

## テラヘルツ時間領域分光法によるバクテリオロドプシンの 低振動ダイナミクス；水和と温度の影響

(1:神戸大院理、2:名工大院工、3:神戸大分子フォトサイエンス研究センター、)  
○川口 新太郎<sup>1</sup>、柴田 幹大<sup>2</sup>、神取 秀樹<sup>2</sup>、富永 圭介<sup>1,3</sup>

[序] タンパク質が機能を発現する際、タンパク質の中にとりこまれている水分子や周辺の水分子が重要な役割を演じていることが知られている。また、タンパク質の機能発現にはタンパク構造の大きな変化を伴うものがあり、この構造の変化は多くの原子が集団的に運動することにより起こる。タンパク質のこのような運動は  $50 \text{ cm}^{-1}$  以下の低振動数領域に特徴的な振動数を持つことが多い。本研究では、テラヘルツ時間領域分光法(THz ; 1 THz は約  $33 \text{ cm}^{-1}$  に相当)を用いて、異なる水和状態、及び温度でバクテリオロドプシン(BR)の低振動スペクトルを測定し、BR の低振動スペクトルが水和、温度により受ける影響を調べ、さらに機能の発現との関連について考察した。

THz 時間領域分光法では、THz 波の電場の時間依存性を測定し(図 1)、これをフーリエ変換することにより、電磁場の位相と振幅が同時に得られる。これらから、試料の屈折率や吸光係数などの物理量を求めることができる。

高度好塩菌の中の BR(図 2)は光駆動プロトンポンプ機能を持つタンパク質である。BR は発色団としてレチナールを持ち、光吸収によりレチナールの異性化が起こり、それに続いて一連の反応(プロトン輸送サイクル)が起こる。この反応サイクル中の M 中間体でタンパク構造に大きな変化が起こることが報告されている。

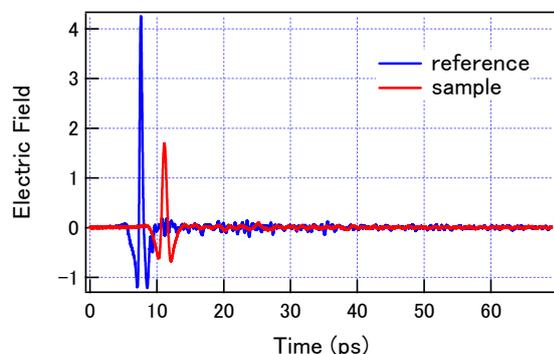


図 1. 時間領域の THz 電磁波

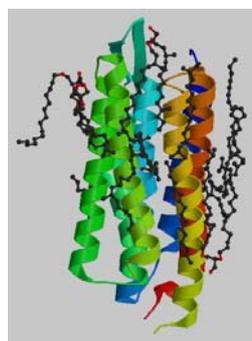


図 2.バクテリオロドプシン(BR)

[実験方法] 試料作製の際、2つの問題について検討した。1つは、THz 領域の電磁波は水分子により強く吸収されるため水を溶媒として使えない。もう1つの問題は、電磁波はその波長サイズの物体により散乱されるため、THz 電磁波(波長：数 mm～サブ mm)を用いた測定ではそのサイズで均一な試料を作製する必要がある。これらのことを検討し、BR 溶液を乾燥させて粉末状にした後、加圧することにより測定用のペレット状試料を作製した。作製した試料を無機塩の飽和水溶液により湿度を調節した容器内に放置し、水和させた ( $\text{MgCl}_2$  ; 33%,  $\text{NaBr}$  ; 58%,  $\text{NaCl}$  ; 75%)。水和量は質量を測定することにより決定した。

THz 波パルスはフェムト秒レーザーパルス(波長 800 nm、パルス幅 100 fs)を光伝導アンテナに集光し発生させた。電磁波の検出も光伝導アンテナとフェムト秒パルスを用いて行った。

[結果と考察] 山本らは THz 分光により得られた屈折率、吸光係数のスペクトルより式(1)を用いて温度因子を補正することにより、換算吸収断面積(Reduced Absorption Cross Section : RACS)を定義した<sup>[1]</sup>。

$$RACS \equiv \frac{\tilde{\nu}}{(1 - e^{-\beta hc \tilde{\nu}})} n(\tilde{\nu}) \alpha(\tilde{\nu}) \quad (1)$$

$\tilde{\nu}$ : 波数	$\beta$ : $1/k_B T$
$h$ : プランク定数	$c$ : 光速
$n$ : 屈折率	$\alpha$ : 吸光係数

今回の測定から BR の RACS を求めたところ、すべての水和状態及び温度で RACS の振動数のべき依存性( $RACS \propto \nu^\alpha$ )が見られた(図 3)。7~26  $\text{cm}^{-1}$  の振動数領域で  $\alpha$  の値を求めたところ、常温では、乾燥試料で  $\alpha = 1.97$  となり、この値は水和量の増加とともに小さくなる傾向にある。赤外活性度が波数に依存しないと仮定すると、RACS は振動状態密度(VDOS)に比例する。3次元格子における調和振動子を考えたとき、その VDOS は振動数の2乗に比例する。このモデルと比較すると、BR の低振動ダイナミクスは水和量の増加に伴い非調和性が増加することを示している。水和試料と乾燥試料の差スペクトルとの解析とバルクの水の測定結果の比較から、この非調和性の増加は単に BR に水和したバルク的に振舞う水分子の運動によるものではなく、水和による BR の低振動モードの変化や、BR の近くに存在し運動が著しく制限された水分子によるものだと考えている。また、べき数の温度依存性は、 $-100^\circ\text{C} \sim 0^\circ\text{C}$  の温度領域で乾燥試料、水和試料ともに温度上昇に伴い、べき数は小さくなる傾向にある。しかし、 $-40^\circ\text{C}$  以上の温度領域では水和試料は乾燥試料よりも強い温度依存性を示す(図 4)。このことは、水和した BR の低振動ダイナミクスは  $-40^\circ\text{C}$  以上で、温度上昇に伴い非調和性が急激に増加することを示している。一方、非弾性中性子散乱を用いた BR の測定から、230 K 付近で水和試料の平均二乗変位が急激に増加する動力的遷移が起こることが報告されている<sup>[2]</sup>。今回、THz 時間領域分光法により観測されたこの急激な変化も、動力的遷移であると考えている。

THz 時間領域分光法では一つのスペクトルを数秒~数分で測定できる。本手法は数分の時間スケールで経時変化を伴う現象を観測するのに有用である。また、ポンプ光を導入した時間分解測定でもその威力を発揮するものである。

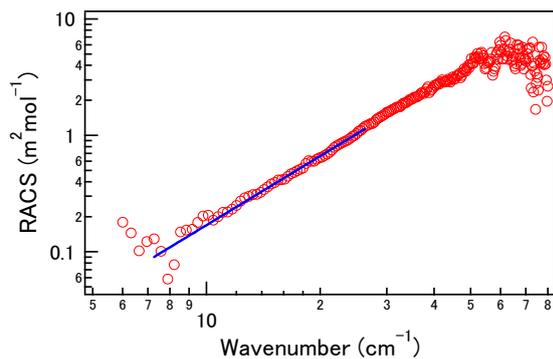


図3. ○: THz 領域における BR の RACS、  
-: 7~26  $\text{cm}^{-1}$  での直線フィット(対数表示)

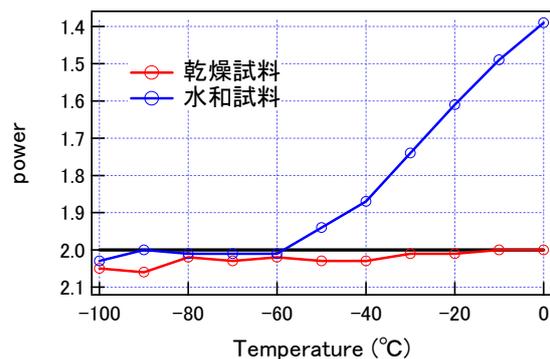


図4. べき数対温度のプロット。赤: 乾燥試料、青: 水和試料のべき数の温度依存性

- 文献 [1] K. Yamamoto, K. Tominaga, H. Sasakawa, A. Tamura, H. Murakami, H. Ohtake, and N. Sarukura (2005) *Biophys. J.* 89, L22-L24.  
[2] M. Ferrand, A. J. Dianoux, W. Petry, and G. Zaccai (1993) *Biophys. J.* 90, L9668-L9672