

## 急速緩衝液交換法による時間分解全反射赤外分光法の開発

(分子研<sup>1</sup>, 総研大<sup>2</sup>, ユニソク<sup>3</sup>) ○古谷 祐詞<sup>1,2</sup>, 木村 哲就<sup>1,2</sup>, 岡本 基士<sup>3</sup>

### Development of a rapid buffer-exchange system for time-resolved ATR-FTIR spectroscopy

(Institute for Molecular Science<sup>1</sup>, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI)<sup>2</sup>, UNISOKU Co., Ltd.<sup>3</sup>)

○Yuji Furutani<sup>1,2</sup>, Tetsunari Kimura<sup>1,2</sup>, Kido Okamoto<sup>3</sup>

【序】 イオンチャネルや G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 等の膜タンパク質の動作機構を解明するためには、それらが外界からの情報を受容し、活性化状態を形成する過程での構造変化を明らかにする必要がある。さらに、GPCR においては、G タンパク質との相互作用やその活性化機構を明らかにすることも重要である。これまで光を受容するロドプシンなどの光受容タンパク質に対しては、パルスレーザー等を用いることで、フェムト秒から分に至る様々な時間領域での構造変化やタンパク質間相互作用が様々な分光学的手法により明らかにされてきた。一方、多くのイオンチャネルや GPCR では、基質やイオンなどの結合に伴う構造変化を解析する手法が求められており、ストップフロー法などの手法が考案されている。しかしながら、測定には多量の試料を必要とするなど、改善の余地がある。本発表では、全反射赤外分光法と組み合わせることで、数マイクログラム程度の膜タンパク質試料での時間分解計測を可能とする新しい手法を開発し、塩化物イオンポンプであるファラオニスハロロドプシン (pHR) に適用した<sup>[1]</sup>。

【実験方法】 急速溶液交換装置および ATR セル上に構築したチャンバーを図 1 に示す。2 本のシリンジの内、1 本には反応させるための溶液、もう 1 本には洗浄用の溶液を入れる。溶液はリザーバーに準備しておくことで、装置が必要に応じてシリンジに充填する。本研究では、pHR の塩化物イオンおよび硝酸イオンの結合を解析するために、1 つは 200 mM MOPS (pH 7.0), 20 mM NaCl もしくは NaNO<sub>3</sub>、もう 1 つには 200 mM MOPS (pH 7.0)のみを使用した。サンプルが存在しない状態での溶液交換反応においては、50 mM NaNO<sub>3</sub> と超純水を使用した。

ATR セルの上に図 1(B)に示すようなチャンバーを作製した。流路などを含めてチャンバーの容積は 40  $\mu$ l 程度であり、1 回の溶液交換反応では 100  $\mu$ l の溶液を使用した。シリンジの容積は 2.5

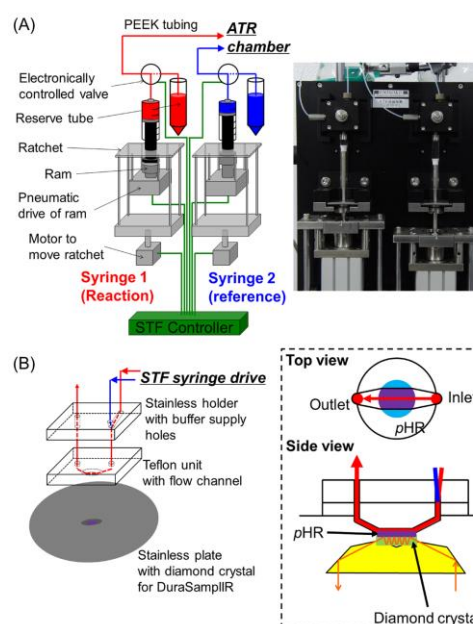


図 1 急速溶液交換装置(A)および ATR チャンバーの模式図(B) ([1]より転載)

mL であり、17 回の交換反応毎に、リザーバーからシリンジへと溶液を再度充填する操作を行うことで、計測に必要な回数の交換反応を繰り返した。反応用のシリンジは 0.12 MPa の圧縮窒素ガスにより駆動し、洗浄用のシリンジはモーター駆動で操作した（装置の動作については[1]の BIOPHYSICS 誌の Web サイトにて確認可能）。ステップスキャン計測においては、波数分解能  $8\text{ cm}^{-1}$ 、 $1900\text{-}988\text{ cm}^{-1}$  の波数領域、333 点のサンプリングポイントにおいて、 $2.5\text{ ms}$  の時間分解能で 2000 点、合計  $5\text{ s}$  の時間分解計測を行い、インターフェログラムを構築した。得られたインターフェログラムはフーリエ変換操作にて、シングルビームへと変換し、溶液交換前の時間領域のスペクトルをリファレンスとして計算することで時分割の赤外差スペクトルを得た。

【結果と考察】 ATRセル上で、試料を何も乗せずに、 $50\text{ mM}$  の硝酸塩溶液を超純水と交換する反応を行ったところ、約  $25\text{ ms}$  で溶液が置換していることを硝酸イオンの NO 伸縮振動 ( $1350\text{ cm}^{-1}$ ) バンド強度の時間変化より確認した。次に、約  $8\text{ }\mu\text{M}$  の pHR リポソーム再構成試料  $10\text{ }\mu\text{l}$  を ATR セル上で乾燥させた後に、 $200\text{ mM}$  MOPS (pH 7.0) の緩衝液に浸した。その後、硝

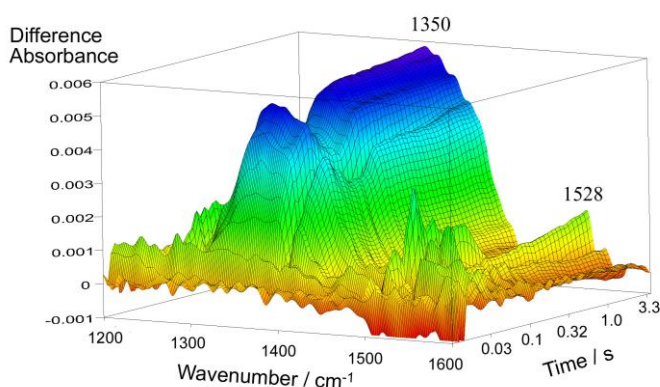


図 2 pHR の硝酸イオン結合に伴う時分割赤外差スペクトル ([1]より転載)

酸塩溶液の交換実験と同様に溶液交換装置を駆動させ、硝酸イオンおよび塩化物イオンの結合実験を行った。硝酸イオンの結合過程について図 2 に示した。硝酸イオンの NO 伸縮振動の増大が約  $25\text{ ms}$  で増大する反応が同様に確認され、それと共にレチナールのポリエチレン共役鎖の C=C 伸縮振動 ( $1528\text{ cm}^{-1}$ ) に由来するバンドの増大も確認できた。また、塩化物イオンの結合に関しても、同一の試料に対して行った。その結果、 $1528\text{ cm}^{-1}$  のバンドは硝酸イオンよりも大きい変化であったが、これは pHR において硝酸イオンの解離定数が  $11\text{ mM}$  であり、塩化物イオンでは  $2\text{ mM}$  であることを反映しているものと考えられる。塩化物イオンの結合過程について、指数関数でフィッティングしたところ、 $35\text{ ms}$  と  $1.3\text{ s}$  の時定数が得られた。これは、pHR を界面活性剤で可溶化した条件下で、ストップフロー法を可視吸収分光計測で行った実験回から得られた値、 $16\text{ ms}$  と  $200\text{ ms}$  よりも少し遅い反応であった。最初の時定数については装置の溶液交換速度が遅いためかもしれないが、脂質と界面活性剤との試料条件の違いを反映しているのかもしれない。

【今後の展望】 本手法は、膜タンパク質のイオンや基質などの結合及び解離過程での時分割赤外差スペクトル計測を微量の試料で可能とする新規手法である。イオンチャネルやトランスポーター、GPCR 等の膜タンパク質の動作機構の研究に有用な手法になるものと期待している。

#### 【参考文献】

- [1] Furutani, Y., Kimura, T., and Okamoto, K. (2013) *BIOPHYSICS* 9, 123-129.  
 (装置の動画は [https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophysics/9/0/9\\_123/article/supplement](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophysics/9/0/9_123/article/supplement))  
 [2] Sato, M., Kanamori, T., Kamo, N., Demura, M., and Nitta, K. (2002) *Biochemistry* 41, 2452-2458.