

## フェムト秒時間分解深紫外誘導ラマン分光法による バクテリオロドプシンの超高速タンパク質応答の観測

<sup>1</sup>理研・田原分子分光研究室, <sup>2</sup>理研・光量子工学研究領域

○田原進也<sup>1</sup>, 倉持光<sup>1,2</sup>, 竹内佐年<sup>1,2</sup>, 田原太平<sup>1,2</sup>

### Ultrafast protein response of Bacteriorhodopsin investigated by deep UV femtosecond time-resolved stimulated Raman spectroscopy

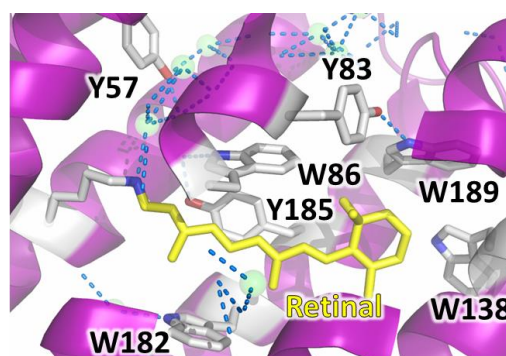
○Shinya Tahara<sup>1</sup>, Hikaru Kuramochi<sup>1,2</sup>, Satoshi Takeuchi<sup>1,2</sup>, Tahei Tahara<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN

<sup>2</sup>RIKEN Center for Advanced Photonics, RIKEN

**【Abstract】** Bacteriorhodopsin is a prototypical membrane protein that functions as a light-driven proton pump. Photoexcitation induces ultrafast isomerization of the retinal chromophore, which is followed by protein conformational changes essential for the proton pump function. To understand how this protein function is realized, it is important to elucidate the initial response of the protein moiety which is associated with the chromophore dynamics. In this study, we employed newly-developed femtosecond stimulated Raman spectroscopy in the deep-ultraviolet region, and investigated the protein response of Bacteriorhodopsin by observing the Raman signal change reflecting the change induced in the aromatic amino acids surrounding the chromophore. The obtained data showed an instantaneous decrease in the amplitude of the stimulated Raman signals of the tryptophan and tyrosine residues. These signals exhibited a change with 0.5 ps, and then largely recovered on the 30-ps time scale. On the basis of the obtained data, we discuss how the protein moiety responds to the chromophore dynamics on the ultrafast time scale.

**【序】** バクテリオロドプシン(BR, 図 1)は光駆動によるプロトン輸送機能を示す代表的な膜タンパク質である。内包されたレチナル発色団が光を吸収するとフェムト秒の時間スケールでC<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>結合周りの *trans* - *cis* 異性化を起こし、これが周辺のタンパク質の構造変化を誘起し、機能発現につながると考えられている。このため、プロトン輸送機構を解明するためには、発色団だけでなくタンパク質部分の構造変化の観測が欠かせない。この観点から、これまでにピコ秒紫外共鳴自発ラマン分光を用いた研究が行われ、発色団近傍の芳香族アミノ酸残基に由来するラマン信号の時間変化を観測することにより、K 中間体から KL 中間体への遷移に伴うタンパク質構造変化が報告されている[1]。一方、この手法の時間分解能は数ピコ秒に限られているため、フェムト秒領域で進む異性化をはじめとする発色団ダイナミクスに対して



**Figure 1.** Structure of Bacteriorhodopsin. Retinal chromophore is shown as yellow stick. Tryptophan and tyrosine residues are depicted as stick with colored elements. Waters are shown as green spheres. Blue broken lines show hydrogen bonds.

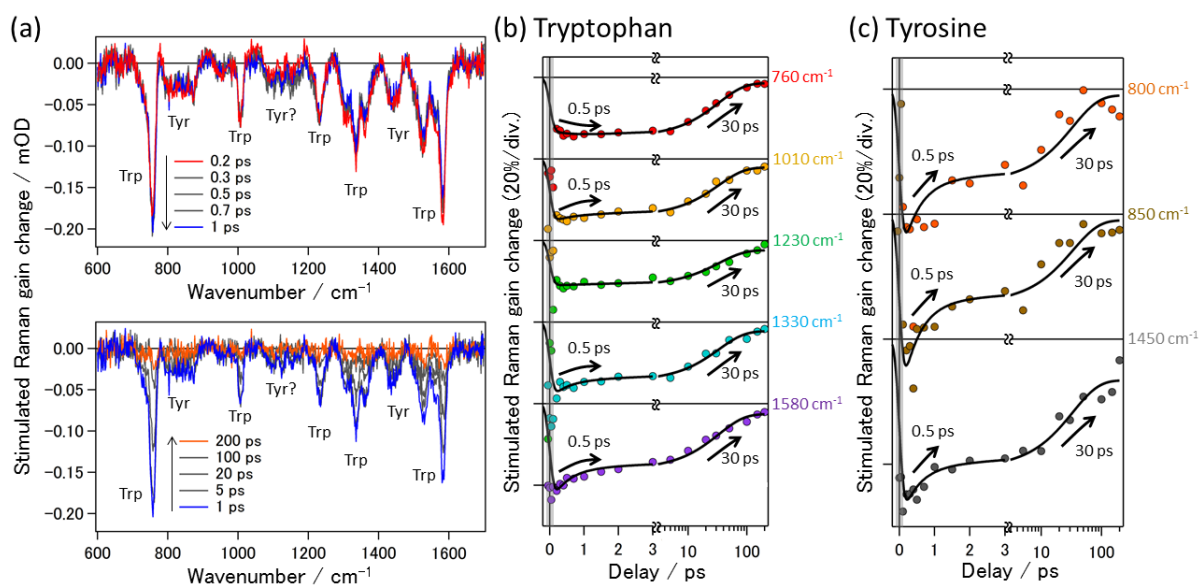
この観点から、これまでにピコ秒紫外共鳴自発ラマン分光を用いた研究が行われ、発色団近傍の芳香族アミノ酸残基に由来するラマン信号の時間変化を観測することにより、K 中間体から KL 中間体への遷移に伴うタンパク質構造変化が報告されている[1]。一方、この手法の時間分解能は数ピコ秒に限られているため、フェムト秒領域で進む異性化をはじめとする発色団ダイナミクスに対して

タンパク質部分がどう応答するか等の問題は、いまだ明らかにされていない。そこで我々はフェムト秒領域のタンパク質応答を解明し、発色団励起に伴ったタンパク質構造変化の全体像を明らかにしたいと考え、研究を進めてきた。本発表では、近年我々が実現した深紫外誘導ラマン分光[2]をフェムト秒時間分解測定へと新たに発展させ、それを用いて BR タンパク質の超高速応答を追跡した結果について報告する。

**【方法】** 試料として *Halobacterium salinarum* 由来の紫膜懸濁液を用いた。励起光 (580 nm, 100 fs) で発色団を光励起した後の様々な遅延時刻に、深紫外領域のラマン励起光 (292 nm, 1.8 ps) とフェムト秒プローブ光 (301 nm 中心) を同時に照射し、ストークス領域で時間分解誘導ラマン信号を取得した。

**【結果・考察】** 遅延時刻 0.2 ~ 200 ps における誘導ラマン差スペクトル、すなわち負時刻(-100 ps)での信号からの変化分を図 2a に示す。この差スペクトルには、トリプトファンおよびチロシンに由来する複数の誘導ラマンバンドの強度減少が観測されている。観測されたバンドごとの強度変化率を求め、その時間変化を図 2b, c に示す。光励起から 0.2 ps 以内に誘導ラマン信号の強度が減少しており、これは光励起で生じた発色団の電子分極がタンパク質に引き起こした変化を反映していると考えられる。その後、発色団の光異性化が起こる 0.5 ps の時間スケールで誘導ラマン信号の強度が変化した。このことは、発色団異性化に伴い、タンパク質構造変化が起こることを示唆する。その後、誘導ラマン信号の強度は 30 ps の時定数で大幅に回復しているが、これはピコ秒ラマン分光の報告[1]に一致している。また図から分かるように、遅い時刻 (200 ps) においても誘導ラマン信号の僅かな強度減少が観測されている。これは、超高速タンパク質構造変化の一部がその後起こる光サイクル反応に引き継がれ、プロトン輸送機能の発現に関与している可能性を示唆している。

講演では、得られたフェムト秒深紫外共鳴誘導ラマン信号に基づき、超高速タンパク質構造変化と発色団ダイナミクスとの連関について議論する。



**Figure 2.** Femtosecond stimulated Raman signals of Bacteriorhodopsin obtained with 292-nm Raman pump. (a) Time-resolved stimulated Raman spectra on the 0.2-1 ps and 1-200 ps time scales. (b, c) Temporal traces and multiexponential fitting results of the Raman signals due to tryptophan and tyrosine residues. Note that the horizontal axis is shown in logarithmic scale after 3 ps.

### 【参考文献】

- [1] M. Mizuno, M. Shibata, J. Yamada, H. Kandori, Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12121-12128.  
 [2] H. Kuramochi, T. Fujisawa, S. Takeuchi and T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* **2017**, *683*, 543-546.