紫外共鳴ラマン分光法を用いた SOD1 変異体に共通する 酸化促進性獲得メカニズムの解明

(東北大院·薬) ○藤巻 暢宏、西屋 健、三浦 隆史、中林 孝和

UV resonance Raman studies on the common mechanism of the acquisition of pro-oxidant activity in fALS-linked SOD1 mutants (Tohoku Univ.) N. Fujimaki, K. Nishiya, T. Miura, T. Nakabayashi

[序] 筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) は運動神経細胞を特異的に 障害する神経変性疾患であるが、その原因は未だ解明されておらず難病に指定されている。 家族性 ALS の一部が Cu,Zn-Superoxide dismutase (SOD1) の変異と関連があると報告されたこ とから、ALS 発症メカニズムの解明を目的とした SOD1 の研究が数多くなされている。現在、 変異 SOD1 に起因する酸化ストレスが ALS を発症させる、という酸化ストレス仮説が提唱さ れているものの、変異 SOD1 が酸化ストレスを生成する機構は明らかになっていない。

本研究室における過去の研究から、家族性 ALS 関連変異体の一つである 43 番目の Histidine が Arginine に置換された (His43→Arg, H43R) SOD1 変異体は、(i) 活性中心の Cu と Zn を欠 損する (apo 体になる) ことにより構造不安定性が増加し、pH 7.4、37 ℃の生理的条件下で急 速に不規則構造に富んだ一定の構造へ変化する (変性する) こと、(ii) こうして得られた変性 apo-H43R は、Cu を再結合することで新たに酸化促進性を獲得することが明らかになった (図 1)¹。変性 apo-H43R による酸化促進性の獲得は、生体内において酸化ストレスの上昇を引き 起こし、ALS 発症の一因になると推察される。

一方、家族性 ALS に関連する SOD1 の変異は 160 種類以上報告されており、H43R 以外の 変異体でも同様に酸化促進性を獲得するかどうかは、ALS 治療の観点から重要である。我々 は ALS 研究で汎用される Ala4→Val (A4V) および Gly93→Ala (G93A) 変異体について調べた ところ、H43R と同様に生理的条件下で変性し、酸化促進性を獲得することがわかった²。

異なる変異体でも同様に酸化促進性を獲得することから、変性に伴い構築される酸化促進性の活性中心である Cu 結合部位の構造が共通している可能性が考えられる。そこで本研究で

は、活性中心である Cu 結合部 位の構造解析を行なうことで、 変異 SOD1 が共通して酸化促進 性を獲得するメカニズムにつ いて検討した。



[実験] 229 nm の紫外の励起光を用いたラマン測定では、共鳴効果によって His 残基や Trp 残基のラマンバンドが選択的に増大する。これを利用し、我々はこれまでに H43R について 紫外共鳴ラマンスペクトルの測定を行ない、活性中心となる Cu 結合部位を構成する His 残基 を検出してその結合様式を解析してきた³。そこで今回は、野生型 (apo-WT) および変性させた apo-A4V、apo-G93A に Cu²⁺を添加し、紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した。変性 apo-A4V および変性 apo-G93A から得られるスペクトルについて、H43R や酸化促進性を示さない WT のスペクトルと比較することで、酸化促進性獲得に必要な共通性を考察した。

[結果] 変性 apo-A4V の紫外共鳴ラマンスペクトルを測定したところ (図 2)、Cu の添加 によって Cu が結合した His 残基に由来するバンド (His-Cu) が新たに観測された。この結果 は、Cu 結合部位が His 残基により構成されていることを示している。また、同様に測定した

変性 apo-G93A および apo-WT についても、 His-Cu のバンドが観測された。His 残基は その非対称性から imidazole 環に Nπ位と Ντ位の2つのΝ原子を持つ。紫外共鳴ラ マンスペクトルでは、この2つのN原子の どちらに Cu が結合しているかで異なる位 置にバンドを示す (HisNπ-Cu、HisNτ-Cu)。 これらのバンドを利用して、WT と変性し た変異体との間における Cu 結合部位を構 成する His 残基の配位様式の違いを調べた。 1580 cm⁻¹のHis-Cu のバンド (HisNπ-Cu 由 来のバンドと HisNτ-Cu 由来のバンドが重 なったもの) と 1390 cm⁻¹の HisNπ-Cu のバ ンド、そして 1350 cm⁻¹の HisNτ-Cu のバン ドについて面積強度を見積もり、モデル化 合物のラマンスペクトルの面積強度を用 いて定量を行なった (表1)。定量結果から、 (i) HisNπ-Cu / HisNτ-Cu 比は H43R、A4V、 G93A でどれも同程度であり WT とは異な ること、(ii) His-Cuの総数が H43R、A4V、 G93A では同程度であり、WT とは異なる ことの2点がわかった。どちらも変性した 変異体間で共通していることから、どの変 異体も変性に伴い金属結合部位を native か ら変化させることによって酸化促進性を 獲得していると考えられる。



図 2. 変性 apo-A4V の紫外共鳴ラマン スペクトルおよび Cu²⁺添加の 有無から得た差スペクトル

	His-Cu	HisN π -Cu	HisNt-Cu
変性apo-H43R	4.6	1.1	3.1
変性apo-A4V	4.5	1.0	3.2
変性apo-G93A	4.3	1.4	3.2
apo-WT	5. 6	2.2	2.9

表 1. モデル化合物から算出した定量結果

[考察] 各変異体は変性に伴い活性中心の Cu 結合部位の構造を変化させ、結果の (i)、(ii) として言及した差異を生じさせた。変性 apo-H43R の Cu 結合部位の構造解析に関する我々の 最近の研究から、酸化促進性獲得は変性に伴う Cu 結合部位からの His120 の消失が原因であ るという考察がなされている⁴。今回 A4V と G93A の金属結合部位の構造変化は H43R と酷 似していたため、変異体に共通して His120 が変性に伴い Cu 結合部位から消失し、酸化促進 性獲得に至るという共通のメカニズムが考えられる。

^{1.} Kitamura, F., et al., *Biochemistry*, **50**, 42420 (2011). 2. 西屋健他 第 52 回生物物理学会年会, 1P047 (2014). 3. Fujimaki, N., et al., *Biochemistry*, **52**, 5184 (2013). 4. 藤巻暢宏他 第 42 回生体分子科学討論 会, 34 (2015).

4C02

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)〇平松光太郎¹,永田敬²

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

(The Univ. of Tokyo) \bigcirc 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、±π/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てるため、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 µM) 及び BR(100 µM) を Tris-HCl 緩衝溶液 (pH ~ 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



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.

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】

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

4C03

ペプチドのアミドIIモードの赤外強度に対する水和効果と 2次構造依存性の理論的解析 (静岡大教育) 鳥居 肇・川中 恵

Analysis of the Hydration Effect and the Secondary Structure Dependence of the Infrared Intensities of the Amide II Modes of Peptides (Shizuoka University) Hajime Torii, Magumi Kawanaka

序

ペプチド基には幾つかの特徴的な振動モードが存在し、その振動数位置(および振動数シ フトに伴うバンド形状変化)がペプチド鎖の2次構造に関する情報を与えることは、よく知 られている。しかし、赤外強度の2次構造依存性や、振動数・赤外強度に対する水和の影響 については、解明されていない点が多く、さらに解析を進める必要がある。

主として NH 変角に由来するアミド II モードについては、赤外強度の amide II/amide I 比が $\alpha \sim J \vee \rho Z \Delta f = 0$ 増加に伴って減少することが実験から示されており [1], その原因の 1 つ として、平面形の伸び切り鎖 [C₅構造, (ϕ, Ψ) = (-180, 180)°] の近傍でアミド II の赤外強度 が 1.84 倍程度にまで増大することと、その原因がペプチド基間の電荷フラックス生成にある ことを、alanine dipeptide- d_{10} を対象とした理論計算により示した [2]。本研究では、(i) 溶媒水 分子との水素結合 (N-H...O) のアミド II 赤外強度に対する影響、特に水分子の角度位置への 依存性、(ii) この水和効果と 2 次構造依存性の関係、について理論的解析を行った。

結果と考察

ペプチド基の H 原子を中心に N-H 方向を z 軸とする極座標系 (θ - φ , 但し φ は C-N-H...O 2 面角とする)を定義し,H と直接的に相互作用する O の θ および φ を固定して NMA- $d_{6...H_2O}$ 会合体の構造最適化を行い,アミド II モードの振動数と赤外強度を計算した [B3LYP/ 6-31+G(2df,p)]。なお、多少なりとも非局在化した基準モードからアミド II モードを切り出す ための数値手法 [3] を併用しており,以下同様である。結果を図1に示す。振動数は θ =0° を 中心として分布し、 φ にはあまり依存しない。これは(同様の振舞いを示すアミド I モードの 場合 [4] とは異なり)変角振動としては自然な振る舞いであり、実際(図省略)、このアミド II 振動数は水素結合距離 r(H...O) と良い相関を示す。一方、赤外強度は(θ , φ)=(45°, 180°) で 最も大きく、(15°, 30°) で最も小さくなっており、 θ だけでなく φ にも大きく依存することが わかる。NMA- d_6 孤立分子の赤外強度(248.4 km mol⁻¹) と比較すると、前者は 311.1 km mol⁻¹ で強度の増大、後者は 205.5 km mol⁻¹で強度の減少となっている。この変化は水素結合距離 r(H...O) とは相関しておらず、これは水素結合の強さとの相関が無いことを意味している。

この赤外強度の変化のメカニズムを解析するために、電子密度微分 $\partial(\partial \rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{amII})$ [= $(\partial \rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{amII})_{complex} - (\partial \rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{amII})_{isolated}$]の計算を、 $(\theta, \varphi) = (15^\circ, 0^\circ)$ と (45°, 180°)の角度位置について行った。結果を図2に示す。水分子を $(\theta, \varphi) = (15^\circ, 0^\circ)$ に配置した図2a-cでは、図

上側の NMA-*d*₆分子の N-H 結合周囲における電子密度微分 [図右側 (+y) が負で図左側が正] とは逆符号の電子密度微分が,図下側の水分子の O 原子周囲に生じており,結果として赤外 強度の減少に寄与している。図 2c から明らかなように,この赤外強度減少への寄与は,ほと んど分極効果に由来している。一方,水分子を(θ, φ) = (45°, 180°) に配置した図 2 d-f では,図 下側の水分子の O 原子周囲における電子密度微分は,上側の NMA-*d*₆分子の N-H 結合周囲の ものを打ち消す効果は無く,むしろ赤外強度の増大に寄与している。図 2f から,分極効果が 大きくないことが分かる。分子の向きを変えてとった 1 次元プロット (図省略) から,双極 子微分 (その 2 乗が赤外強度に比例する)の増大のうち或る程度の部分は,2分子間の電荷 フラックスに由来することが分かった。

赤外強度に対するこの水和効果が、2次構造依存性とどのように関係しているかを検討す るため、glycine tripeptide- d_{10} [CD₃CO-(NHCD₂CO-)₂NHCD₃] と数分子の水の会合体を対象とし た計算を行った。C₅構造のペプチド鎖のアミドIIモードの赤外強度は、水素結合 (N-H...O) の 形成により、524 km mol⁻¹から 372 km mol⁻¹に減少するが、他の2次構造 (C₇, ppII, α -helix) や 孤立ペプチド基のもの (~250 km mol⁻¹) より十分に大きく、C₅構造でアミドIIモードの赤外 強度が増大することは、水和の影響を受けても起こることが示された。

K. Kato, T. Matsui, S. Tanaka, *Appl. Spectrosc.* **41**, 861 (1987).
 H. Torii, *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 112 (2012).
 H. Torii, *J. Phys. Chem. A* **108**, 7272 (2004).
 H. Torii, *J. Phys. Chem. Lett.* **6**, 727 (2015).





図1:NMA- $d_{6...}$ H₂O 会合体のアミド II モードの (a) 振動数と (b) 赤外強度 のO 原子角度位置 (θ - φ) 依存性。等高 線は5 cm⁻¹および 10 km mol⁻¹おきに描 かれている。前者の括弧内は 0.986 で スケールした値である。赤色および灰 色の×印は,水素結合会合体が最適化 構造として得られなかった角度位置を 示す。

図2:NMA- $d_{6...}$ H₂O 会合体のアミド II モードについて計算 した電子密度微分の (a,d) 2次元等高線プロット, (b,e) 1次 元プロット, および (c,f) その累積積分。 a-c: (θ, φ) = (15°, 0°); d-f: (θ, φ) = (45°, 180°)。 b,c,e,f の緑色線は, NMA- d_6 を原子上 点電荷で置換して計算したもので, 分極効果を表す。

4C04

マイクロ流体フロー・フラッシュ赤外分光測定系による 一酸化窒素還元酵素の触媒反応の実時間観察 (理研・SPring-8¹, 兵庫県大・院理・生命², JST・さきがけ³) 〇木村哲就¹、石井頌子^{1,2}、當舎武彦¹、城宜嗣^{1,2}、久保稔^{1,3}

Development of micro-channel flow-flash infrared spectroscopy realizing real-time observation of catalytic reaction mediated by nitric oxide reductase.

(RIKEN/SPring-8 Center¹, Univ. of Hyogo/Grad. Sch. of Life Sci.², JST/PRESTO³) O Tetsunari Kimura¹, Shoko Ishii^{1,2}, Takehiko Tosha¹, Yoshitsugu Shiro^{1,2}, Minoru Kubo^{1,3}

ー酸化窒素還元酵素 (NOR) は、ヘム鉄と非ヘム鉄からなる活性中心で2分子のNOをN₂O に還元する膜タンパク質であり (2NO+2H⁺+2e⁻ → N₂O+H₂O) 、細胞毒性の高いNOを速 やかに無毒化する。近年、我々はX線結晶構造解析によって、本酵素の活性中心の構造や電 子・プロトン供給経路を明らかにした (Hino et al. (2010) *Science* **330**, 1666-70) 。しかし、反 応機構に関しては、(i) 2分子のNO がヘム鉄と非ヘム鉄それぞれに結合したNO 結合型が生 成した後、N-N 結合が形成される *trans* 機構と、(ii) 1分子のNO がヘム鉄と非ヘム鉄を架橋

した NO 結合型が生成した後、2 分子目の NO が NO 結合型にア タックする cis 機構が提案され ているが、まだ決着がついてい ない (Fig. 1)。これは機構解明 の鍵となる NO 結合型が極めて 短寿命の中間体であるために、 従来の方法では解析が不可能で あったためである。そこで、酵 素反応 (不可逆反応) に適用可 能なマイクロ秒時間分解顕微可 視・赤外吸収分光装置を新規に



Fig. 1: 提案されている NO 還元反応機構. *trans* 機構では NO 結合型が形成した後, 分子内で N-N 結合が形成する. 一方 *cis* 機構では 2 つ目の NO が NO 結合型にアタックする分子間反応によって N-N 結合が形成する.

開発し、中間体を直接観察することで反応機構の決着を目指した。

本装置では、紫外光照射によってマイクロ秒で NO を放出するケージド NO を反応トリガ

ーとして用いた。さらに、光照射と同期して~10 ナノリットルの未反応試料をマイクロ流路 フローセル(光路長 20 µm,流路幅 200 µm)に送液し、試料交換することのできる、極微量 送液システムの開発を行い、計測に要する試料の消費量を大幅に抑制した。我々はこの測定 系を可視吸収分光装置、およびフェムト秒赤外レーザーを光源に用いた高輝度赤外吸収分光 装置と組み合わせ、収量の低い膜タンパク質の反応をマイクロ秒の時間分解能で追跡できる マイクロ流体フロー・フラッシュ分光システムを構築した。可視吸収分光はへムの、赤外吸 収分光は基質(NO)や生成物(N₂O)の電子状態・配位状態解析に有用である。

まずは時間分解可視吸収スペクトルを計測し、グローバル近似解析を行ったところ、スペ クトルは時定数 5 μs, 100 μs, 5 ms からなる 3 相の変化を示すことがわかった(Fig. 2)。第1 相と第3相の速度には NO 濃度依存性が見られたのに対し、第2 相の速度は NO 濃度に依存 しなかった。次に、生成物 N₂O の NN 伸縮振動(2230 cm⁻¹)を時間分解赤外分光計測したと ころ、N₂O は 500 μs 以内に生成し、その後の N₂O 生成は無いことがわかった。以上の結果を 併せると、NO 結合型が数 μs で生成した後、100 μs で NO 還元反応が起こり、N₂O が生成す ることが明らかとなった。さらには、NO 還元速度(第2 相)が NO 濃度に依存しないことか ら、分子内反応として NO 還元が起こる *trans* 機構で反応が進むことが示唆された。現在、 NO の配位状態を直接観察するための時間分解赤外分光計測を進めている。



Fig. 2: NOR 酵素反応の時間分解可視吸収スペクトルおよび解析結果.(A)時間 分解可視吸収スペクトル(赤線)および解析によって得られた近似曲線(黒線). (B)グローバル近似解析によって算出された時定数とスペクトル変化成分.

新しいケモトリクス法「仮想添加多変量微分スペクトル解析」による複雑系の ラマンスペクトルの定量解析

(早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構*,台湾国立交通大学分子科学研究所**) 〇安藤正浩*,濵口宏夫**.*

Quantitative Raman spectrometry of complex mixture systems by hypothetical addition multivariate analysis with numerical differentiation

(Waseda University^{*}, National Chiao Tung University^{**}) OMasahiro Ando^{*}, Hiro-o Hamaguchi^{**,*}

【序】物質の濃度を正確に測ることは分析化学の基礎であり、これまで様々な分光法に基づく定量分析法が開発されてきた。混合物試料中に、特定の分析目的物質(以下目的物質)がどれだけ含まれているかを測る方法の一つとして、標準添加法が広く用いられている。この手法では、目的物質をその濃度を段階的に変えながら試料に添加し、得られた複数の標準添加試料について分光測定を行う。観測されるスペクトル中の目的物質由来のバンドに着目し、そのバンド強度を添加濃度に対してプロットし検量線を作成する。この検量線に基づいて試料中の目的物質の濃度を決定する。しかし複雑な混合物試料では、バンドの重畳などから、正確な定量解析が困難となる場合が多い。それを克服する方法として、多変量解析によるケモメトリクス法、主成分回帰(PCR)や Partial Least Squares (PLS)回帰等、が知られている。

我々は、混合物試料のスペクトルと、目的物質のスペクトルの2つのみから(実際に試料を標準添加することなく)目的物質の定量解析を行う新しい多変量解析手法、「仮想添加多変量微分スペクトル解析」を開発した[1]。本手法では、試料のスペクトルに、係数を乗じた目的物質の標準スペクトルを数値的に添加することにより、多数の仮想添加スペクトルを作成し、それらに多変量スペクトル分解を適用することで、目的物質のスペクトルを目的物質以外のスペクトルから数値的に分離、定量することができる。

【方法】 混合物試料のモデル溶液として、グルコース、スクロース、フルクトースの混合水溶液を 用意した。各糖質の濃度は、重量百分率で、グルコース 1.05 %、スクロース 3.16 %、フルクトース 1.71 %であった。これを試料としラマン分光測定を行い、目的物質としてグルコースの定量を仮想添 加多変量微分スペクトル解析により試みた。

まず、10.0% グルコース水溶液を調整してラマン分光測定し、水のラマンスペクトルを差し引くこと でグルコースの標準ラマンスペクトルを得た。つぎに、試料のラマンスペクトルに

$$S_j = S_{unkn} + c_j \times S_{std} \tag{1}$$

に従って仮想添加スペクトル S_j を作成した。混合物試料のスペクトルを S_{unkn} 、目的物質の標準スペクトルを S_{std} としてある。ここでは、 $c_j = -5.0$ から $c_j = 5.0$ まで 0.01間隔で、1001個の仮想添加モデルスペクトルを作成した。さらに仮想添加モデルスペクトルの2次微分を計算し、

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} \frac{\mathrm{d}^2 \boldsymbol{S}_1}{\mathrm{d}x^2} & \frac{\mathrm{d}^2 \boldsymbol{S}_2}{\mathrm{d}x^2} & \cdots & \frac{\mathrm{d}^2 \boldsymbol{S}_N}{\mathrm{d}x^2} \end{pmatrix}$$
(2)

に従って行列Aを作成した。この2次微分の操作は、分光器の迷光や蛍光のなどの連続したスペクトル背景の除去や、複数のバンドが重畳したスペクトルから目的物質の寄与のみを分離する上で有用である。次に、多変量スペクトル分解により、A \cong WH となる行列WとHを求めた。これらの行列のランクは2であり、行列Wは目的物質以外の微分スペクトル(第1成分純スペクトル)及び目的物質由来の微分スペクトル(第2成分純スペクトル)を列ベクトルに含み、また行列Hはそれら2成分に対応する強度プロファイルを行ベクトルに含む。行列分解は、L₁ノルム拘束を加えた最小二乗近似により行った。L₁ノルムはベクトル($x_1, ..., x_n$)の絶対値の和 $\sum_{i=1}^{n} |x_n|$ として表される量であり、これを正則化項に加えることで、より疎な解が得られるようになる。本手法により、第1成分純スペクトルにおける目的物質スペクトルの寄与がゼロとなるような、互いに疎なスペクトル分解結果を得ることが期待される。最終的に、得られた行列Hから、第2成分強度プロファイルh₂が0となる点の係数値 c_{opt} を算出し、混合試料における目的物質の寄与を求めた。

【結果と考察】 仮想添加多変量微分スペクトル解析で得られた行列 H から、各成分の強度プロファイルを作成すると図 1A のようになる。目的物質以外に対応する第1 成分強度プロファイル(赤線) は、仮想添加量によらず一定強度を示すのに対し、目的物質に対応する第2 成分強度プロファイル

(緑線)は、仮想添加係数に対して直線関係を示 す。第 2 成分の強度が 0 となる点から、 $c_{opt} =$ -0.1081 ± 0.0001 と求められた。誤差は、最小 二乗法における反復計算の収束誤差(標準偏差) である。仮想添加スペクトルの数が多いほど収束 性がよく、仮想添加スペクトルを 11 本とした場合 は $c_{opt} = -0.1112 \pm 0.0114$ 、101 本とすると $c_{opt} = -0.1079 \pm 0.0019$ となった。また 1001 本以上としても収束値は今回の結果と変わらな かった。

c_{opt} = −0.108 から、試料のグルコース濃度 は 1.08 %と算出される。実際の試料作製に用い た濃度は 1.05 %であり、今回の解析結果はこの 濃度をよく再現している。

また、得られた係数値から、図 2B のように、混 合試料スペクトル(黒線)を、グルコース以外のス ペクトル(赤線)とグルコース寄与分のみのスペク トル(緑線)に分解することができる。本手法によ り、目的物質以外の成分についての情報を全く 含めなくても、スペクトル全体の情報を使うことに より、明瞭に目的物質スペクトルの寄与分を抽出 することが可能となった。



図 1. 仮想添加多変量微分スペクトル解析で 得られた強度プロファイル(A)、グルコースのラ

[1] 安藤正浩、濵口宏夫 分光研究 64,280 (2015).

三次元相関分光による重畳した蛍光信号のブラインド分離

(理研・田原分子分光、理研・光量子工学) 〇石井 邦彦、田原 太平

Blind separation of overlapped fluorescence signals using three-dimensional correlation spectroscopy

【序】単一分子分光実験の目的を一般的に述べると、不均一な混合物試料に対して構成成分の寄 与を分離し、独立成分の数および各成分の濃度や成分ごとの分光情報(スペクトルなど)を決定 する、ということである。我々は近年、不均一系の各成分の寄与を分離する新しい方法として二 次元蛍光寿命相関分光法を提案した[1,2]。この方法では、低濃度の蛍光性試料溶液から発せられ る蛍光光子の励起 - 発光遅延時間を計測し、その時間揺らぎの相関を二次元蛍光遅延時間相関マ ップとして表現する。この二次元マップを指数関数減衰の和を用いてフィッティング解析するこ とで、独立成分の数と各成分の蛍光減衰曲線を得る。本講演ではこの解析法を一歩進めて、蛍光 信号の揺らぎの三次相関を用いることで、指数関数などのモデルを使わずに独立成分の蛍光減衰 曲線を一意的に決定できることを示す。これを応用すれば、蛍光寿命以外の分光パラメータに対 しても多次元相関計測による解析法を有効に活用できると期待される。

【原理】 蛍光強度の時間揺らぎを $I(T; \xi)$ と表す。T は測定開始後の経過時間、 ξ は注目する分光パ ラメータであり、以下では ξ を励起 - 発光遅延時間とする。 $I(T; \xi)$ の揺らぎを表す二次元相関行列 は $M(\xi,\xi') = \langle I(T;\xi)I(T;\xi') \rangle - \langle I(T;\xi) \rangle \langle I(T;\xi') \rangle$ と定義される。(ただし、相関の遅延時間は零としてい る。) $M(\xi,\xi')$ を独立成分の寄与に分割することを考える。異なる独立成分の間には揺らぎの相関が ないため、 $M(\xi,\xi')$ は以下のように独立成分の和に分解される。

$$M(\xi,\xi') = \sum_{i=1}^{n} g_i d_i(\xi) d_i(\xi').$$
(1)

n は独立成分数、 $g_i, d_i(\varsigma)$ はそれぞれ成分iの自己相関振幅、蛍光減衰曲線である。我々の目標は、 実験データから $n, g_i, d_i(\varsigma)$ をモデルフリーで決定することである。そこで、 $M(\xi, \varsigma)$ を以下のように 固有値分解してみる。

$$M(\xi,\xi') = \sum_{i=1}^{n} \lambda_i v_i(\xi) v_i(\xi').$$
⁽²⁾

すると非零固有値 λ_i の数n ($M(\xi, \xi)$)の階数)から独立成分数を決定できるが、固有ベクトル $v_i(\xi)$ は互いに直交化されており、一般に $d_i(\xi)$ に一致しない。すなわち、 $v_i(\xi)$ と $d_i(\xi)$ の間には以下の直 交変換の自由度が残されている。

$$\sqrt{g_i}d_i(\xi) = \sum_{j=1}^n u_{ij}\sqrt{\lambda_j}v_j(\xi). \quad (u_{ij}は直交行列の要素)$$
(3)

*u_{ij}*を正しく決定できれば上記の目標が達成される。しかし、指数関数減衰など何らかのモデルを 用いない限り、*M(ξ, ζ)*のみから*u_{ij}を*決定することはできない。

そこで M(ξ, ζ)の自然な拡張として、I(T; ζ)の揺らぎの三次元相関テンソル T(ξ, ζ, ζ)を考える。

$$T(\xi,\xi',\xi'') = \langle I(T;\xi)I(T;\xi')I(T;\xi'') \rangle - \langle I(T;\xi) \rangle \langle I(T;\xi')I(T;\xi'') \rangle - \langle I(T;\xi') \rangle \langle I(T;\xi)I(T;\xi'') \rangle - \langle I(T;\xi') \rangle \langle I(T;\xi)I(T;\xi'') \rangle + 2 \langle I(T;\xi) \rangle \langle I(T;\xi') \rangle \langle I(T;\xi'') \rangle.$$

$$(4)$$

式(1)に対応して T(ξ, ξ', ξ')は独立成分の和として

$$T(\xi,\xi',\xi'') = \sum_{i=1}^{n} h_i d_i(\xi) d_i(\xi') d_i(\xi'')$$
(5)

と分解できるが、三次のテンソルの場合、二次の行列の場合とは異なりこのような成分分解は一 意的であることが知られている[3]。すなわち、三次元相関分光を行って *T*(*ξ*, *ξ*, *ξ*')を評価し、これ を式(5)の形に分解すれば、各成分のスペクトル情報 *d_i*(*ξ*)が求められる。さらに *d_i*(*ξ*)と式(1-3)より 二次の自己相関振幅 *g_i*が求められ、*i*の濃度を決定できる。

【方法】解析に用いる蛍光光子のデータは、共焦点顕微鏡を用いた蛍光相関分光計を用いて収集 する。パルスレーザーと時間相関光子計数装置により、各光子について励起 - 発光遅延時間を計 測する。得られた励起 - 発光遅延時間の時系列データを基に揺らぎの二次元相関行列 $M(\xi,\xi')$ と三 次元相関テンソル $T(\xi,\xi',\xi'')$ を構築する。次に $M(\xi,\xi')$ を固有値分解し、有意に零でない値をもつ 固有値の数 n を調べるとともに、非零固有値 λ_i (*i*=1~n)に対応する固有ベクトル $v_i(\xi)$ を求める。こ れらを用いて、 $T(\xi,\xi',\xi'')$ を以下のように変形する。

$$\widetilde{T}(i,i',i'') = \sum_{\xi,\xi',\xi''} T(\xi,\xi',\xi'') v_i(\xi) v_{i'}(\xi') v_{i'}(\xi''). \quad (i,i',i''=1 \sim n)$$
(6)

こうすることで、三次テンソルの要素数が n³に縮減される。このテンソルは式(3,5)から

$$\widetilde{T}(i,i',i'') = \sqrt{\lambda_i \lambda_{i'} \lambda_{i''}} \sum_j \frac{h_j}{g_j^{3/2}} u_{ji} u_{ji''} u_{ji''}.$$
(7)

のように表される。そこでフィッティングにより直交行列の要素 u_{ji} を求め、さらに式(3)から g_i , $d_i(\zeta)$ を決定する。

【応用】以上に述べた方法の妥当性を検証するために、動的 モンテカルロシミュレーション[1]により人工的に作成した 光子データに対して応用した。シミュレーションでは蛍光寿 命が 1 ns, 5 ns の 2 つの独立成分を仮定した。図にこのデータ に対して計算した *M*(*ξ*, *ζ*)の固有ベクトル *v_i*(*ζ*) (a)と上記の方 法で求めた *d_i*(*ζ*) (b) (それぞれ *i*=1,2) を示す。(c)は光子デー タから 2 つの独立成分それぞれに由来する光子を抽出して蛍 光減衰曲線を再構成したものである。(b)と(c)は良い一致を示 しており、本手法が期待通りの結果を与えていることが分か る。講演では、本手法を実験データに適用した結果について も紹介する。



【参考文献】

[1] K. Ishii and T. Tahara, J. Phys. Chem. B **117**, 11414-11422 & 11423-11432 (2013).

[2] T. Otosu, K. Ishii, and T. Tahara, *Nat. Commun.* 6, 7685 (2015).
[3] T. G. Kolda and B. W. Bader, *SIAM Review* 51, 455 (2009).

図 シミュレーションデータに対す る応用結果。

タンパク質中で見られるチロシンの特異な水素結合状態の 赤外分光解析

(名工大 院工^{*}、JST さきがけ^{**})
 ○伊藤 奨太^{*}、杉田 真也^{*}、吉住 玲^{*}、井上 圭一^{*, **}、
 岩田 達也^{*}、岩城 雅代^{*}、神取 秀樹^{*}

FTIR study of specific hydrogen-bond of tyrosine in the protein

(Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Tech.,*, Prest, JST**) ○Shota Ito*、Shinya Sugita*, Rei Abe-Yoshizumi*, Keiichi Inoue*,**, Tatsuya Iwata*, Masayo Iwaki*, Hideki Kandori*

【序】タンパク質中ではその機能発現のために、特異な水素結合構造を形成する場合がある。 複雑分子系であるタンパク質内部の水素結合構造を検出することは容易ではないが、光やリ ガンドなどの刺激を与えた前後の差スペクトルを測定する赤外差スペクトル分光法は大きな 可能性を持った手法である。これまでに我々は青色光受容タンパク質 BLUF の光反応中間体 において、発色団 FAD 近傍の Tyr21 の O-H 伸縮振動が 2800-2500 cm⁻¹に観測されることを 報告した¹。フェノール環の O-H 伸縮振動は水素結合を形成していないと 3600 cm⁻¹付近に 現れるが、水素結合を形成すると低波数シフトする。分子内水素結合を形成すると 3200 cm⁻¹ 付近にまでシフトするが、文献にないほどの Tyr の O-H 伸縮振動の観測から、光活性化にお いて強い水素結合の形成が BLUF の機能発現に関わると考察した¹。

今回、光駆動ナトリウムポンプである KR2 (*Krokinobacter* Rhodopsin2)²に対して全反 射赤外分光 (ATR-FTIR) 法を用いて Na⁺結合の際の差スペクトルを測定したところ、同様 に 2800-2500 cm⁻¹の振動数領域にスペクトル変化を観測した。ATR-FTIR 法は溶液中での膜

タンパク質の構造変化を捉える ことができる一方、水分子の大 きな赤外吸収も反映されるため、 一般にX-H伸縮振動領域の情報 を得ることは困難である。しか し、試料を含めた測定条件を最 適化することで水素結合供与基 の構造情報を得ることが可能に なった(図1)。

【実験】大腸菌によって異種発 現した KR2 は DDM による可溶 化後、Co-NTA カラムを用いて 精 製 し た 。 そ の 後 、 POPE:POPG=3:1 に調整した



図 1. (左)ATR-FTIR 法の装置概念図 (右)溶液交換時の赤外吸収スペクトルとその差スペクトル

脂質を用いてモル比が1:20となるように KR2 を再構成した。KR2 を ATR-FTIR のシリコ ンプリズム上に自然吸着させ、100 mM NaCl/ CsCl, 20 mM Tris-H₃PO₄, pH8 の溶液を交換 した際の赤外差スペクトルを測定した。また振動バンドの同定のため、同位体標識試料とア ミノ酸部位特異的変異体を作製して同様の実験を行った。

【結果と考察】Na+結合に特徴的な 2800-2500 cm⁻¹の X-H 伸縮振動は ¹⁵N 標識試料では変化 せず、¹³C や Tyr-D₄標識試料で低波数シフトしたことから Tyr の O-H 伸縮振動に由来するこ とがわかった(図2)。BLUF では光反応中に生成する過渡中間体においてのみ特異な Tyr の信号が観測されたが、KR2 の場合、光反応前の基底状態においてきわめて強い Tyr の水素 結合が存在することになる。Na+は細胞外側表面に結合するが²、この領域に含まれる Tyr25 や Asp102 の変異体で振動バンドが消失したことから(図2)、2800-2500 cm⁻¹に現れた信号 は Tyr25 の O-H 伸縮振動がフェルミ共鳴により複数のピークを示したものと結論した。最近、 報告された結晶構造によれば、Tyr25 は Na+近傍で負電荷を持った Asp102 と近接している (図3)³。Tyr25 と Asp102 の酸素間距離は 2.40 Å であり、今回、測定した Tyr25 の水素 結合強度とよく対応する。さらに D102E 変異体で Na+結合に伴う赤外吸収バンドが消失した が、この実験事実から、Na+結合のためには 102 位の負電荷だけでなく、Tyr25 との間での 強い水素結合を形成することの重要性が示唆された。

これまで適当な観測手段がないことから、光駆動ナトリウムポンプの過程でいつ Na⁺の放 出が起こるのか不明であった。この点、Tyr25 の O-H 伸縮振動は他の振動から離れた領域に 現れる振動バンドであるため、ポンプ過程における Na⁺の結合・解離に関する情報が得られ る可能性がある。講演では、光誘起差スペクトル法を用いて測定したナトリウムポンプの過 程における水素結合状態の変化も含め、Tyr がタンパク質中で取りうる特異な水素結合状態 とタンパク質機能との関わりについて議論したい。



図 2. KR2 の NaCl/ CsCl に伴う赤外差スペクトル

図 3. KR2 の結晶構造図

【参考文献】

- (1) Iwata et al., J. Phys. Chem. Lett. 2, 1015-1019 (2011).
- (2) Inoue et al., Nat. Commun. 4, 1678 (2013).
- (3) Gushchin et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 22, 390-395 (2015).

アゾベンゼン光異性化で誘発された集積構造変化による 分子集合体の巨視的運動

(北海道大学*・JST さきがけ**)○景山義之***・池上智則*・皀優太*・武田定*

Macroscopic motion of supramolecular polymer driven by azobenzene photoisomerization induced phase transition

(Hokkaido Univ.*, JST PRESTO**) oYoshiyuki Kageyama,*** Tomonori Ikegami,* Yuta Kurokome,* Sadamu Takeda*

【序】

生体内では、非共有結合性の柔らかな分子集合体(高次 構造を有するたんぱく質)が、刺激による部分構造の変化 で、集合体としての構造変化を発現しており、その仕組み の階層化によって、細胞や個体といった恒常的で動的なシ ステムを形成している。一方で、人工的に分子を階層化す ることによって、分子集合体や、より高次のシステムの、 動的かつ秩序的な巨視的機能を創出する学理は未成熟であ る。演者は、pH7.5 程度の緩衝水溶液中で、オレイン酸(1:図 1)と両親媒性アゾベンゼン(2)を構成分子とする螺旋状の 分子集合体が、2の光異性化によって巨視的な回転運動を発 現することを報告している(図2)。^[1]本発表では、この運 動に際し、分子集合体を形成する1および2のカルボキシ 基の酸解離挙動が共役している実験的証拠を示す。

【結果と考察】

オレイン酸(1)は、水中において、その酸解離状態に応じ た集積挙動を示し、ベシクル状集合体、チューブ状集合体、 螺旋状集合体などを形成する(図3)。^[2]チューブ状の集合 体は、螺旋状集合体を形成しやすい pH よりも僅かに高い pH で形成しやすい。すなわち、チューブ状集合体内のカル ボキシ基と、螺旋状集合体内のカルボキシ基では、前者の 方が酸解離している割合が数%多い。



Fig. 1. Compounds



Fig. 2. Phototriggered motion of helical assembly.



Fig. 3. pH titration curve of **1** and illustrations of the macroscopic assemblies formed in the respective pH.





Fig. 4. Surface tension measurement of a mixture of 1 and 2 (10 mol%) before and after UV irradiaion.

Fig. 5. Potentiometric pH titration curve of a mixture of sodium salts of 1 and 2 with a titrant of HCl before and after UV irradiation.

Fig. 6. FTIR difference spectrum taken after UV irradiation of dispersion of 1 and 2 (10 mol%).

アゾベンゼン誘導体(2)は、365 nm の光照射により *trans cis* 異性化が、435 nm の光照射 により *cis trans* 異性化が進行する。図4に、365 nm 光の照射前後における 1(90%)、2(10%) 混合単分子膜のΠ-A プロットの変化を示す。光照射前後で、混合膜1分子辺りの極限面積は、 0.43 nm²から 0.45 nm²へと僅かに(約 5%)増大した。この微細な変化だけによって、劇的な 回転運動が発現しているとは考えにくい。

図5に、365 nm 光照射前後における、1(91%)、2(9%)のナトリウム塩の混合分散液に対す る pH 滴定曲線を示す。光照射により、滴定曲線は酸性側にシフトした。これは光照射によ って、カルボキシ基の酸解離が数%進むことを示している。図6に、1(91%)、2(9%)混合分散 液(pH 7.3 リン酸緩衝液)の、365 nm 光照射前後の FTIR 差スペクトルを示す。波数 1760 cm⁻¹ の負のピークは、光照射に伴い中性カルボキシ基が減少したことを示している。

以上の結果から、2の光異性化に共役した、1および2のカルボキシ基の酸解離の進行が、 螺旋状集合体の不安定化を誘起し、螺旋の巻き戻し回転を伴った構造変化を惹き起こしてい ると考えられる。この共役的なカルボキシ基の酸解離は、光異性化に伴う2の実効体積の増 大が、カルボキシ基間の距離の増大と静電反発の解消を惹き起こすことに起因すると我々は 予想している。^[3]一方、酸解離および平均分子間距離の変化は、いずれも僅かな量であり、 より特化した計測による運動発現機構の確定が望まれる。

【謝辞】

FTIR 実験に際し、木村哲就博士・久保稔博士(理研播磨)の協力をいただいた。

 Kageyama, Y.; Tanigake, N.; Kurokome, Y.; Takeda, S.; Suzuki, K.; Sugawara, T. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9386-9388.

[2] Kageyama, Y.; Ikegami, T.; Takeda, S.; Sugawara, T. Soft Matter 2015, 11, 3550-3558.

[3] Kageyama, Y.; Ikegami, T.; Kurokome, Y.; Takeda, S. manuscript under preparation.

グロイオバクターロドプシンのプロトンポンプ機能を促進する 発色団構造変化 (¹阪大院理・²名工大院工) 中嶋 亜侑美¹・〇水野 操¹・神取 秀樹²・水谷 泰久¹ Structural changes in retinal chromophore of *Gloeobacter* rhodopsin facilitating the proton pump function (¹Osaka University, ²Nagoya Institute of Technology) Ayumi Nakajima¹, <u>Misao Mizuno¹</u>, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

はじめに プロトンポンプは外部刺激に応答した構造変化により、細胞膜を隔ててプロトンを一方向のみに能動輸送するタンパク質である。その詳細な構造変化のメカニズムは、代表的な微生物型プロトンポンプのバクテリオロドプシン(BR)でさえ、いまだ完全に



図1. レチナール発色団の構造.

は理解されていない。グロイオバクターロドプシン(GR)は、真正細菌シアノバクテリア由 来のプロトンポンプである。GRは、大腸菌系をもちいた大量発現が可能であり、プロトン輸 送メカニズムを研究するうえで有利である。レチナール発色団(図 1)の全トランス体から 13 シス体への光異性化反応がタンパク質構造変化の引き金であること、発色団のプロトン化 シッフ塩基がプロトン輸送経路に含まれている可能性が高いことから、ポンプ機構の理解に は各中間体における発色団構造を明らかにすることがきわめて重要である。本研究では、時 間分解共鳴ラマン分光法をもちいて、レチナール発色団の構造変化をナノ秒からミリ秒の時 間領域にわたり観測し、GRのポンプ機構におけるプロトン輸送モデルを新たに提案した。

実験 GR は、大腸菌中で発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。界面活性 剤をもちい、バッファー (pH 9.0) に可溶化した試料をフローセル中に循環させて、時間分解 共鳴ラマン測定を行った。ラマン散乱測定のプローブ光には、波長 475 および 400 nm (パル ス幅 40 ns)の光をもちいた。光反応を開始するポンプ光には、波長 532 nm の光を使用した。 反応初期の時間分解計測には、パルス幅 25 ns の光パルスをもちいたポンプ・プローブ測定(時 間分解能 50 ns)を行った。遅い時間領域では、cw 光で連続的に試料をポンプし、プローブ 光との照射位置間隔で遅延時間を設定するデュアルビームフロー法(時間分解能 100 μs)を もちいて時間分解スペクトルを観測した。

結果と考察 図 2a に波長 475 nm のプローブ光で測定した GR の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。プローブ光のみで測定した一番上のスペクトルは、未反応状態のレチナール発色団の共鳴ラマンスペクトルである。レチナール発色団の構造を反映するマーカーバンドである C-C、C=C および C=N 伸縮振動バンドが、それぞれ 1199、1532 および 1641 cm⁻¹に観測された。その他のスペクトルは、各遅延時間において未反応状態のスペクトルの寄与を差し引いた光反応中間体の時間分解スペクトルである。ポンプ光照射直後には、1192、1538 および 1623 cm⁻¹に各マーカーバンドが現れた。300 nsのスペクトルには、これらに加えて 1184、1549 および 1652 cm⁻¹にバンドが観測され、10 us にかけてこれらの強度が増加した。バンド



図2. GRの時間分解共鳴ラマンスペクトル. プローブ光波長 (a) 475 nm, (b) 400 nm. カッコ内数字 は重水中のC=N伸縮振動数. *は400 nm付近に吸収をもつ種に由来するバンド.

の強度比が変化することから、この時間領域において二つの中間体のバンドが観測されるこ とがわかった。過去の時間分解吸収観測の報告[1]により、後から出現したバンドはL中間体 に起因すると考えられる。ミリ秒領域のスペクトルには、さらに 1534 および 1650 cm⁻¹に N 中間体に由来すると考えられるバンドが観測された。波長400 nmのプローブ光で測定した時 間分解スペクトル(図 2b)には、短波長領域に吸収ピークをもつ M 中間体に由来するバンド が観測された。プロトン化シッフ塩基をもつレチナール発色団の 1610-1660 cm⁻¹ に現れる C=N 伸縮振動は、N-H 変角振動と強くカップルしたモードである。このため、その振動数は シッフ塩基における水素結合強度に敏感である。水素結合が強いと、その振動数は高く、ま た重水素置換による波数シフトが大きいことが知られている[2]。L中間体のスペクトルでは、 高い振動数かつ重水素置換による大きな波数シフトを示すC=N伸縮振動バンドが観測された。 したがって、L 中間体において発色団のシッフ塩基では強い水素結合が形成されていること がわかった。これは、プロトン化シッフ塩基とそのカウンターイオンの距離が近づくことに 起因すると考えられる。また、M 中間体のスペクトルにおいて、1617 cm⁻¹と振動数が低く、 また重水素置換による波数シフトを示さなかった。これは、L 中間体から M 中間体への遷移 において発色団が脱プロトン化することを示している。また、M 中間体のバンドの出現・消 滅の時間挙動は、L 中間体と同様であった。これより、L 中間体と M 中間体との間で互いに 速い遷移が起こり、すばやく平衡に達することが考えられる。このような GR の中間体生成 の時間挙動は、逐次的に L 中間体と M 中間体が生成する BR の光反応[3]とは異なる。GR で は、M 中間体生成において、発色団がプロトンアクセプターであるアミノ酸残基と水素結合 ネットワークを介して相互作用を強めると考えられる。

本研究の結果から、GR のプロトン輸送過程において、発色団の脱プロトン化の前駆過程で、 シッフ塩基とカウンターイオンの距離が近づき、プロトン移動のエネルギー障壁が低くなる ことが示唆された。この過程により発色団からのプロトン移動が促進されると考えられる。

参考文献 [1] Miranda, et al., *Biophys. J.* 96, 1471 (2009). [2] Baasov, et al., *Biochemistry* 26, 3210 (1987). [3] Diller and Stockburger, *Biochemistry* 27, 7641 (1988).

Transient optical absorption and magnetic intensity modulation based microscopy of photochemical reaction intermediates

> (University of Tokyo) OJonathan R. Woodward, Joshua P. Beardmore and Lewis M. Antill

[Introduction] Although the study of magnetic field effects on chemical reactions has a long and fascinating history, very little attention has been paid to spatially resolving magnetic field dependent photochemistry. As spin chemical studies have turned to more and more sophisticated systems, particularly involving biological processes and solid state electronic devices, the need to add a spatial dimension to magnetic field sensitive measurements has increased. In particular, a key recent question in spin chemistry concerns the possibility of radical pair reactions as the source of the ability of many animals to sense the earth's magnetic field and use it for navigation. A class of blue-light photoreceptors, the cryptochromes, have been proposed as likely candidates for this magnetically sensitive photochemistry¹ and growing evidence from behavioural biological, genetic and spin chemical measurements² have provided growing support for this hypothesis. In this context, a long term goal has been to directly measure cryptochrome photochemistry in living cells and look for magnetosensitive responses in these processes. To this end, we have developed a new kind of microscope capable of two kinds of spatially resolved measurement: Transient Optical Absorption Detected (TOAD) imaging microscopy and Magnetic Intensity Modulation (MIM) imaging microscopy. These techniques were designed with an initial goal of studying the magnetosensitivity of flavin based photochemistry at sub-micron spatial resolution in biological and other structures and a longer term goal of using them to study a broader range of magnetic sensitive reactions in other environments, for example in solid state electronic devices.

In this lecture, the new microscopic techniques are introduced and their capabilities discussed along with recent measurements in their application to study the photochemistry of various different flavin containing systems.



Figure 1. Time resolved optical absorption signal recorded at 532 nm from photoexcitation of a 0.2 mM solution of FAD at pH 2.3 after application of a 300 ns 450 nm laser pulse from a volume of solution of <4 fL. The inset shows the MARY curve recorded for the same region of sample.

[Experimental] The microscope employs a pair of identical high numerical aperture super apochromatic objective lenses arranged symmetrically either side of a sample contained between cover slips. Pump (450 nm) and probe (532 nm) laser beams are combined and cleaned with a single mode optical fiber before being brought to mutual focus at the sample by the first objective lens. Transmitted light is captured from the focal point by the second objective and the pump light is filtered from the beam before detection using an autobalanced detector. In TOAD measurements, the pump light can be modulated at variable duty cycles and laser powers to study flavin photochemistry in response to a short photoexcitation pulse or under pseudo-continuous illumination. Induced changes in the green light intensity are detected with very high sensitivity using either a digital storage oscilloscope or a phase sensitive detector locked to the modulation frequency. Magnetic fields of up to 30 mT can then be applied and or the sample position can be scanned in steps as small as 1 nm using a piezoelectric translation stage. In MIM measurements a double modulation scheme is applied. The pump light is applied as a short pulse at high (kHz) repetition rates and the green light response is phase sensitively detected. A DC magnetic field is applied with an AC component of typically 100 Hz provides a second modulation and the result of the second phase sensitive detection is monitored as either the DC magnetic field (modulated MARY spectrum) or the sample position (imaging) is scanned.

[Results and Discussion] Fig 1. shows the time resolved optical absorption signal observed for a sample of 0.2mM flavin adenine dinucleotide, demonstrating the sensitivity spatial high and resolution of the instrument. Fia 2. shows a MIM image of a 2.5 microbead 3.0 μm polymer surrounded by 2 mM FAD at pH 2.3. In this figure, the light areas of the image correspond only to magnetic field sensitive regions of the sample and so can potentially be used to image only the regions cell where magnetically of а sensitive photoreactions are taking place.



Figure 2. MIM image of a 2.5 – 3 μm polymer microbead surrounded by 2mM FAD at pH 2.3.

[1] Ritz T, Adem S, Schulten K, *Biophys. J.* **2000**, 78,7 07 - 718.
[2] H. Mouritsen, P. J. Hore, Curr. Opin. *Neurobiol.* **2012**, 22, 343 – 352.