

1P091

高輝度フェムト秒レーザーを用いた時間分解赤外分光装置の開発

(¹兵庫県立大・院・生命理, ピコバイオロジー研究所, ²兵庫県立大・院・生命理, 生命科学専攻) ○久保稔¹, 山口悟², 望月正雄¹, 吉川信也^{1,2}, 小倉尚志^{1,2}, 中島聡¹

【序】 蛋白質の反応機構を理解するためには、蛋白質の動的構造変化を実時間で計測することが必須である。特に水素原子の位置を決定し、プロトン移動や水素結合ネットワークの変化を実験で捕らえることは、X線結晶構造解析と相補的な情報を得る上で不可欠である。赤外分光法は、蛋白質の二次構造情報のほか、アミノ酸側鎖のプロトン化や水素結合の生成・消滅を部位特異的に検出できる実験手法であり、フーリエ変換型赤外分光光度計 (FTIR) の発展により、蛋白質の構造研究においても強力な分光手法となっている。この分光法の次の発展は、室温水溶液中で蛋白質の構造変化を追跡できる汎用の時間分解測定装置を開発する点にある。

現在主流の時間分解測定装置はステップスキャン FTIR であるが、近年は、最先端の赤外白色レーザーとマルチチャンネル検出器とを組み合わせることで、分散型装置でも短時間で FTIR と同質のスペクトルを取得できる可能性が出てきた。分散型装置は、狭い波数範囲のキーバンドに着目してそのダイナミクスを詳しく調べたいときに有効である。特に高輝度のフェムト秒レーザー光源は、吸光度が極めて高いスペクトル領域を観測するのに適しており、たとえば水溶液 (H₂O) 中の蛋白質のアミド I や Asp/Glu の CO 伸縮振動の微小変化を高精度で検出したいときにその効果を発揮する。本研究では、フェムト秒赤外レーザーを使用した分散型の時間分解赤外装置を製作し、ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素の CO 光乖離後の蛋白質部分のダイナミクスを時間分解能 50 ns で追跡した。

【実験】 フェムト秒チタンサファイア再生増幅器の出力 (800 nm) を用いて、光パラメトリック増幅器を励起し、そのシグナル出力とアイドラー出力の差周波から、赤外パルス光を得た。このパルス光は、波長可変 (3-16 μm)、広帯域 (>300 cm⁻¹ FWHM)、高出力 (10 μJ/pulse)、高安定性 (< 5 % p-p)、高繰り返し周波数 (1 kHz) であった。

中心波長 6.1 μm の赤外パルス光を probe 光と参照光 (probe 光の強度揺らぎ補正用) に分け、それぞれを回転セル (1300 rpm) 中の CO 結合型チトクロム *c* 酸化酵素に照射した。それぞれの透過光を分光器に導入して分散後、上下二段の 64 チャンネル HgCdTe 検出器を用いてスペクトルを取得した。検出器からの信号は 1 パルス毎に 16 bit で AD 変換した。

CO 光乖離用の pump 光には、Nd:YAG レーザーの第二高調波 (25 ns, 532 nm, 1 kHz, 200 μJ/pulse) を用い、回転セル中で probe 光と重ねた。ただし、光チョッパーを用いて pump 光を 500 Hz でチョッピングし、probe 光に pump on/off の変調を 500 Hz でかけた。pump on/off の差スペクトルを 2 ms 毎に計算し、差スペクトルを積算した。pump 光、probe 光、光チョッパー、AD 変換器は全て同期させており、pump 光と probe 光のジッターは ±25 ns であった。

時間分解差スペクトルの遅延時間は 50 ns-200 μ s までの 11 点を選び、それらをランダムな順番で測定した。各遅延時間のスペクトルの積算時間は 10 秒で (pump on 5000 パルス /pump off 5000 パルス)、差スペクトルのノイズレベルは 50 μ O.D.以下であった。

【結果と考察】 CO 結合型チトクロム *c* 酸化酵素では CO はヘム鉄 ($\text{Fe}_{\text{a}3}^{2+}$) に結合しているが、光乖離後 CO は、ps で $\text{Fe}_{\text{a}3}^{2+}$ から 5Å の距離にある銅原子 (Cu_{B}) に移動し、 μ s で Cu_{B} から蛋白質外部へ拡散することがわかっている。このダイナミクスは、 $\text{Fe}_{\text{a}3}^{2+}$ -CO と Cu_{B} -CO の CO 伸縮振動 (それぞれ 1963 cm^{-1} と 2063 cm^{-1}) を観測することで、本装置でも確認した。

さらにリガンドの脱着に伴う蛋白質部分の構造変化を調べるために、アミド I 領域の時間分解赤外差スペクトルを測定した (図 1)。最大吸光度変化は~1 mO.D.であり、蛋白質部分の構造変化は極めて小さいかあるいは局所的であったが、本装置は sub-mO.D.レベルの微小変化を精度良く捕らえることに成功した。特に ns の時間領域でも sub-ms と同質のスペクトルが得られたことは分散型装置を使用した結果であり、50 ns でのアミド I の変化から $\text{Fe}_{\text{a}3}^{2+}$ -CO の乖離に伴う蛋白質骨格の速い構造変化の存在が明らかとなった。また μ s の時間領域でもアミド I に変化が見られ、 Cu_{B} -CO の乖離に伴う蛋白質骨格の構造変化も明らかとなった。後者は、過去の共鳴ラマン測定で観測された $\nu(\text{Fe}_{\text{a}3}^{2+}\text{-His})$ の波数変化に対応するものと考えられ、Helix X の構造緩和である可能性が高い。

チトクロム *c* 酸化酵素への応用から、本装置は 10 秒の測定で sub-mO.D.レベルの変化を検出できることが示された。本装置の汎用性を高めるために、現在フローセルを開発中である。酵素と基質を混合したあとの蛋白質の構造ダイナミクスの追跡が最終目標である。

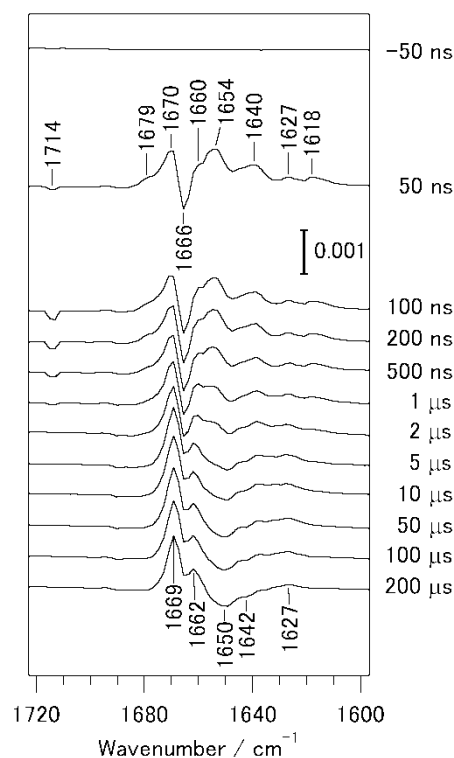


図 1. ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素 (1 mM, H_2O 緩衝液中) の CO 光乖離後の時間分解赤外差スペクトル (光乖離型 - CO 結合型)。波数精度 $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 。光路長 15 μm 。