

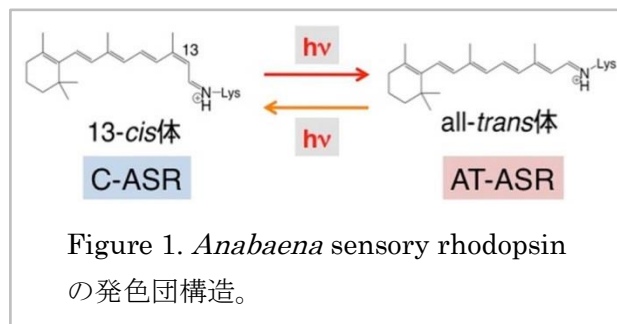
Anabaena sensory rhodopsin のフェムト秒カーゲート蛍光分光測定(¹理研・田原分子分光、²東工大・生命理工)○田原 進也^{1,2}、 Wei Zhengrong¹、 竹内 佐年¹大谷 弘之²、 田原 太平¹Femtosecond Kerr Gate Fluorescence Measurement of
Anabaena Sensory Rhodopsin.(¹RIKEN、²Tokyo Tech.) ○Shinya Tahara^{1,2}、 Wei Zhengrong¹、 Satoshi Takeuchi¹、
Hiroyuki Ohtani²、 Tahei Tahara¹

【序】 レチナル蛋白質は7回膜貫通型蛋白質であり、その内部に、リジン残基のアミノ基とプロトン化シッフ塩基結合したレチナル発色団を持つ。レチナル蛋白質は光を吸収すると、フェムト~ピコ秒の時間領域で発色団の光異性化を起こし、それに続くナノ秒から秒の時間領域での反応により生理機能を発現する。有機溶媒中におけるレチナル分子は部位特異性の低い異性化を起こし、その量子収率は0.2程度と低い。一方、蛋白質中のレチナル発色団は完全に部位特異的な異性化を起こし、その量子収率は有機溶媒中よりも2~3倍高い。このような蛋白質中の反応の高い部位特異性と量子収率を実現するメカニズムは興味深い。

レチナル蛋白質の中でも古細菌型ロドプシンは、*all-trans* レチナルを有する *all-trans* 体と、*13-cis* レチナルを有する *13-cis* 体の混合物である。Bacteriorhodopsin のような従来の古細菌型ロドプシンにおいては、*13-cis* 体から *all-trans* 体への一方向のみの光変換が起こるため、明順応状態(光定常状態)において *all-trans* 体がほぼ100%を占め、*13-cis* 体はわずかにしか存在しない。ゆえに古細菌型ロドプシンにおいて、*all-trans* 体の光反応過程や生理機能はよく理解されているが、*13-cis* 体については光異性化とそれに続く光反応が起こることは知られているものの、その詳細は明らかにされていない。

ところが、近年発見された *Anabaena* sensory rhodopsin (ASR)では、*all-trans* 体と *13-cis* 体との間に光相互変換反応が起こり、明順応状態において60~80%の蛋白質が *13-cis* 体として存在する(Fig. 1)[1]。したがってASRはこれまで困難であった *13-cis* 体レチナル蛋白質の光反応の研究に最適な系であるといえる。

そこで今回、我々は時間分解カーゲート蛍光分光装置を構築し(Fig. 2)、それを用いてASRの超高速蛍光ダイナミクスを研究した。励起光源として高繰り返し光源を用いた測定では、寿命の長い光反応中間体を再度励起する可能性があるが、本測定では1 kHz 励起光源を用いたため、それによる寄与を除くことができた。これにより、ASRの励起状態ダイナミクスが明らかとなったので、その詳細について報告する。



【実験】 ASR を大腸菌に発現させ、n-dodecyl- β -D-maltoside によって可溶化後、Ni²⁺-NTA カラムにより精製した。試料の光学濃度ならびに体積はそれぞれ 6 OD₅₅₀/cm, 5 mL であった。励起光の繰り返し、中心波長およびパルスエネルギーはそれぞれ 1 kHz, 550 nm, 40 nJ/pulse であった。カー媒質にはブロモベンゼンを用いた。ゲート光は 1100 nm, 15 μ J/pulse とした。装置応答関数の半値全幅は 250 fs であった。

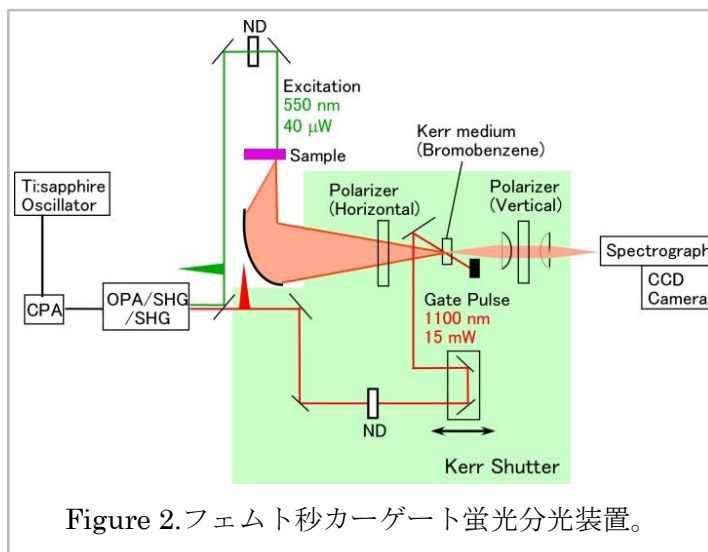


Figure 2. フェムト秒カーゲート蛍光分光装置。

【結果および考察】 いくつかの遅延時間で測定した時間分解蛍光スペクトルを示す(Fig. 3)。また、これらのスペクトルを波長 620 nm から 760 nm まで積分し、時間トレースを得た。時間トレースを、2 成分指数関数フィッティングによって時定数解析を行ったところ、500 fs および 1.8 ps の時定数が得られた。2 成分の振幅比は約 3 : 1 であった。

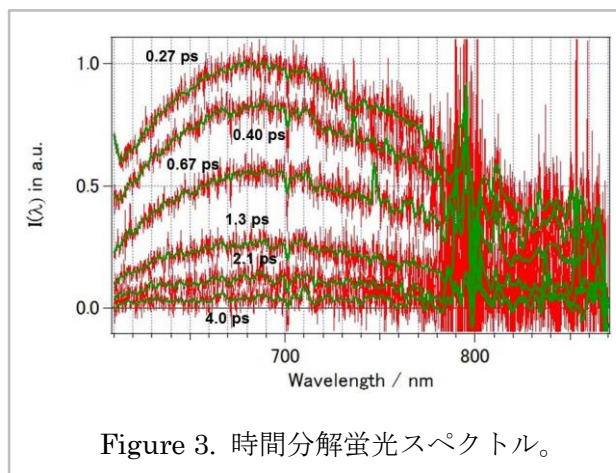


Figure 3. 時間分解蛍光スペクトル。

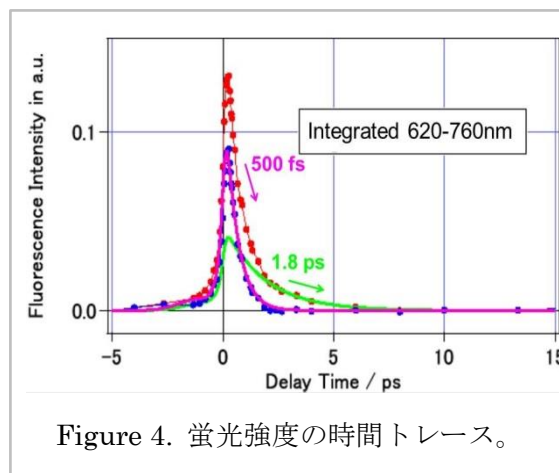


Figure 4. 蛍光強度の時間トレース。

すでに報告されている ASR のフェムト秒過渡吸収分光測定結果によると、遅延時間約 30 ps 程度で基底状態における最初の間体の生成が完了する[2]。ところが我々の結果は 10 ps 以内に蛍光が完全に消失することを示している。したがって過渡吸収分光測定における 10 ps 以降の吸光度変化は、電子励起状態のダイナミクスではなく、基底状態の振動緩和過程ないしは中間体の反応過程に起因することが示唆される。

[1] A. Kawanabe *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8644-8649.

[2] A. Wand *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 33, 20922-20932.