

3D14

イエロープロテイン励起状態における超高速水素結合ダイナミクス

(理研・田原分子分光¹、奈良先端大・物質創成²)

○倉持光¹、竹内佐年¹、米澤健人²、上久保裕生²、片岡幹雄²、田原太平¹

Ultrafast Hydrogen-Bonding Dynamics of Photoactive Yellow Protein in the Excited State

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN¹, Nara Institute of Science and Technology²)

Hikaru Kuramochi¹, Satoshi Takeuchi¹, Kento Yonezawa², Hironari Kamikubo², Mikio Kataoka², and Tahei Tahara¹

イエロープロテイン(Photoactive yellow protein: PYP)は紅色光合成細菌より単離された光受容タンパク質で、青色の光に対して負の走光性を誘起すると考えられている。PYPの機能は発色団 p-クマル酸(pCA)のフェムト秒〜ピコ秒スケールで進行する *trans-cis* 光異性化により始まり、多くの過渡種を伴ったミリ秒に渡る光サイクルを通じて発現するとされている[1]。構造・機能相関の観点からこの光サイクル中における PYP の構造変化に興味を持たれており、特に pCA の *trans-cis* 異性、フェノール部位のプロトン化状態、周辺残基との水素結合構造についてこれまで様々な分光学的手法を用いて詳細な研究がなされてきた。しかし、従来の手法で観測できるのは多くの場合およそ 100 ps 以降の時間領域で起こる構造変化に限られているため、機能発現機構の解明において重要である初期過程、すなわちフェムト秒〜ピコ秒における構造ダイナミクスに関する包括的な理解は実験上の困難から未だに得られていない。

このような状況のもと以前我々は独自の紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光法(UV-FSRS)を用いて PYP 励起状態の構造ダイナミクスを研究した[2]。観測された指紋領域の共鳴ラマンスペクトルは励起状態の寿命の間同一のスペクトル形状を示したため、発色団 pCA は *trans* 構造を保ち、励起状態における骨格構造変化は小さいことが明らかとなった。一方、フェムト秒可視励起-赤外プローブ分光、芳香族アミノ酸残基に対するピコ秒ラマンを用いた先行研究は、発色団近傍の水素結合状態が光吸収の数ピコ秒後にはすでに変化していることを示した。これらの知見から、発色団周辺の水素結合構造の素早い変化が PYP 初期過程で重要な役割を果たしていることが示唆される[3, 4]。そこで、今回我々はフェムト秒時間分解インパルスラマン分光法(TR-ISRS)を用いて PYP 野生株および変異体の励起状態におけるフェムト秒構造ダイナミクスを詳しく検証した。この時間領域分光によりタンパク質-発色団間の分子間振動など低波数領域の振動構造とダイナミクスが明らかになったので報告する。

実験ではまず光反応を開始させるための励起光 (450 nm, 150 または 40 fs) により電子励起状態を生成させた。任意の遅延時間 ΔT の後、PYPの誘導放出遷移 ($S_1 \rightarrow S_0$) に共鳴する可視極短パルス (520-700 nm, 10 fs) を照射し、インパルス誘導ラマン散乱過程を利用し電子励起状態に核波束運動を誘起した。この核波束運動を時間分解吸収信号のビート成分の形でプローブ光 (520-700 nm, 10 fs) を用いて検出し、励起状態の分子振動を時間領域で観測した。

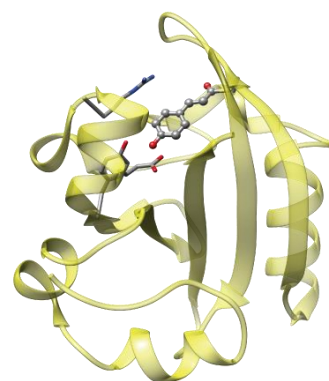


図 1. PYP 中における pCA および周辺アミノ酸残基の構造

図 2A に PYP の $\Delta T=100$ fs おける TR-ISRS 信号の時間変化を示す。信号は誘導放出遷移に伴った励起状態のポピュレーション変化 (図中点線) に加え、励起状態における核波束運動に起因するビート成分を含んでいる。この TR-ISRS 信号を様々な遅延時刻 ΔT において測定し、ポピュレーション成分を差し引いた後に得られるビート成分を図 2B に示す。これらの時間領域の信号をフーリエ変換して得られた周波数領域の振動スペクトルを図 2C に示す。1200 cm^{-1} までの領域に複数の振動バンドが明瞭に観測されている。これらのバンドは励起状態の寿命に対応して 5 ps にかけて減衰するが、その間において特筆すべきダイナミクスが 135 cm^{-1} および 1158 cm^{-1} のバンドに観測された。すなわち 135 cm^{-1} のバンドは励起直後には大きな強度を持つが、他のバンドより素早く 1 ps 以内に減衰する。また 1158 cm^{-1} のバンドは 5 ps にかけて約 7 cm^{-1} の高波数シフトを示した。これら 2 つのバンドの強度、波数は発色団周辺の水素結合構造の違いを鋭敏に反映することが報告されており [5, 6]、観測されたデータは励起状態における水素結合構造の素早い変化を示しているものと考えられる。講演では水素結合構造を修飾した E46Q 変異体の TR-ISRS データとの比較も交え、PYP 光反応初期過程における超高速水素結合ダイナミクスについて詳細な議論を行う。

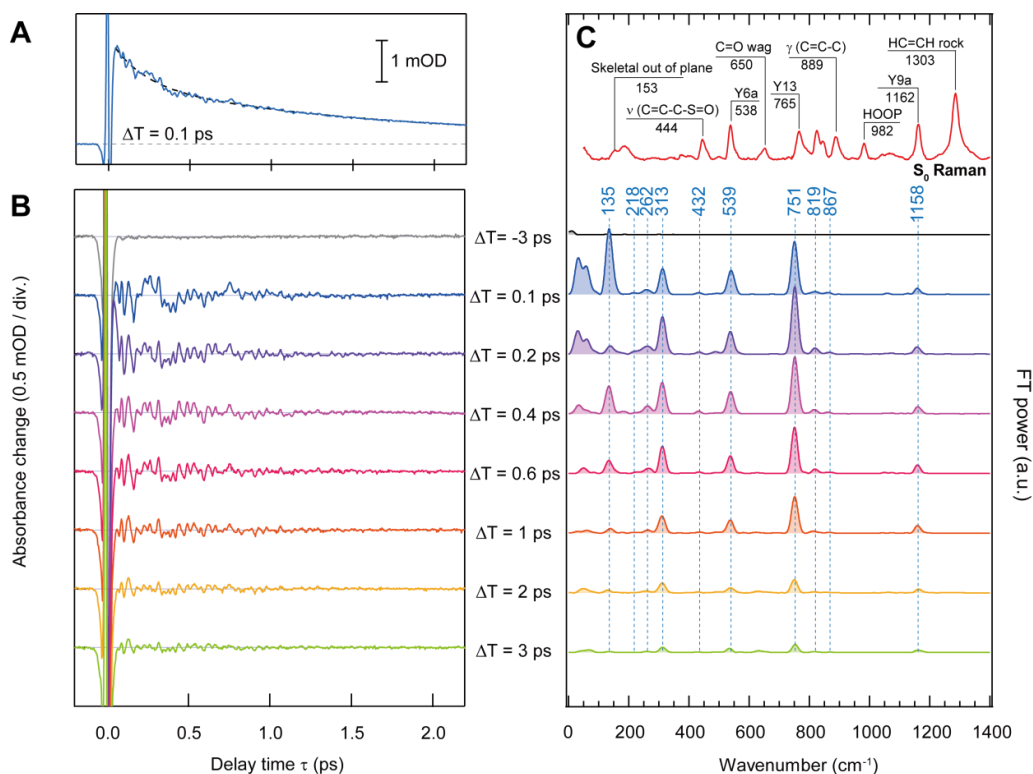


図 2. (A) $\Delta T=100$ fs において得られた TR-ISRS 信号。(B) 各遅延時刻 ΔT における TR-ISRS 信号に含まれるビート成分。(C) ビート成分の FT パワースペクトル、および基底状態のラマンスペクトル。

【参考文献】

- [1] K. J. Hellingwerf, J. Hendriks, T. Gensch, *J. Phys. Chem. A* **107**, 1082 (2003). [2] 倉持光・竹内佐年・上久保裕生・片岡幹雄・田原太平, 第 6 回分子科学討論会, 2012, 1B06. [3] M. L. Groot *et al.*, *Biochemistry* **42**, 10054 (2003). [4] M. Mizuno, H. Kamikubo, M. Kataoka, Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. B* **115**, 9306 (2011). [5] H. Chosrowjan *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **108**, 2686 (2004). [6] Y. Zhou, L. Ujj, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, G. H. Atkinson, *J. Phys. Chem. A* **105**, 5719 (2001).