

1P131 ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光によるタンパク質二次構造の高速変化の観測

(阪大院理) ○水野 操、水谷 泰久

タンパク質の機能発現と構造変化には密接な関係がある。我々は、タンパク質が機能発現するしくみを明らかにすることを目指し、時間分解紫外共鳴ラマン分光法をもちいて、ピコ秒時間領域においてタンパク骨格に起こる初期構造ダイナミクスを調べている。共鳴ラマン測定のプローブ光に紫外光を使用すると、タンパク骨格の一部を形成する芳香族アミノ酸残基の振動バンドやポリペプチド骨格のアミド振動バンドを選択的に観測することができる。我々はこれまでに、チロシン・トリプトファン残基のピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン測定手法を確立し、ミオグロビンのリガンド光解離やイエロープロテインの光サイクル反応において、ラマンスペクトル変化からこれらのアミノ酸残基周辺の構造変化を検出し、タンパク骨格側の初期構造変化について議論してきた[1,2]。

一方、タンパク質の二次構造を反映するアミド振動バンドの紫外共鳴ラマンスペクトル測定によるタンパク質の初期構造変化の研究は、温度ジャンプによるタンパク質のアンフォールディング過程のナノ秒時間分解測定の報告があるが[3,4]、光応答によるタンパク骨格構造の高速変化をピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン測定により観測した報告はまだない。そこで、今回新たに、アミド振動バンドのラマンスペクトル変化をピコ秒の時間分解能で測定するために装置の改良を行い、タンパク質の二次構造の光誘起高速構造変化の実時間観測を試みたのでこれを報告する。

実験装置の概略を図1に示す。光源には再生増幅したチタンサファイアレーザーを使用した。レーザーの出力(778 ~ 790 nm)の第2高調波を紫外プローブ光発生および可視ポンプ光発生用に分割した。それぞれの光パルスは波長変換後、試料溶液に集光しタンパク質からの紫外共鳴ラマン散乱光を得た。迷光除去のためプリズム型前置分光器をプレフィルターとして用いた後、主分光器(シングル分光器、焦点距離 500 mm、グレーティングの刻線数 2400 gr / mm、ブレイズ波長 250 nm)によりその1次回折光を CCD 検出器で検出した。ポンプ光とプローブ光の相互相関時間は約 5 ps であった。

タンパク質の骨格構造変化の検出には、得られたラマンスペクトルにおいて、アミド振動バンドの微小な変化を解析する必要がある。そこで、我々は以下の項目について改良を行い、タンパク質のピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルの高感度測定を図った。

① プローブ光：プローブ光はアミド振動バンドの紫外共鳴ラマンスペクトルを選択的に観測するために、ペプチド結合の $\pi-\pi^*$ 遷移に共鳴する波長(206 ~ 210 nm)に調整した。このとき、プローブ光発生用の第2高調波を2分割し、一部をメタンガスを封入したラマンシフタに集光し1次ストークス光を発生させ、残りの光との和周波をとることで、紫外プローブ光を得た。プローブ光の出力は、試料の位置において最大で 1 μ J(繰り返し 1 kHz)であった。

② ポンプ光：光反応によるスペクトル変化の検出効率を向上させるために、ポンプ光の波長を観測対象のタンパク質の発色団の吸収ピーク付近になるように調整した。そのため、

レーザー出力の第2高調波 (389 ~ 395 nm) のほかに、この光をもとにして、メタンガスおよび水素ガスを封入したラマンシフタの1次ストークス光 (メタン : 439 ~ 446 nm、水素 : 464 ~ 473 nm) および光パラメトリック発生・増幅により得られた光 (530 ~ 600 nm) を十分な強度で発生させ、適宜、波長を選択した。

③ 試料 : タンパク質のペプチド結合の電子吸収バンドの吸光度は非常に大きく、自己吸収効果のために、検出されるラマン散乱のシグナル強度は著しく減少する。このため、試料溶液は2本のワイヤ間を液膜状に落下させることで、試料の厚みを薄くした (膜厚 : 100 ~ 500 μm) [5]。試料溶液を循環させることで少量試料の繰り返し測定を行った。

これらの改良により、ピコ秒時間領域におけるタンパク質二次構造の高速変化を検出することに成功した。タンパク質の二次構造に関する情報は、赤外吸収スペクトルや円二色性スペクトルからも共鳴ラマンスペクトルと相補的に得ることができる。しかし、これらの分光手法は、溶質の他の振動モードや溶媒の吸収、試料からの蛍光や光散乱などの影響を受けやすいため、実験条件の制約が多い。共鳴ラマン測定はこの制約が小さいため、生理的な環境に近い状態でタンパク質の構造情報をより多く得ることが可能である。アミド振動バンドのピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルの観測は、芳香族アミノ酸残基のスペクトルの観測と合わせて、タンパク骨格構造の光誘起構造変化の初期過程を総合的に理解するために非常に有効であると考えている。

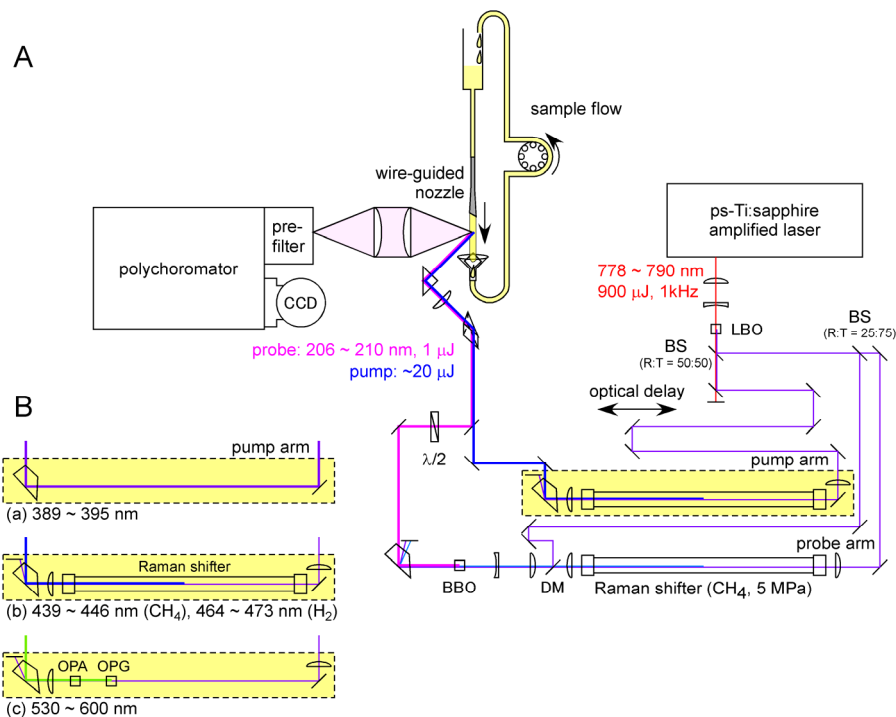


図 1. ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置 (A) およびポンプ光の波長変換方法 (B)

【参考文献】

1. A. Sato and Y. Mizutani, *Biochemistry* **2005**, *44*, 14709.
A. Sato, Y. Gao, T. Kitagawa, and Y. Mizutani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9627.
2. M. Mizuno, N. Hamada, F. Tokunaga, and Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 6293.
3. I. K. Lednev, A. S. Karnoup, M. C. Sparrow, and S. A. Asher, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2388.
4. C.-Y. Huang, G. Balakrishnan, and T. G. Spiro, *Biochemistry* **2005**, *44*, 15734.
5. M. J. Tauber, R. A. Mathies, X. Chen, and S. E. Bradforth, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 4958.