

3A04

## バクテリオロドプシンの蛍光励起スペクトルと吸収スペクトルの比較

(東工大院・生命理工) ○生島 英嗣, 大谷 弘之

### Comparison of the fluorescence excitation spectrum and the absorption spectrum of bacteriorhodopsin

(Tokyo Tech Univ) ○Eiji Ikushima, Hiroyuki Ohtani

#### 【序論】

高度好塩菌紫膜由来のバクテリオロドプシン(bR)は光駆動プロトンポンプとして知られるレチナルタンパク質である。bRのS<sub>1</sub>からの光反応は発色団のall-trans型から13-cis型への異性化のみがおきる。その量子収率(0.64±0.04)は励起波長に依らず [1]、あたかもS<sub>1</sub>のv=0振動準位から反応が進行するように見える。しかし、高い振動準位からも反応が起きるとの報告もある [2]。v>0振動準位からの反応の有無は蛍光励起スペクトルの測定によって判定できる。

試料濃度が低いなら、蛍光励起スペクトルの強度はモル吸光係数と蛍光量子収率 $\Phi_F$ の積に比例する。励起波長 $\lambda_{ex}$ における蛍光量子収率 $\Phi_F(\lambda_{ex})$ はFranck-Condon(FC)状態からS<sub>1</sub>のv=0に振動緩和する量子収率 $\Phi_{S_{10}}$ とS<sub>1</sub>のv=0からの蛍光の効率 $\phi_F$ の積で与えられる。 $\phi_F$ は定数であるが、 $\Phi_{S_{10}}$ は $\lambda_{ex}$ に依存する。通常の芳香族炭化水素では $\Phi_{S_{10}}$ が1のため、蛍光励起スペクトルは吸収スペクトルに一致する。しかし、高い振動準位からの反応があるなら短波長側で励起スペクトルの方が相対的に弱くなることが予想される。今回、我々はbRのS<sub>1</sub>←S<sub>0</sub>領域の蛍光励起スペクトルを測定し、吸収スペクトルと比較した。

#### 【実験】

測定試料には紫膜懸濁液(pH7.9, 2.5  $\mu$  M)を用いた。bRの蛍光量子収率が10<sup>-4</sup>未満と非常に弱いので迷光、散乱光、不純物発光などのバックグラウンド(BG)や暗電流の影響を受けやすい。蛍光検出には光子計数法を採用し、暗電流の影響を波高選別機能により除去した(図1内a)。膜断片の散乱は強いので、その補正には色素タンパクを脱色した白色膜(bO)を用いた。このbOは、ヒドロキシルアミン存在下で可視光(>440 nm)を照射し、紫膜を退色させ、さらに紫外光を照射し、レチナルオキシムを光分解させて得た。発色団を持たず、紫膜と同じ膜構造を持つため散乱補正に最適である。励起側分

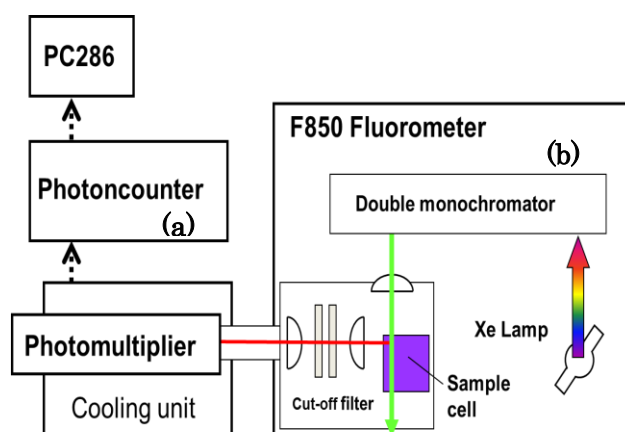


図1 蛍光励起スペクトル測定装置の概略図。  
励起光(→)をセル側面近傍に通し、セルの励起側表面付近の  
蛍光(←)のみを検出する

光器は single monochromator では Xe ランプの近赤外光(bR の蛍光と重なる領域)が除去できず、試料によって散乱され検出器に入る。そのため、double monochromator を備えた蛍光光度計の出力光を使い、励起光の波長純度を上げた(図 1 内 b)。励起光側のバンド幅を 5 nm、掃引速度を 24 nm/min に設定した。励起光の散乱はカットオフフィルタで除いた。蛍光を測定したスペクトルについて励起光強度で規格化した後、BG の補正を行い、蛍光励起スペクトルを得た。励起光のスペクトルは感度補正済みのフォトダイオードを用いて得た。

### 【結果と考察】

$\lambda_F > 730$  nm (IR73 カットオフフィルタを使用)の蛍光の積分強度から得た蛍光励起スペクトル(—)を吸収スペクトル(—)とともに図 1 に示す。 $S_1 \leftarrow S_0$  バンドにおいて 540–650 nm 領域では吸収スペクトルとよく一致した。この領域では Kasha-Vavilov の規則が成り立っているように見える。

一方、540 nm より短波長側では励起スペクトルは吸収スペクトルと相対的に弱めになっており、蛍光量子収率の低下が見られる。吸収の 0-0 バンド(618 nm [3])の  $>2300$   $\text{cm}^{-1}$  上になると振動緩和と反応の競争となる。

図 2 に Schenkl et al. [4]により報告された励起スペクトルを比較のために示した。彼らのスペクトルはピーク付近がプラトー気味であり、長波長側にすそが伸びている。バンド幅は(4000  $\text{cm}^{-1}$  FWHM)となり、吸収スペクトル(3400  $\text{cm}^{-1}$ )より広がっている。短波長側は吸収スペクトルに近くなっているが、この理由は膜断片による散乱の寄与であると考えている。BG 補正に bO でなく水を用いると短波長側が吸収スペクトルに合ってくるからである。

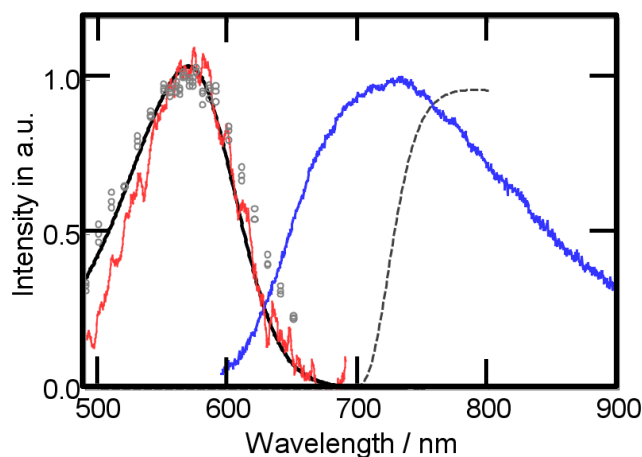


図 2 bR の蛍光励起スペクトル。  
This work(—), Schenkl et al. 2002(O)[4],  
蛍光スペクトル(—)の  $>730$  nm 領域を測定。

### 【参考文献】

1. J. Tittor and D. Oesterhelt (1990) FEBS Lett., 263, 269–273.
2. H. Kandori et al. (1992) J. Phys. Chem., 96, 6067–6071.
3. Pollard et al. (1989) J. Chem. Phys., 90, 199–200.
4. S. Schenkl et al. (2002) Phys. Chem. Chem. Phys., 4, 5020–5024.