

1P092

高圧下における光誘起赤外分光計測系の開発

(分子科学研究所¹、分子研装置開発室²)

○黒井邦巧¹、木村幸代²、青山正樹²、古谷祐詞¹

Development of the pressure variable light-induced FTIR measurement system
(Institute for Molecular Science (IMS)¹, IMS Equipment Development Center²)

○Kunisato Kuroi¹, Sachiyo Kimura², Masaki Aoyama², Yuji Furutani¹

【序】 タンパク質分子は多くの内部自由度を持つため、構造が柔軟であり、圧力による影響を受けやすい。さらに反応における平衡定数や速度定数への圧力摂動からは、反応体積や活性化体積などの体積変化量が得られる。つまり、圧力摂動の解析から、安定状態や遷移状態における構造について体積変化の観点から知見を与えうる。このように、圧力はタンパク質分子を物理化学的に解析するための摂動として有用であり、例えばタンパク質反応に圧力摂動を用いることによって、反応の体積変化を通じた解釈や、常圧では検出できなかった反応中間体の検出を可能にする。

時間分解フーリエ変換赤外分光(TR-FTIR)法は、タンパク質分子内のアミノ酸残基のプロトン化状態の変化や微細な2次構造変化などを捉えることが可能な手法であり、これまでタンパク質反応の解析に威力を発揮してきた。例えば代表的な光受容性タンパク質であるバクテリオロドプシン(BR)では、光誘起TR-FTIR法を用いた研究からタンパク質内部のプロトン輸送経路が明らかにされている。このようにタンパク質反応の解析に有用なTR-FTIR法であるが、これが高圧下で適用されたことは意外にも少ない。多くの手法が適用されてきたBRにおいても、高圧下での可視域での過渡吸収や共鳴ラマン分光法による測定は報告されているものの、光誘起TR-FTIR法を高圧下で適用した報告例は存在しないようである。また、一般的に赤外分光法によるタンパク質分子への圧力効果の解析は、定常状態における測定がほとんどである。このような経緯のもと、我々は高圧下での光誘起TR-FTIR計測を行うことが可能な系を開発している。本討論会では開発の経過報告を行う。

【装置の概要】 圧力セルは、赤外光を透過し、加圧機構が単純なダイヤモンドアンビルセル(DAC)()を用いることにした。DACおよび、加圧装置の仕様は、株式会社シンテックと打ち合わせを行いながら決定した。1(b)は加圧装置である。これは、DACを固定し、ハンドルを回すことで下からピストンが押し上げられ、徐々に圧力を発生させる原理になっている。DAC上部の3本のネジを固定することで圧力を保ったままDACを取り外すことができる。加圧装置は、圧力の細かいコントロールを想定して、ピストン上昇が0.1 μm単位で制御可能な仕様にした。ピストン移動量はデジタル表示の1目盛あたり0.1 μmである。光誘起TR-FTIR計測を行うためには、このDACを分子研で用いているFTIR分光器(Vertex80, Bruker Optics)の試料室に設置する必要がある。DAC内部の微小な開口部(直径1.4 mm以下)に赤外光、試料励起光を集光させるためには、開口位置が集光点位置に合うように位置

を精密に制御しないとイケない。また、測定時の温度も制御、計測できることが望ましい。このような要請を満たす、分光器内部に取り付け可能なDACのセルホルダーの開発を分子研装置開発室と共に取り組んだ。図 1(c)にセルホルダーの図を示す。セルホルダー位置は、市販のXYステージとZステージを組み合わせて、3方向にマイクロメーターにより微調整が可能な仕様である。セルホルダー内部には、恒温水を循環させる流路があり、DACの温度を制御できるようになっている。DACの温度は熱電対によって計測するが、熱電対の導線を取り付けたまま、DACを取り外しできるようにセルホルダーにスリットを入れた。赤外分光器の試料室内にホルダーを設置し、BR試料の光励起の為に光学系を組んだ。赤外光を透過するGe板に微小なミラーを張り付け、試料励起用ナノ秒レーザーパルス光(波長532nm)をミラーで反射させる工夫を施すことで、励起光と赤外光をほぼ同軸に導入できるようにした。



図 1(a) (b) (c) 各装置の図。詳細は本文参照。

【結果】

予備的な実験として BR の定常状態での赤外吸収スペクトルを測定した。直径 1 mm の穴を開けた金属ガスケットを用いて、そこに BR、重水、圧力を検定するための硫酸バリウム粉末を封入してアンビルで挟んだ。図 2(a)に加圧とともに高波数シフトする硫酸イオンの対称伸縮振動モードのバンドと、そのピーク位置より算出された圧力を示す。これより、加圧装置の目盛と発生圧力の間で、図 2(b)のような線形関係が得られた(目盛が 0 で既に圧力が発生しているのは、試料封入時にネジによる締め付けを行っているためである)。図 2(c)には、重水とともに封入した BR 試料の、各圧力で測定した赤外吸収ス

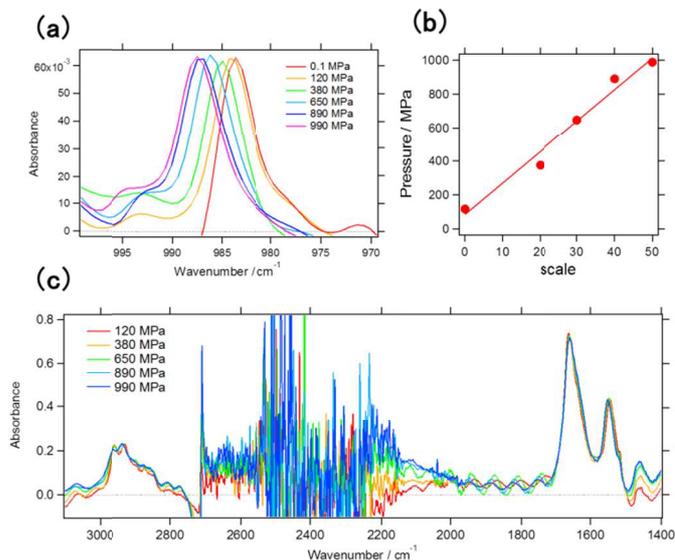


図 2 (a)硫酸イオンの振動バンドの圧カシフトと算出された対応圧力 (b)加圧装置の目盛と発生圧力の関係 (c)BR の赤外スペクトルの圧力依存性

ペクトルを示す。3000-2800 cm⁻¹の領域に膜脂質の炭化水素 C-H 伸縮振動に由来するバンドと、1700-1500 cm⁻¹の領域に BR のアミド I(~1660 cm⁻¹)、アミド II(~1545 cm⁻¹)のバンドが確認できた。現在、計測条件を最適化しながら、BR の光誘起 TR-FTIR 測定を試みている。