

## 水溶液中のタンパク質の高感度時間分解赤外分光測定

(<sup>1</sup>兵庫県立大・院・生命理, ピコバイオロジー研究所, <sup>2</sup>兵庫県立大・院・生命理, 生命科学専攻) ○久保稔<sup>1</sup>, 山口悟<sup>2</sup>, 望月正雄<sup>1</sup>, 伊藤-新澤 恭子<sup>2</sup>, 吉川信也<sup>1,2</sup>, 小倉尚志<sup>1,2</sup>, 中島聡<sup>1</sup>

**【序】** 赤外分光法は、官能基の分子振動を通して、プロトン移動や水素結合ネットワークの変化を検出できる実験手段であり、タンパク質の反応機構を理解する上で、X 線結晶構造解析と相補的な役割を担う重要な構造解析手法である。しかし、水溶液中のタンパク質への適用はまだ限られているのが現状である。その最大の理由は、水の赤外吸収が非常に強いため、生理条件下でのスペクトル測定が極めて難しいからである。したがって、タンパク質の赤外分光においては、従来の測定法で可能な研究が進められる一方で、生理条件下で反応を観測できる新しい赤外分光技術の開発が求められてきた。そこで本研究では、フェムト秒レーザーを用いて、生理条件下（室温・水溶液中）であってもタンパク質の構造変化を高感度で追跡できる新しい時間分解赤外分光装置を開発し、ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の CO 光解離後の構造ダイナミクスの追跡に応用した。

**【実験】** 光源にはフェムト秒赤外パルス光を使用した。従来の黒体輻射光源と比べて桁違いに輝度の高いフェムト秒パルス光を使用することで、たとえ水が存在しても高感度測定に十分な光子数を得た。赤外パルス光は、Ti:S ベースのフェムト秒パルスから、OPA、DFG によって発生させた。このパルス光は、波長可変 (3-16  $\mu\text{m}$ )、広帯域 ( $>350 \text{ cm}^{-1}$  FWHM)、高出力 (10  $\mu\text{J/pulse}$ )、高安定性 ( $< 5\%$  p-p)、高繰り返し周波数 (1 kHz) であった。

赤外パルス光をビームスプリッターで分割後 (probe 光と参照光)、それぞれを同一試料の異なる場所に照射した。それらの透過光をイメージング分光器で分散後、上下二段の 64 チャンネル HgCdTe 検出器で検出した。検出器からの信号は 1 パルス毎に 16 bit で AD 変換した。

試料セルは、テフロンスペーサーを 2 枚のフッ化カルシウム窓板で挟んだものを使用し、1300 rpm で回転させた。試料の温度は、冷却された  $\text{N}_2$  ガスをセル窓板に吹き付けることで、約 25 °C に保った。水蒸気の影響を除くために、光学系はチャンバーの中に入れ、内部を乾燥空気で満たした (湿度 $<5\%$ )。

CO 光解離のトリガーには Nd:YAG レーザーの第二高調波 (25 ns, 532 nm, 1 kHz, 150  $\mu\text{J/pulse}$ ) を用い、pump-probe 法によりナノ秒からサブミリ秒のダイナミクスを観測した。ただし、光チョッパーを用いて pump 光を 0.5 kHz でチョッピングし、pump on, pump off のスペクトルを交互に測定した。pump on/off の差スペクトルを 2 パルス毎に計算し、差スペクトルを積算した。このとき、probe 光の強度を常に参照光の強度で割ることで、pulse-to-pulse の強度ゆらぎを補償した (これによりスペクトルの S/N 比は約一桁改善された)。遅延時間は 50 ns - 100  $\mu\text{s}$  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 1 分程度であった (pump on 24000 パルス/pump off 24000 パルス)。

**【結果と考察】**CO 光解離後の CcO の Amide I 領域のナノ秒時間分解赤外差スペクトルを図 1A に示す。ただし、pump 光と probe 光は共に直線偏光であるので、それらが互いに平行あるいは垂直となる配置で測定を行ない、等方的に平均化されたスペクトル ( $\Delta A = (\Delta A_{\parallel} + 2\Delta A_{\perp})/3$ ) を計算することで、回転緩和の効果を除いてある。このスペクトル領域は水の強い吸収とタンパク質骨格の強い吸収を含むが (本実験条件では、1640-1660  $\text{cm}^{-1}$  の領域の O.D.  $\sim 1.8$ )、微小なスペクトル変化を高感度で検出することに成功した。

最も強度の小さな変化は 1691  $\text{cm}^{-1}$  に negative peak として観測された。この信号の拡大図を図 1B に示す。この信号強度は 72  $\mu\text{OD}$  であり、測定誤差は  $\pm 14 \mu\text{OD}$  であった。吸収の強い 1640-1660  $\text{cm}^{-1}$  の領域でも感度は同じレベルであり (図 1C)、これらの結果から、本装置を用いると、1 分の積算で S/N 比  $\sim 15000$  のスペクトルを取得できることがわかった。

最も顕著なスペクトル変化は、1655(+)/1666(-)  $\text{cm}^{-1}$  に見られた (図 1A)。このバンドペアは 50 ns 以内に現れ、 $\sim 2 \mu\text{s}$  で消失する。これらのバンドの強度、CO フリー型・CO 結合型の X 線結晶構造解析<sup>1</sup>、および時間分解共鳴ラマン分光測定<sup>2</sup>のデータから、1655(+)/1666(-)  $\text{cm}^{-1}$  の信号は、Helix X に存在する bulge 部位 (unpaired backbone C=O) の構造変化を反映していると考えられた。他のスペクトル領域の測定や Global fitting による解析と合わせて、詳細は当日議論する。

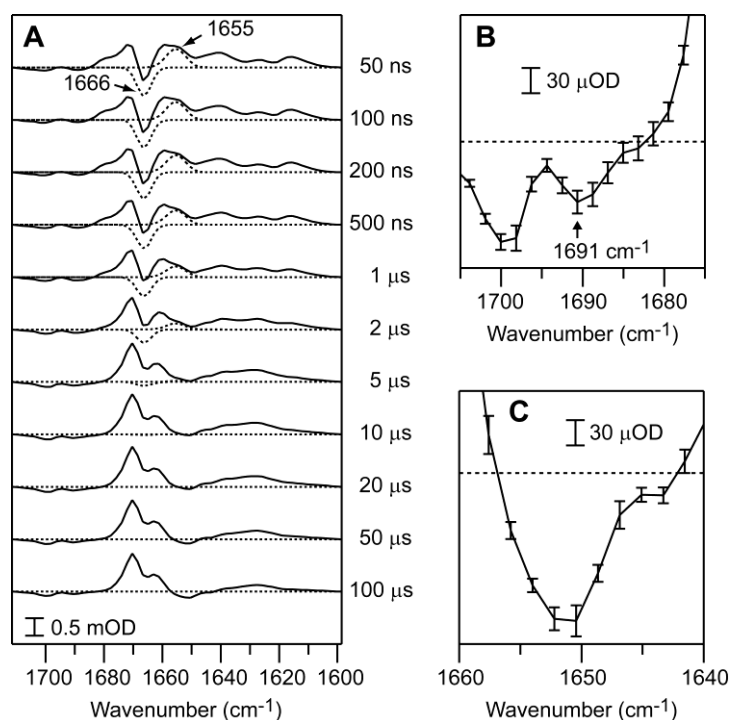


図 1. (A) CO 光解離後の CcO の時間分解赤外差スペクトル. CcO 濃度 0.68 mM ( $\text{H}_2\text{O}$  緩衝液中), 光路長 13  $\mu\text{m}$ . (B) および (C) はそれぞれ, 1675-1705  $\text{cm}^{-1}$  および 1640-1660  $\text{cm}^{-1}$  の領域における 100  $\mu\text{s}$  のスペクトルの拡大図. エラーバーは 5 回の実験の標準偏差.

1. K. Muramoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7881 (2007); K. Muramoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 7740 (2010).
2. E. W. Findsen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5367 (1987).