

2B05

紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光による

イエロープロテイン発色団の超高速励起状態構造ダイナミクスの観測

(東工大院・理工¹, 理研・田原分子分光²)

○倉持光^{1,2}, 竹内佐年², 田原太平²

生化学的な機能や応答は様々な時間スケールで起こるタンパク質の構造変化と密接な関係を持つため、それらを理解するためには中間状態の構造を知ることが重要である。特に光受容タンパク質における構造変化は多くの場合、内包された発色団の光吸収によって引き起こされる発色団自身の、蛋白質全体から見れば非常に小さな構造変化をトリガーとして開始し、タンパク質はサブピコ秒から時には数秒に渡る高次構造変化を伴う光サイクルを経ながら機能を発現する。このような機能・構造相関の観点から様々な光受容タンパク質が活発に研究されている。とりわけイエロープロテイン(Photoactive Yellow Protein: PYP)は

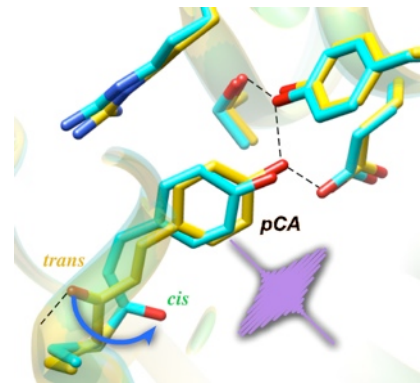


図1. PYP中におけるpCAのtrans-cis光異性化。

は紅色光合成細菌(*Halorhodospira halophila*)の負の走行性を担う光受容タンパク質として知られ、その機能発現の分子レベルでの仕組みに興味を持たれている。これまでの研究から、PYPの機能発現の分子機構はCys69に繋がれた発色団p-クマル酸 (pCA) のtrans-cis異性化に始まり(図1)、OH基のプロトン付加、脱離を含む数百ミリ秒で完了する光サイクルによると考えられている[1]。しかし、その光サイクルは多くの中間体を含む複雑なものであるため、未だに明らかでない点も多い。特に、光サイクルを開始させると考えられる最も重要なpCAのtrans-cis異性化については、赤外ポンプ・プローブ分光により光励起後 3 ± 1 psでcis体が生成すると提唱されているが[2]、励起状態における構造変化を直接観測した例は今までにない。そこで我々は今回新たに開発した紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光法(UV-FSRS)を用い、PYPの発色団であるtrans-pCA単体の励起状態における超高速構造ダイナミクスの観測を行った。

図2に示す通りFSRS[3-5]ではまず光反応を開始させるための励起光(Ex)により電子励起状態を生成させる。任意の遅延時間の後、励起状態の吸収に共鳴する狭帯域ラマンポンプ光(Rp)とフェムト秒白色光(Pr)を同時に照射し、励起状態の振動をラマン利得信号として検出する。この方法による時間分解スペクトル測定の波数分解能と遅延時間精度はそれぞれRp光の帯域幅、Ex光とPr光の相互相関幅で決まる。このため従来の時間分解自発ラマン分光法とは異なり高い波数分解能を保ちながらも数十

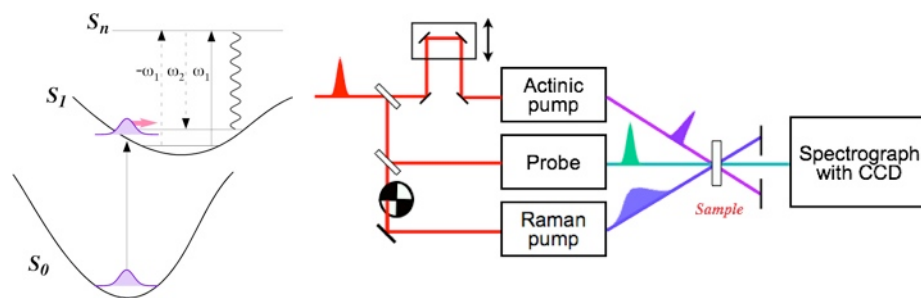


図2. FSRSの実験スキームと装置図。

フェムト秒の時間スケールで遅延時間を変えつつラマンスペクトルを測定することができる。実験では光源としてチタンサファイア再生増幅器の出力(800 nm, 80 fs, 1 kHz)を用い、OPAの第4高調波(300 nm)をEx光として、またCaF₂中で発生させたフェムト秒白色光をPr光として用いた。また紫外Rp光には狭帯域OPAの出力の第2高調波(350-375nm)を用いた。時間、波数分解能はそれぞれ約150 fs, 15 cm⁻¹であった。

図3にリン酸緩衝溶液(pH=7.0)中における $trans$ -pCAの吸収、蛍光スペクトルと315 nmで光励起した場合に得られるフェムト秒過渡吸収スペクトルを示す。まず光励起直後には375 nmをピークとして320 nm から450 nmに幅広い励起状態吸収帯が現れる。次にその吸収が約1 psで減衰するとともに、350 nmを中心とする励起状態吸収と420 nmを中心とする誘導放出帯が出現することがわかる。この励起状態吸収と誘導放出はともに2.5 psの時定数で減衰することから、これらの信号は”bright”な最低電子励起状態のポピュレーションの減衰を反映していると考えられる。ここで観測された大きなスペクトル形状変化は光励起後1 psの間にpCAの励起分子に何らかのダイナミクスがあることを示唆している。この点を明らかにするために我々は、Rp光の波長がこれらの励起状態吸収に共鳴する条件でUV-FSRS測定を行った。光励起直後の吸収に強く共鳴する375 nmのRp光を用いた場合に観測されるUV-FSRSスペクトルを図4に示す。観測はストークス側で行っている。この図から分かるように、800 cm⁻¹から1700 cm⁻¹にかけて複数の過渡ラマンバンドが観測された。これらのバンドは10 ps にかけてほぼ消失するが、その中でも1180, 1370, 1630 cm⁻¹付近のバンドは特に減衰が速く、励起後約1 psにおけるスペクトル形状は励起直後におけるそれとは大きく異なる。この結果は励起後1 ps以内に大きな構造変化が起こっていることを示しており、異性化がサブピコ秒で進行している可能性を強く示唆している。講演では、過渡吸収およびUV-FSRSデータの定量的な解析結果に基づいてPYP発色団分子の励起状態における構造ダイナミクスについて詳細に議論する。

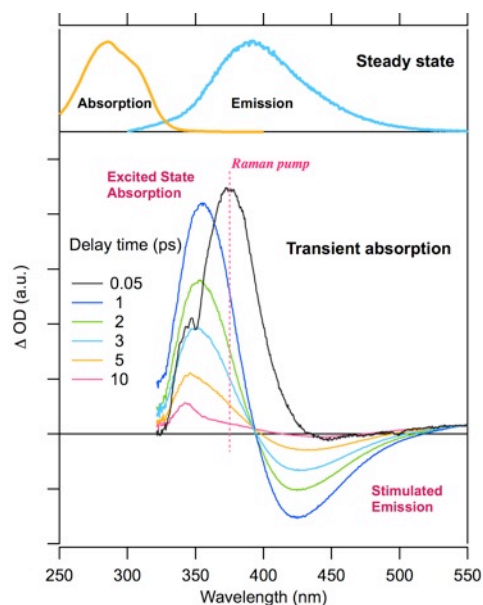


図3. $trans$ -pCAの定常状態吸収、蛍光スペクトル及びフェムト秒過渡吸収スペクトル。

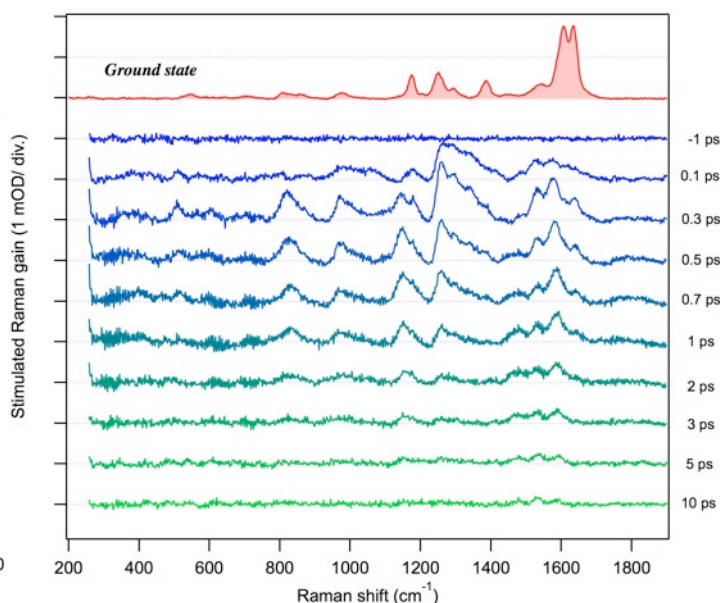


図4. UV-FSRSスペクトル(Rp=375 nm)と基底状態におけるラマンスペクトル。

【参考文献】

- [1] Hellingwerf, K. J.; Hendriks, J.; Gensch, T. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 1082. [2] Heyne, K.; Mohammed, O. F.; Usman, A.; Dreyer, J.; Nibbering, E. T. J.; Cusanovich, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18100. [3] Yoshizawa, M.; Kurosawa, M. *Phys. Rev. A* **1999**, *61*, 013808. [4] Kukura, P.; McCamant, D. W.; Mathies, R. A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 461. [5] Kovalenko, S. A.; Dobryakov, A. L.; Ernstring, N. P. *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82*, 063102.