

超高速円二色性分光法による生体分子の励起状態ダイナミクス観測

(東大院・理¹, 東大院・総合²) ○平松 光太郎¹, 永田 敬²

Excited-state dynamics of biomolecules studied by time-resolved circular dichroism spectroscopy

(The Univ. of Tokyo) ○Kotaro Hiramatsu and Takashi Nagata

タンパク質をはじめとする生体分子はしばしば小分子とは全く異なる光化学反応を呈し、その励起状態ダイナミクスは実験・理論の両面から広く研究されてきた。このような生体分子の特異的な反応性は多くの場合その3次元的構造が本質的な役割を担っているため、円二色性 (CD) 分光法などのキラリティーに敏感な分光法をポンプ-プローブ法と組み合わせることで、従来の手法では獲得できない過渡種の構造情報が得られると期待される。しかしながら、これまでに開発されてきた時間分解 CD 分光法は測定領域が単一波長である [1, 2]、あるいは、多波長であるが生体分子に適用できるだけの感度を有しておらず [3]、限定的な応用にとどまっていた。より多くの系で時間分解 CD 測定を行い、詳細な励起状態ダイナミクスの議論を実現するために、最近我々は可視域全域 (400 - 720 nm) のマルチプレックス測定が可能で、かつ、従来の時間分解 CD 分光法を大きく上回る感度 (< 1 mdeg) を有するフェムト秒時間分解 CD 分光法を開発した。本研究では、開発した装置でヒト血清アルブミン (HSA) に配位したビリルビン (BR) のフェムト秒時間分解 CD 及び過渡吸収測定を行い、その励起状態ダイナミクスを議論する。

構築した時間分解 CD 分光計では、チタンサファイア再生増幅器 (785 nm, 100 fs, 1 kHz, 2 mJ) を光源に用いた。ポンプ光 (410 nm, 467 nm) は自作した光パラメトリック増幅器からのシグナル光またはアイドラー光の第2高調波と基本波との和周波発生によって生成した。一方、CD 測定には水で発生させたフェムト秒白色光を用いた。白色光をサンプルに入射するプローブ光と、プローブ光の位相測定のために用いるローカルオシレータに分割し、プローブ光は Glan-Taylor 偏光子を用いて鉛直偏光としてサンプルに入射した。プローブ光はサンプル透過後、光学活性による水平偏光成分が発生し、入射光と同じ位相成分 (実部) には旋光分散 (ORD) 由来、 $\pm\pi/2$ だけ位相がずれた成分 (虚部) には CD 由来の電場が観測される。これらを区別

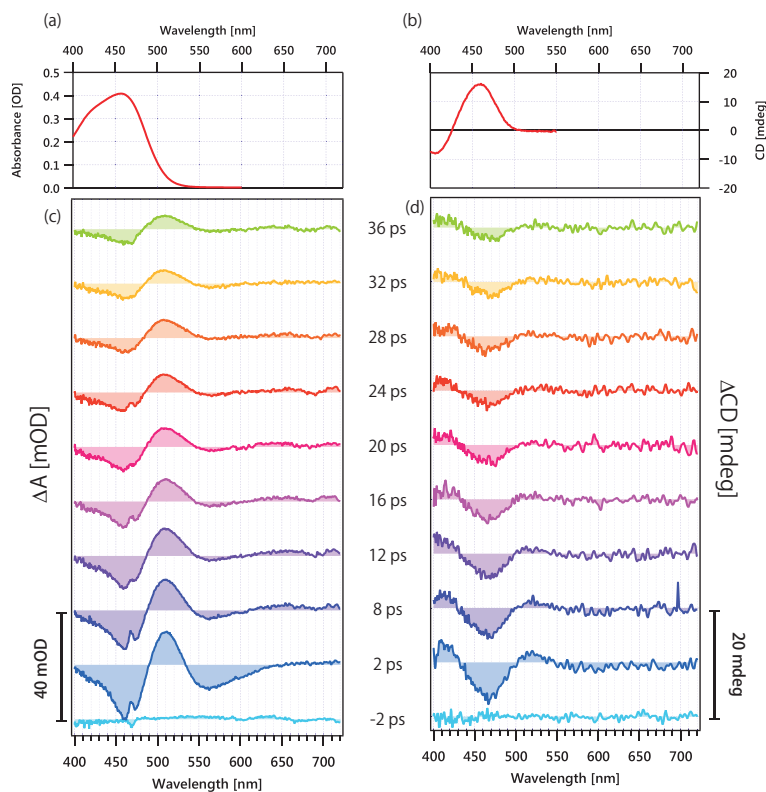


図1 (a,b) BR-HSA complex の定常状態吸収 (a) 及び CD (b) スペクトル, (c,d) BR-HSA complex の光励起後 (励起波長 410 nm) 時間分解吸収 (c) 及び CD (d) スペクトル

して測定するために、サンプル透過光をローカルオシレーターと重ねあわせ、干渉分光法によって透過光の位相を決定することで、CD 及び ORD スペクトルを抽出した。この測定では直線偏光のポンプ光を用いているため、ポンプ光に由来する異方性が系に誘起される。異方性の軸がプローブ偏光と平行でない場合は、直線二色性 (LD) 及び直線複屈折 (LB) 由来の信号が水平偏光成分の実部及び虚部に現れるため、時間分解 CD 測定では、ポンプ偏光とプローブ偏光が互いに厳密に平行となるよう調整する必要がある。本研究では、時間原点において光カー効果信号が最小となるようにポンプ偏光を精密に調整することでこれを実現した。試料は HSA(100 μ M) 及び BR(100 μ M) を Tris-HCl 緩衝溶液 (pH \sim 7.7) に溶解し、光路長 1 mm のフローセル内を循環させながら測定を行った。

BR はアキラルな分子であるが、HSA 等のタンパク質に配位することで 2 つのジピリノン基のなす角度が固定されるため、BR-HSA complex は誘起 CD を示すことが知られている [4]。図 1(a,b) に BR-HSA の定常状態吸収及び CD スペクトルを示す。BR のような 2 つの発色団が相互作用しているとみなせる分子では、励起子カップリングにより発色団由来の吸収帯が 2 つに分裂し (Davydov 分裂)、各々のピークが逆符号の CD を示す。

図 1(c,d) に BR-HSA を 467 nm のポンプ光で励起した後の過渡吸収及び過渡 CD スペクトルを示す。過渡吸収スペクトルは 400 - 500 nm の基底状態吸収のブリーチ (GB)、480 - 550 nm の励起状態吸収 (ESA)、及び 550 - 600 nm における誘導放出 (SE) から成っている。励起後 10 ps 以内に 550 nm 付近の SE が減衰し、それ以降、スペクトルは形を保ちながら約 40 ps の時定数で指数関数的に減衰した。更に、時間分解 CD 測定を行い、BR-HSA の GB, ESA 及び SE に由来する CD スペクトルが観測された。電子励起状態を始状態とする ESA, SE の CD 信号は、基底状態と比べ、その強度が顕著に変化していることを見出した。

Davydov 分裂した BR-HSA の 2 つの吸収帯を 410 nm と 467 nm のポンプ光を用いて選択的に励起し、過渡吸収及び過渡 CD スペクトルを測定したところ、励起後 2 ps 以上経過してもスペクトルの形が顕著に異なる事を見出した (図 2,3)。これは、励起子カップリングにより生じた 2 状態間での内部転換が十分遅く、BR の励起状態ダイナミクスを励起波長によって制御できることを示唆している。講演では、過渡スペクトルの時間変化の定量的な解析を述べるとともに、過渡吸収及び過渡 CD スペクトルの励起波長依存性を励起子カップリングの考え方を拡張することによって議論する。

【参考文献】

- [1] J. W. Lewis *et al.*, J. Phys. Chem. **96**, 5243 (1992). [2] C. Niezborala and F. Hache, J. Opt. Soc. Am. B **23**, 2418 (2006). [3] A. Trifonov *et al.*, Rev. Sci. Instrum. **81**, 043104 (2010). [4] D. Harmatz and G. Blauer, Arch. Biochem. Biophys. **170**, 375 (1975).

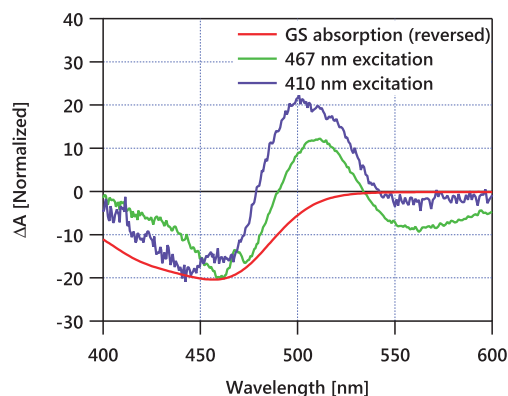


図 2 ポンプ光波長が 410 nm, 467 nm のときの過渡吸収スペクトル, 遅延時間は 2 ps.

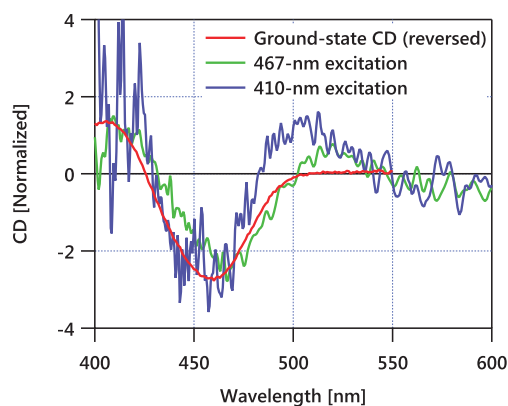


図 3 ポンプ光波長が 410 nm, 467 nm のときの過渡 CD スペクトル, 遅延時間は 2 ps.