としてミオグロビンを選んだのは, これまできわめて多くの物理化学手法が適用されており, 基礎データの蓄積があるためである。

5.1 ヘムの振動エネルギー緩和

われわれはまずヘムからのエネルギー放出について調べた。エネルギー放出はこれまでに振動エネルギー緩和として研究されている。ヘムの振動エネルギー緩和に関する研究は, 1987年に Henry らがこの現象について行った分子動力学シミュレーションが契機となった。²¹⁾ 彼らはミオグロビンやシトクロム *c* に可視パルスに相当する運動エネルギーを瞬間的に与え, そのエネルギーがその後どのように周囲のタンパク質に散逸していくかについて調べた。彼らの結果によると, どちらのタンパク質内の場合も緩和は二相性を示し, その時定数は 1-4 ps (50%) と 20-40 ps (50%) であった。その後, この現象は 90 年代前半にピコ秒時間分解共鳴ラマン分光法を用いて調べられた。Lingle Jr. らはアンチストークスラマンバンドの強度を遅延時間に対して調べ, 緩和の時定数として 2-5 ps という値を報告した。²²⁾ また, Petrich らはヘムのラマンバンドの位置が初期の数ピコ秒で高波数側へとシフトすることに着目した。²³⁾ 彼らはこれを振動エネルギー緩和によるシフトと解釈し, それを基に緩和は 30 ps で終わることを報告した。また, Li らはナノ秒パルスによる間接的な測定により, 緩和の時定数を 4 ps 以下と見積もった。²⁴⁾ どちらの結果も, 先の Henry のシミュレーションの結果がオーダーとして合っていることをサポートしていたが, データの質が十分ではなく, それを超える結論は導き出せなかった。

われわれは, S/N 比の高いピコ秒時間分解アンチストークス共鳴ラマンスペクトルの測定に成功し, ヘムのエネルギー緩和速度を明らかにした。²⁵⁾ その結果を, **Fig.2** に示す。これは, ヘムに結合した一酸化炭素を 540nm パルスで解離させた時のヘムのラマンスペクトル変化をピコ秒の時間分解能で調べたものである (プローブ光波長 435 nm)。(A)はストークススペクトルで, 各時刻における実測スペクトルから未反応分のスペクトルを差し引いた差スペクトルとして示してある。下に示した平衡状態の解離形 (deoxyMb) のスペクトルと時間分解スペクトルとを見比べると, バンド強度が光励起とともに立ち上がり, 解離後のヘムの構造変化は装置応答時間内に起こっていることがわかる。一方, 同じ過程をアンチストークス側で見たものが **Fig.2 (B)**で, 数ピコ秒でストークス側とおなじくラマンバンドが観測されるが, これらの強度はピコ秒領域で減衰していき, 50 ps ではほとんどなくなってしまう。ここで重要なことは, このような減衰がアンチストークス側でしか見られなかった

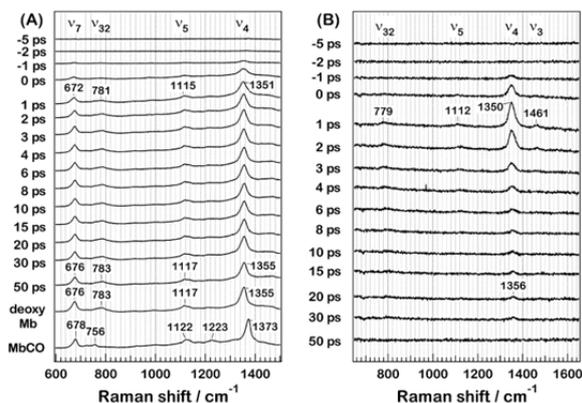


Fig.2 (A) Time-resolved resonance Raman spectra on the Stokes side of photodissociated MbCO for time delays from 25 to 50 ps. The time-resolved resonance Raman difference spectra were obtained by subtracting the probe-only spectrum from the pump-probe spectra with an appropriate factor. Spectral intensities were corrected for absorbance changes by using the intensity of the 980 cm⁻¹ band of sulfate ions present in the solution. Stokes spectra of the equilibrium deoxyMb and MbCO are depicted for comparison. (B) Time-resolved resonance Raman spectra on the anti-Stokes side of photodissociated MbCO for time delays from 25 to 50 ps. The spectra are represented as difference spectra relative to the probe-only spectrum. (From Ref. 25. Reprinted with permission from AAAS.)

ということで、このことはヘムの振動エネルギー緩和に対応している。これらの強度変化の様子をわかりやすく見るために、面積強度を遅延時間に対してプロットしたものが **Fig.3** である。アンチストークススペクトルの結果は 1.9 ± 0.6 ps (93%) と 16 ± 9 ps (7%) の時定数をもつ指数関数でうまく表現できた。一つのモードの中でボルツマン分布が成り立つと仮定して、これらの時定数を温度の冷却定数に換算すると、それぞれ 3.0 ± 1.0 ps と 25 ± 14 ps になる。この結果は、Henry らの分子動力学シミュレーションとよく合う。しかし、その成分比はかなり異なる。この差は分子動力学シミュレーションでは溶媒（水）が含まれていないことに起因すると考えられる。その後の彼らの溶媒を含めた計算結果では、確かに速い成分が大きくなっている。^{26,27)} この結果は、溶媒である水が効率的なヒートシンクとして働くことを示唆している。上に述べたわれわれの成果は国内・国外の多くの理論研究グループを触発し、²⁸⁻³⁶⁾ タンパク質でのエネルギー緩和過程に関する理論研究を行う契機をつくった。

5.2 タンパク質内エネルギー散逸に関する研究

ヘムのエネルギー分布の観測に成功したわれわれは、ヘムからタンパク質部分に放出されたエネルギーが、タンパク質内をどのように散逸するかという問題に挑んだ。そして、タンパク質中のトリプトファン残基のアンチストークス共鳴ラマンスペクトルを選択的に観測し、ヘムから放出されたエネルギーがタンパク質分子内を散逸する様子を初めて実験的にとらえた。³⁷⁾ その成果を以下に紹介する。

はじめに、われわれの考案した手法によってアミノ酸残基の振動励起状態が観測できるかのテスト測定として、ヘムタンパク質のひとつであるシトクロム *c* を用いて、タンパク質中エネルギー散逸の直接観測を試みた。シトクロム *c* を選んだ理由は、トリプトファン残基が一つのみであり、タンパク質内で一つの残基を選択的に観測できること、ま

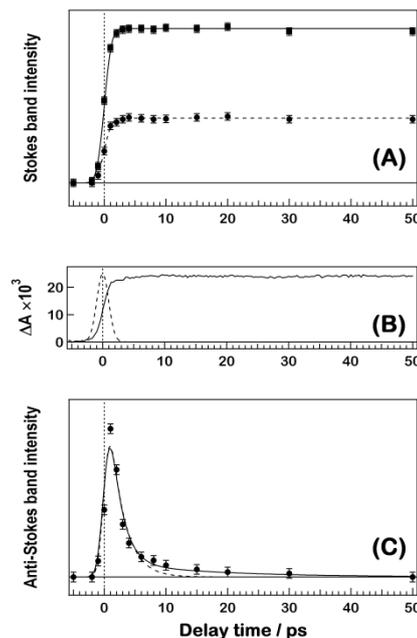


Fig.3 (A) Temporal profiles of intensities of the Stokes ν_4 (squares) and ν_7 (circles) bands. The solid and broken lines are the best fit to a step function (assuming instantaneous rise and very slow decay) for the ν_4 and ν_7 bands, respectively. (B) Temporal profile of absorbance ΔA of deoxyMb at 435 nm after excitation at 540 nm. The cross correlation traces between the pump and probe pulses are depicted by a dotted line. (C) Temporal profiles of anti-Stokes intensity of the ν_4 band (circles). The solid lines are the best fit to a double-exponential decay convoluted with the instrument response function, and the obtained decay time constants were 1.9 ± 0.6 (93%) and 16 ± 9 ps (7%). The broken line is the best fit to a single-exponential decay convoluted with the instrument response function, and the obtained decay constant was 2.3 ± 0.8 ps. (From Ref. 25. Reprinted with permission from AAAS.)

た、酸化形シトクロム *c* は光反応をほとんど起こさないことが知られているためである。

酸化形シトクロム *c* の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマン (UVRR) 測定の結果を **Fig.4** に示す。**Fig.4** のスペクトルは、時間分解スペクトルからプローブ光のみで測定したスペクトルを差し引いた差スペクトルである。差スペクトルの計算は、内部強度標準として入れた硫酸イオンのバンド強度を基準にして行った。スペクトルには強いバンドが、 756 cm⁻¹ と 1009 cm⁻¹ に観測された。これらはともにトリプトファン残基によるもので、それぞれ W18 と W16 バンドに帰属できる。**Fig.5** に、W16 および W18 バンド強度の時間変化を示す。図中の実線は、関数 $I_1[\exp(-t/\tau_{\text{decay}}) - \exp(-t/\tau_{\text{rise}})]$ と、装置応答関数とをコンボリュートした関数でフィットした結果である。W16 バンド強度の増大と減少の時定数はそれぞれ、 $5.6_7 \pm 3.0$ ps と $5.6_8 \pm 3.0$ ps に、W18 バンド強度の増大と減少の時定数はそれぞれ、 5.5 ± 2.5 ps と、 5.6 ± 2.5 ps と求められた。バンド強度の増大はヘムからトリプトファン残基への振動エネルギーの流入に、バンド強度の減少はトリプトファン残基から周囲のアミノ酸残基への振動エネルギーの流出に対応していると考えられる。

シトクロム *c* を用いたテスト測定から、本手法の有用性が実証された。そこで次に、ミオグロビン変異体を用いた、

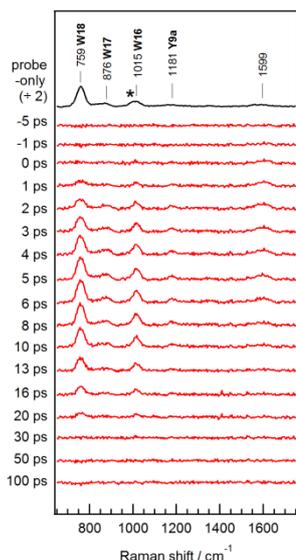


Fig.4 Time-resolved anti-Stokes UVRR spectra of ferric cytochrome *c* for time delays from -5 ps to 100 ps. Probe and pump wavelengths are 230 and 405 nm, respectively. The top trace is the probe-only spectrum corresponding to the anti-Stokes UVRR spectrum of ferric cytochrome *c* divided by a factor of 2. The other spectra are time-resolved difference spectra generated by subtracting the probe-only spectrum from the pump-probe spectrum at each delay time. The asterisk represents the sulfate band at 983 cm^{-1} as an intensity standard. The accumulation time for obtaining each spectrum is 116 min. (Reprinted with permission from Ref. 28. Copyright 2013 American Chemical Society.)

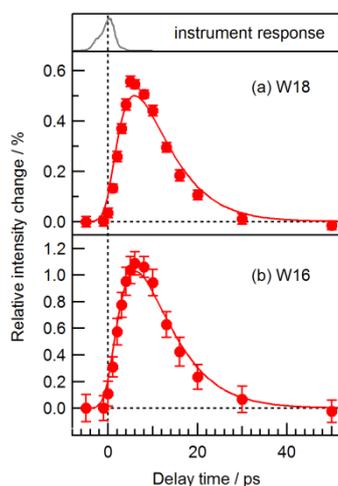


Fig.5 Temporal intensity changes of the anti-Stokes (a) W18 and (b) W16 bands in the range of -5 to 50 ps upon S_2 (405 nm) excitation. Circles indicate the band intensity measured at each delay time relative to the band intensity in the probe-only spectrum. Solid lines are the best-fits to a double exponential function of the form $I_1[\exp(-t/\tau_{\text{decay}}) - \exp(-t/\tau_{\text{rise}})]$ convoluted with the instrument response function. (Reprinted with permission from Ref. 28. Copyright 2013 American Chemical Society.)

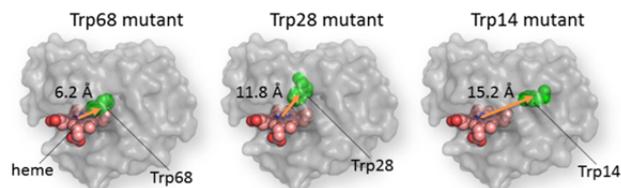


Fig.6 Myoglobin mutants used for time- and space-resolved mapping of energy migration in protein. Green spheres represent tryptophan residues introduced as the probe molecule for the energy migration. Pink and red spheres represent the heme group, the heater molecule.

エネルギー散逸の時空間マッピングを試みた。試料には、立体構造が詳細に調べられているマッコウクジラ由来のミオグロビンを用いた。このミオグロビンにはトリプトファンが2残基含まれているため、まずこれらをラマン散乱強度の弱いチロシン、フェニルアラニンに置換した変異体を作製した。この変異体にトリプトファン残基を1残基導入し、トリプトファン残基の振動エネルギー励起/緩和を、その時間分解アンチストークス共鳴ラマンスペクトルによって観測した。ヘムから同じ方向で、かつ距離の異なる位置にトリプトファンを導入した変異体2種 (Trp68 変異体および Trp28 変異体) を作製し、ヘムからのエネルギー伝搬について、距離依存性を調べた。それぞれの変異体におけるトリプトファン残基の位置を **Fig.6** に示す。ヘムからトリプトファン残基までの距離は、Trp68 変異体および Trp28 変異体について、それぞれ 6.2 および 11.8 Å である。これらに加え、クジラ由来ミオグロビンの 14 番目のトリプトファンを残した変異体、Trp14 変異体についても振動エネルギー励起/緩和を調べた。この変異体において、ヘムからトリプトファン残基の距離は 15.2 Å である。

Trp68 変異体の時間分解アンチストークス UVRR スペクトルを **Fig.7** に示す。ヘムの光励起に伴って、バンド強度の増大とそれに引き続いた減少が観測された。バンド強度の増大はトリプトファン残基へのエネルギーの流入に、バンド強度の減少はトリプトファン残基からのエネルギーの流出に対応している。**Fig.8** は、 760 cm^{-1} にみられる W18 バンド強度の時間変化を示している。縦軸の強度は、各変異体の最大値で規格化したものである。バンド強度の増加と減少の定数値は、Trp68 変異体では 3.0 ps, 9.6 ps と、Trp28 変異体では 4.0 ps, 19.2 ps と求められた。さらにアンチストークスバンド強度の比較から、28 番目の位置には、68 番目の位置の約 1/3 のエネルギーが到達していることがわかった。Trp14 変異体では、アンチストークス W16 および W18 バンドは観測されたものの、その強度はきわめて弱かった。熱源からの距離が離れると、観測サイトでのエネルギーの伝達速度が遅くなるということ、および余剰エネルギー量が低下するということは、熱拡散の考え方と矛盾しない。しかし、3 種類の変異体の測定結果それぞれに、熱拡散方程式から得られた関数を当てはめると、同一のパラメーターでは表現できなかった。これはナノメートル前後のマイクロスケールでのエネルギー伝達を考える際、通常の熱拡散の考え方では、その挙動を適切に表現できないことを示している。

本研究は、タンパク質内でヒーターサイトと観測サイトの相対位置を制御し、エネルギーの移動を直接観測した最初の例である。すなわち、タンパク質内のエネルギー散逸をアミノ酸残基の空間分解能で直接観測した初めての例であり、タンパク質分子内のエネルギーの流れを残基サイズ

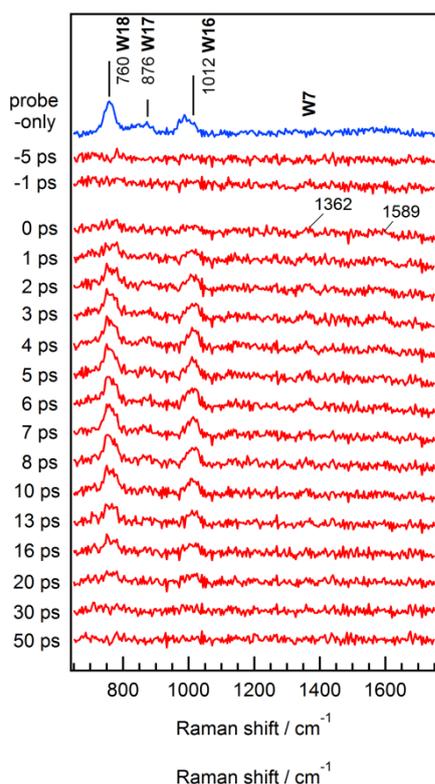


Fig.7 Time-resolved anti-Stokes UVR spectra of ferric myoglobin for time delays from -5 ps to 50 ps. Probe and pump wavelengths are 230 and 405 nm, respectively. The top trace is the probe-only spectrum corresponding to the anti-Stokes UVR spectrum of ferric myoglobin divided by a factor of 2. The other spectra are time-resolved difference spectra generated by subtracting the probe-only spectrum from the pump-probe spectrum at each delay time.

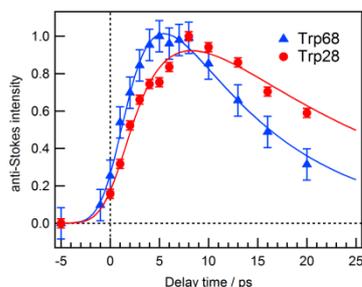


Fig.8 Temporal intensity changes of the anti-Stokes W18 band in the range of -5 to 25 ps upon photoexcitation. Circles and triangles indicate the band intensity of Trp28 and Trp68 mutants, respectively, measured at each delay time relative to the band intensity in the probe-only spectrum. Solid lines are the best-fits to a double exponential function of the form $I_1[\exp(-t/\tau_{\text{decay}}) - \exp(-t/\tau_{\text{rise}})]$ convoluted with the instrument response function.

の空間分解能で研究する道を切り開いたものとして大きな意義をもつ。

5.3 タンパク質から水へのエネルギー散逸

ヘムから放出されたエネルギーは、最終的に溶媒である水へと伝わる。このことを最初に実験的に示したのは Anfirudらである。³⁸⁾ 彼らは、ヘモグロビンの光反応直後、2100 cm⁻¹ 付近の水（この場合は重水）による赤外吸収が変化することを見つけた。その後、Lianらは、この変化の時

間変化を詳細に調べた。³⁹⁾ その結果、水の温度上昇は二成分によって説明でき、それらの時定数は 7.5 ps (60%) と 20 ps (40%) であった。また、Millerらのグループは熱過渡回折格子法を使って、水の温度上昇を調べた。⁴⁰⁾ この方法は熱的に駆動された体積膨張の音響成分を観測するもので、非常に小さな温度変化 (<10⁻⁴ °C) を観測することができる。この測定から、エネルギーはタンパク質から水へ 20 ps 内で散逸していることが明らかになった。

4-2 で述べた、トリプトファン残基へのエネルギー流入の時定数はヘム冷却の時定数よりも大きく、かつエネルギー流出の時定数は水の温度上昇の時定数（遅い成分）と同程度かそれよりも小さい。このことは、余剰エネルギーが、ヘム→タンパク質→水と伝搬するという描像と矛盾しない。

6. まとめ

本稿で示したように、われわれの開発した観測手法は、タンパク質分子における“熱”エネルギーの散逸過程の観測に極めて有効である。現在、ヘムから異なる方位にトリプトファン残基をもつ変異体を用いてタンパク質内のエネルギー散逸にどのような異方性があるかを明らかにすべく研究を進めている。

タンパク質内のエネルギー散逸は、凝縮相のエネルギー散逸を研究するには有利な点を多く持ち、またタンパク質における化学反応を考えるうえでも基礎的で重要な過程である。本稿で述べた手法を用いてタンパク質内のエネルギー散逸を系統的に調べていくことによって、原子の空間スケールでのエネルギー散逸機構を明らかにしたいと考えている。

謝 辞

本稿で述べた研究成果は、藤井直樹君（当時大阪大学大学院理学研究科大学院生、現旭硝子株式会社）、石川春人博士（大阪大学大学院理学研究科講師）との共同研究の成果である。また本研究は、科学研究費補助金（特定領域研究 19056013, 基盤研究 (B) 20350007, 23350007) のサポートを得て行われたものである。

文 献

- 1) N. H. Gottfried, A. Seilmeier, and W. Kaiser, *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *111*, 326-332.
- 2) A. Seilmeier and W. Kaiser, Ultrashort vibrational energy transfer in liquids. In *Ultrashort laser pulses, generation and applications*, Second ed., Kaiser, W., Ed. Springer-Verlag: Berlin, 1993, Vol.60, pp 279-317.
- 3) J. R. Andrews and R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 3110-3114.
- 4) P. M. Champion and R. Lange, *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 5947-5957.
- 5) I. Harada and H. Takeuchi, Raman and Ultraviolet Resonance Raman Spectra of Proteins and Related Compounds. In *Spectroscopy of Biological Systems*, Clark, R. J. H., Hester, R. E., Eds. John Wiley & Sons: Chichester, 1986, pp 113-175.
- 6) T. Kitagawa and S. Hirota, Raman Spectroscopy of Proteins. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Chalmers, J. M., Griffiths, P. R., Eds. John Wiley & Sons: Chichester, 2002, Vol. 5, pp 3426-3446.
- 7) T. Okazaki, N. Hirota, T. Nagata, A. Osuka, and M. Terazima, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5079-5080.

- 8) T. Okazaki, N. Hirota, T. Nagata, A. Osuka, and M. Terazima, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 9591-9600.
- 9) S. Velate, E. O. Danilov, and M. A. J. Rodgers, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 8969-8975.
- 10) A. Laubereau, D. v. d. Linde, and W. Kaiser, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *28*, 1162-1165.
- 11) H. Graener, R. Dohlus, and A. Laubereau, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *140*, 306-310.
- 12) H. Graener and A. Laubereau, *Appl. Phys. B* **1982**, *29*, 213-218.
- 13) M. Bonn, M. J. P. Brugmans, and H. J. Bakker, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *249*, 81-86.
- 14) S. Woutersen, U. Emmerichs, and H. J. Bakker, *Science* **1997**, *278*, 658-660.
- 15) Z. Wang, D. G. Cahill, J. A. Carter, Y. K. Koh, A. Lagutchev, N.-H. Seong, and D. D. Dlott, *Chem. Phys.* **2008**, *350* (1-3), 31-44.
- 16) Z. Wang, J. A. Carter, A. Lagutchev, Y. K. Koh, N.-H. Seong, D. G. Cahill, and D. D. Dlott, *Science* **2007**, *317* (5839), 787-790.
- 17) Y. Uesugi, Y. Mizutani, T. Kitagawa, *Rev. of Sci. Instrum.* **1997**, *68*, 4001-4008.
- 18) Y. Uesugi, Y. Mizutani, S. G. Kruglik, A. G. Shvedko, V. A. Orlovich, and T. Kitagawa, *J. Raman Spectrosc.* **2000**, *31*, 339-348.
- 19) 水野操, 水谷泰久, 分光研究 **2008**, *57*, 179-194.
- 20) 水野操, 水谷泰久, レーザー研究 **2009**, *37*, 748-753.
- 21) E. R. Henry, W. A. Eaton, and R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8982-8986.
- 22) R. Lingle, Jr., X. Xu, H. Zhu, S.-C. Yu, and J. B. Hopkins, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 9320-9331.
- 23) J. W. Petrich, J. L. Martin, D. Houde, C. Poyart, and A. Orszag, *Biochemistry* **1987**, *26*, 7914-7923.
- 24) P. Li, J. T. Sage, and P. M. Champion, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 3214-3227.
- 25) Y. Mizutani and T. Kitagawa, *Science* **1997**, *278*, 443-446.
- 26) R. J. D. Miller, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1991**, *42*, 581-614.
- 27) R. J. D. Miller, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 145-150.
- 28) I. Okazaki, Y. Hara, and M. Nagaoka, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *337*, 151-157.
- 29) K. Moritsugu, O. Miyashita, and A. Kidera, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85* (18), 3970-3973.
- 30) K. Moritsugu, O. Miyashita, and A. Kidera, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 3309-3317.
- 31) A. Xie, L. van der Meer, W. Hoff, R. H. Austin, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84* (23), 5435-5438.
- 32) L. Bu and J. E. Straub, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 10634-10639.
- 33) H. Fujisaki and J. E. Straub, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 6726-6731.
- 34) H. Fujisaki, Y. Zhang, and J. E. Straub, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 144910-11.
- 35) D. E. Sagnella, and J. E. Straub, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 7057-7063.
- 36) Y. Zhang, H. Fujisaki, J. E. Straub, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (12), 3243-3250.
- 37) N. Fujii, M. Mizuno, and Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (44), 13057-13064.
- 38) P. A. Anfinrud, C. Han, and R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 8387-8391.
- 39) T. Lian, B. Locke, Y. Kholodenko, and R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11648-11656.
- 40) L. Genberg, Q. Bao, S. Gracewski, and R. J. D. Miller, *Chem. Phys.* **1989**, *131*, 81-97.