

## ピコ秒時間分解蛍光分光を用いた光合成超複合体の エネルギー伝達過程の解明

<sup>1</sup>熊大・院自然, <sup>2</sup>阪市大・複合先端研, <sup>3</sup>熊大・パルス研  
○廣田悠真<sup>1</sup>, 藤本将吾<sup>1</sup>, 川上恵典<sup>2</sup>, 神谷信夫<sup>2</sup>, 小澄大輔<sup>3</sup>

### Energy transfer processes among photosynthetic supercomplex as proved by ps time-resolved fluorescence spectroscopy

○Yuma Hirota<sup>1</sup>, Shogo Fujimoto<sup>1</sup>, Keisuke Kawakami<sup>2</sup>, Nobuo Kamiya<sup>2</sup> Daisuke Kosumi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science and Technology, Kumamoto Univ.

<sup>2</sup> The OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology, Osaka City Univ.

<sup>3</sup> Institute of Pulsed Power Science, Kumamoto Univ.

**【 Abstract 】** Cyanobacteria contain light-harvesting antenna megacomplexes called phycobilisome to capture sunlight efficiently. Phycobilisome is composed of the different pigment-protein complexes such as allophycocyanin and phycocyanin and its structure is like a parabolic antenna. Light energy captured by phycobilisomes is efficiently transferred to Photosystem II which generates chemical energy by a water-splitting reaction. In this study, we investigated energy transfer dynamics in the phycobilisome-PSII supercomplex from cyanobacteria by picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy. Energy transfer dynamics in the supercomplex was observed and the energy transfer rate was determined.

**【序】** 植物等が行う光合成は、自然界において地球上の多くの生物に必要な酸素を排出するシステムとして広く知られている。しかし、光合成における超効率的なエネルギー変換等は未だ解明されていない部分が多く、光合成メカニズムの解明は人類がより効率的にエネルギーを利用するために解決すべき課題である。シアノバクテリアは酸素発生型光合成の原始的生物として知られ、光合成分野において広く研究が行われている。シアノバクテリアは光を捕集する役割を持つアンテナ色素たんぱく複合体としてフィコビリソーム (PBS)を持つ。PBS はフィコシアニン (PC)、アロフィコシアニン (APC)といった異なる色素たんぱく複合体が、リンカーたんぱく質を介した相互作用により、70 nm 程度の大きさを持つパラボラアンテナのような構造を構成し<sup>1</sup>、効率的な光捕集を行っている。また、PBS はチラコイド膜上で図 1 (A)のように光化学系 (PS II、PS I)と結合することで超複合体を形成し、捕集した光エネルギーを効率的かつ超高速に光化学系へ伝達する<sup>2</sup>。これまでの PBS に関する研究では、細胞内におけるたんぱく質間エネルギー伝達について報告されている<sup>3</sup>。しかし、PBS と光化学系が相互作用をしている超複合体をチラコイド膜から単離精製することが困難であることから、たんぱく質レベルでの研究はあまり進んでいない。本研究では生化学調製により、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* から PBS-PS

II超複合体を調製した。得られた PBS-PS II超複合体に対してピコ秒時間分解発光分光を行い、超複合体におけるエネルギー伝達過程について検討した。

【方法(実験・理論)】 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* を細胞破碎することによりチラコイド膜を調製し、その後生化学調製により PBS-PS II超複合体を得た。本研究では時間相関単一光子計数法(TCSPC)を用いた蛍光寿命測定を行った。光源には、チタンサファイア再生増幅器からの出力パルスをもとに光パラメトリック増幅器で波長変換したものをを用いた。光源から出た光パルスは試料前で2分割し、片方を高速フォトダイオードで検出することで参照信号とし、もう片方は試料に照射した。試料からの発光は分光器を通したのちシングルフォトンアバランシェダイオードで検出した。参照信号と発光信号をTCSPCモジュールに取り込み、蛍光の時間変化を観測した。

【結果・考察】 図1(B)に580 nmでPCを励起後の各検出波長における蛍光減衰曲線を示す。得られた蛍光減衰曲線に対し、指数関数による立ち上がり・減衰とガウス関数を仮定した装置関数を畳み込んだ関数でフィッティングを行ったところ、3つの成分(時定数: 0.12 ns, 0.59 ns, 1.57 ns)を得た。図1(C)に、観測を行った610~790 nmにおける蛍光減衰曲線に対し、グローバル解析を用いて得たDAFS(Decay-Associated Fluorescence Spectra)を示す。ここで、負の成分は指数関数による立ち上がりであり、正の成分は減衰を表す。この図から、PCの蛍光を検出する640 nmと、APCの蛍光を検出する670 nmと、PS IIの蛍光を検出する690 nmにおける各時定数の寄与を比較すると、時定数0.12 nsはPBS-PS II超複体のPC→APC、時定数0.59 nsはAPC→PS IIへのエネルギー移動を表すと考えられる。また、時定数1.57 nsは、PS IIの寿命を表していると考えられる。

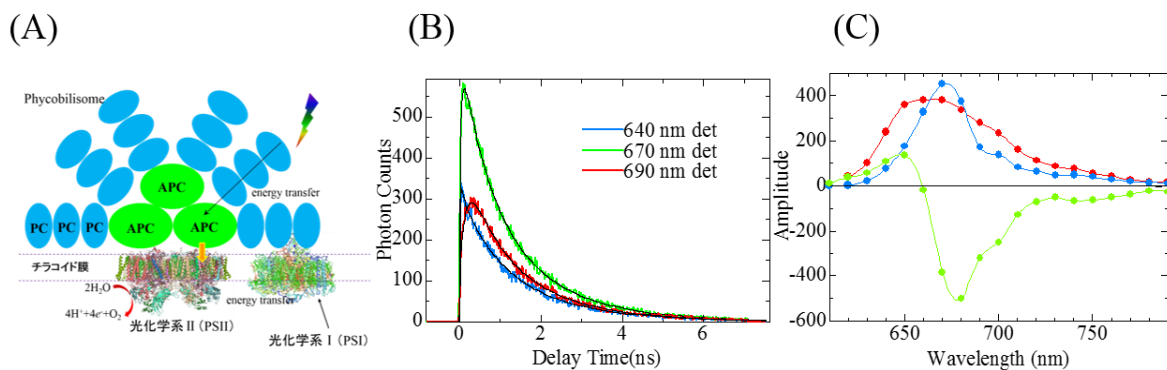


Fig.1 (A) A cartoon model of cyanobacterial antenna-photosystems in thylakoid membrane. (B) Fluorescence decay curves after excitation into PC at 580 nm. (C) Decay-associated fluorescence spectra obtained by a global analysis.

### 【参考文献】

- [1] Zhang, J.; Ma, J.; Liu, D.; Qin, S.; Sun, S.; Zhao, J.; Sui, S. F., Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*. *Nature* **2017**, *551*, 57.
- [2] Liu, H.; Zhang, H.; Niedzwiedzki, D. M.; Prado, M.; He, G.; Gross, M. L.; Blankenship, R. E., Phycobilisomes Supply Excitations to Both Photosystems in a Megacomplex in Cyanobacteria. *Science* **2013**, *342*, 1104.
- [3] Tian, L.; van Stokkum, I. H. M.; Koehorst, R. B. M.; Jongerius, A.; Kirilovsky, D.; van Amerongen, H., Site, Rate, and Mechanism of Photoprotective Quenching in Cyanobacteria. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 18304.

## 静的・動的X線結晶構造解析による生体分子モーターF<sub>1</sub>-ATPaseの 反応素過程構造の決定と力発生の分子機構

<sup>1</sup>東大院・工、<sup>2</sup>東工大・化学生命研、<sup>3</sup>京産大・総合生命、<sup>4</sup>阪大・蛋白研  
<sup>5</sup>高輝度光科学研究センター(JASRI)、<sup>6</sup>理研・SPRING8センター、<sup>7</sup>早大・物理  
○鈴木 俊治<sup>1,2,3</sup>、山下 栄樹<sup>4</sup>、馬場 清喜<sup>5</sup>、平田 邦生<sup>6</sup>、飯田 直也<sup>7</sup>  
遠藤 斗志也<sup>3</sup>、熊坂 崇<sup>5</sup>、久堀 徹<sup>2</sup>、吉田 賢右<sup>3</sup>、野地 博行<sup>1</sup>

### Power-generation mechanism of rotary molecular motor F<sub>1</sub>-ATPase by static and dynamic X-ray crystallographic studies

○Toshiharu Suzuki<sup>1,2,3</sup>, Eiki Yamashita<sup>4</sup>, Seiki Baba<sup>5</sup>, Kunio Hirata<sup>6</sup>, Naoya Iida<sup>7</sup>, Takashi Kumasaka<sup>6</sup>, Toru Hisabori<sup>2</sup>, Toshiya Endo<sup>3</sup>, Masasuke Yoshida<sup>3</sup> and Hiroyuki Noji<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dept of Applied Chem, Graduate School of Eng, The Univ of Tokyo,  
<sup>2</sup>CLS, Inst of Innovative Res, Tokyo Inst of Tech, <sup>3</sup>Dept of Mol Bio, Kyoto-Sangyo Univ,  
<sup>4</sup>Inst of Protein Res, Osaka Univ, <sup>5</sup>Japan Synchrotron Radiation Res Inst (JASRI),  
<sup>6</sup>SPRING8-center, Riken, <sup>7</sup>Dept of Physics, Waseda University

**【Abstract】** F<sub>1</sub>-ATPase (F<sub>1</sub>, hereafter) is a rotary molecular motor driven by ATP-hydrolysis. To reveal its physical-power generation mechanism, we established two analytical systems, static and dynamic X-ray crystallographic systems, by using recombinant bovine F<sub>1</sub>. The studies provided various rotation interim snapshots for elementary steps of release of product phosphate and ADP. The former structures identified stepwise rotation of rotor and widening of the phosphate binding pocket during phosphate release at atomic level. Sequence of the structural transition was further confirmed by our dynamic time-divided X-ray crystallographic study. The ADP-releasing intermediate structures unveiled a dynamic conformational rearrangement in the catalytic subunit (especially at p-loop) for ADP release. These results provide one of power-generation mechanisms that elastic energy accumulated inside protein molecule, originally provided by ATP-binding, is released by the trigger of the phosphate release and converted into the physical power to drive rotation.

**【序】** 生体分子モーターは、ATPの加水分解により力学的エネルギーを発生させるユニークな蛋白質であり、細胞内で筋収縮など重要な役割を担っている。その力発生機構の解明は生体分子モーター研究の最重要研究課題であるが、研究の多くは反応素過程前後の分子状態の比較から力発生過程を推定する事に限られており、肝心の力を発生している瞬間である素過程進行中の分子状態は、今だ良く判っていない。

F<sub>1</sub>-ATPase(以後F<sub>1</sub>)はF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素の部分複合体であり、ATP加水分解により回転力を発生させる回転分子モーターである。約50kDaの回転子サブユニットが330kDaのリング状の固定子の中で回転する。F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素を用いた研究により、その回転を介したエネルギー変換効率はほぼ100%である事から[1]、F<sub>1</sub>もATP加水分解反応と力発生が高度に共役している分子モーターと考えられる。ヒト由来F<sub>1</sub>を用いた顕微鏡一分子回転分析から、そのATP結合、ATP加水分解、リン酸解離の素過程でそれぞれ、65°、30°、25°回転子が回転する事がわかっているが[2]、それらの素過程に蛋白質内で何が起きているかはほとんど分かっていない。そこで近年我々は、新しくウシF<sub>1</sub>の顕微鏡一分子観察システムとX線結晶構造解析システムを確立した[3]。そして今回、通常の静的な結晶構造解析法と新しく確立した動的結晶構造解析法を駆使し、生成物リン酸及びADPの解離過程の中間体構造の決定を行った。そして生体分子モーターの素過程進行中の構造変化を原子レベルで明らかにすることにより、蛋白質が力学的エネルギーを発生する仕組みを解明する事を試みた。

## 【方法・結果・考察】

### 1. 静的結晶構造解析による回転中間体構造の入手

ATP アナログ AMPPNP 存在下、チオリン酸(リン酸アナログ)や ADP の有無の条件で結晶を作成し構造解析を行った(SPring8 BL32XU、BL38B1、BL41XU、BL44XU、PF BL17A)。その結果、回転子の角度が最大 20 度異なる 5 種のリン酸解離中間体構造(チオリン酸結合型 2 種とチオリン酸が非結合型 3 種)と、2 種類の ADP 解離中間体構造を得た。

### 2. 動的結晶構造解析による回転中間体構造の入手

チオリン酸結合型構造の結晶を、チオリン酸が入っていない溶液で洗浄後、様々な時間インキュベート後、液体窒素で凍結し分子状態を固定した。そして回折データを入手し構造決定を行った結果、驚くべきことにインキュベーション時間が長くなるにつれ、回転子が結晶中で段階的に回転していく様子が観測された。この結果は、このウシ F<sub>1</sub> 結晶システムは、結晶を崩壊させずに約 500 残基もの回転子サブユニットが結晶中で回転できる事を示している。得られた回転中間体構造は、上記の静的構造解析により得られた構造と酷似していた事から、これらの中間体構造はリン酸解離過程を正しく検出していることが示唆された。

### 3. 明らかになったリン酸解離駆動の回転力発生機構

得られた中間体構造の比較から以下のような回転力発生機構が明らかになった。触媒サブユニット  $\beta_{\text{emp}}$  は、隣の  $\alpha_{\text{emp}}$  サブユニットら伸びているアルギニンフィンガー残基と、チオリン酸を介して相互作用し引きつけられている。チオリン酸が解離するとその相互作用が消失し、両サブユニットが離れることにより間に隙間が発生するが、その空間は回転軸サブユニットが回転方向に変位しながら入り込んで安定化される、その結果回転力が発生する事が明らかになった。興味深いことに、チオリン酸が外れた部位には、複数の水分子による特殊な構造体を段階的に形成そして崩壊させていく事により、触媒部位の構造変化とそれによる回転子の回転を段階的に発生させている事が判明した。F<sub>1</sub> はパワーストロークモーターと考えられ、安定な力発生のためには準安定な回転中間体状態が存在する事が提唱されている事から、この中間状態の存在は非常に興味深い。また、分子が小さく相互作用数も少ないリン酸が回転トルクを発生させる仕組みは謎であったが、今回の結果は、F<sub>1</sub> 分子は ATP 結合により分子内に蓄積された弾性力のエネルギーを、リン酸解離のトリガーにより開放する事により、回転力を発生させる分子機構を示唆している。

### 4. では、ADP 解離の素過程はどうなっているのか?

以前の顕微鏡一分子観察から得られたヒト F<sub>1</sub> の回転スキームでは、リン酸解離前には生成物 ADP の解離が起きる。ADP とチオリン酸を使った結晶構造解析の結果、ADP 解離中間体構造を 2 種類決定する事に成功した(1.80Å と 1.99Å)。構造の比較から、ADP が触媒サブユニットのヒンジ構造と p-loop 構造の変化を伴い、結合位置をスライドさせながら解離していく分子機構が示唆された。しかし興味深いことに、ADP の解離では回転子は回転しないようである。この結果から新しく分かる事を、顕微鏡一分子解析から得られたヒト F<sub>1</sub> の回転スキームを参照しながら議論したい。

## 【参考文献】

- [1] N. Soga, K. Kimura, K. Kinoshita Jr., Yoshida M, T. Suzuki, *Proc Natl Acad Sci USA*, **114**, 4960-4965 (2017)
- [2] T. Suzuki, K. Tanaka, C. Wakabayashi, E. Saita, M. Yoshida, *Nature Chem Biol*, **10**, 930-936 (2014)
- [3] T. Suzuki, N. Iida, J. Suzuki, Y. Watanabe, T. Endo, T. Hisabori, M. Yoshida, *FEBS Open Bio*, **6**, 1267 (2016)

## 赤外超解像原理を利用した蛍光タンパク質発色団部位の 赤外スペクトル測定

岡山理大・理

○高橋広奈, 三宅智也, 大上達也, 酒井誠

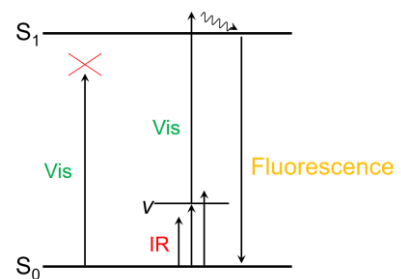
### IR spectrum of fluorescent protein chromosphere by transient fluorescence-detected resonance IR spectroscopy

○Hirona Takahashi, Tomoya Miyake, Tatsuya Oue, Makoto Sakai

*Faculty of Science, Okayama University of Science*

**【Abstract】** It is known that chromospheres in fluorescent protein absorb or emit different wavelength depending on the interaction with amino acids around chromospheres. IR spectroscopy is one of powerful tools for the investigation of structure of biological molecules including proteins. However, there are too many amino acid around chromospheres to detect IR absorption of chromospheres selectively. In addition, it is difficult to measure IR spectra of biological molecules in aqueous solution because of strong IR absorption of water. In this study, we have developed a novel transient fluorescence-detected resonance IR spectroscopy, which detect IR absorption of fluorescent molecules selectively. We have succeeded in measuring the IR spectrum of flavin mononucleotide (FMN) in aqueous solution. The IR spectrum of FMN is compared with the spectrum measured in sound Raman spectroscopy, and the similarity of those spectra will be discussed. In the presentation, we will report the IR spectrum of fluorescent protein chromospheres in aqueous solution.

**【序】** 蛍光タンパク質の中には、類似の発色団を持ちながら、その吸収や蛍光波長が異なるものが存在する。そのような波長の変化は、蛍光タンパク質発色団と周囲のアミノ酸の相互作用が異なるためと考えられている。しかしながら、発色団の構造や周囲との相互作用が実際にどのようなになっているかを分光学的に明らかにした研究は多くない。分子構造に敏感な分光法には赤外分光法があるが、発色団の周囲には多数のアミノ酸が存在するため、発色団部位のみを選択的に観測することは容易ではない。さらに、生体試料の観測に用いられる水溶液中での測定は、溶媒の水が赤外光を吸収してしまうため困難である。そこで我々は、過渡蛍光検出赤外 (TFD-IR) 分光法と赤外超解像原理を利用することで、水溶液中で蛍光タンパク質の発色団部位のみの赤外スペクトルを測定可能な装置を開発した。TFD-IR 法 (Fig. 1) では、特定の赤外光により振動励起した分子のみを可視光で選択的に電子励起することで、 $S_1$  状態から発生する蛍光 (過渡蛍光) を検出する[1]。過渡蛍光強度をモニターしながら赤外光を波長掃引することで、赤外スペクトルに相当する情報が得られる。蛍光タンパク質に置き換えると、可視光を照射した場合、発色団部位からは蛍光が発生するが、周囲のアミノ酸からは発生しない。そのため、TFD-IR 法を利用すると発色団部位のみの赤外スペクトルが得られると考えた。また、可視光と赤外光の重なった部分からのみ過渡蛍光が発生するので、2つ



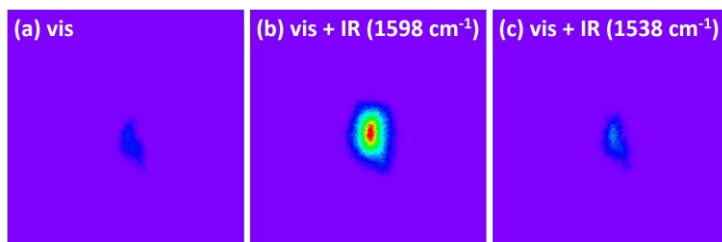
**Fig. 1.** Principle of transient fluorescence detected IR (TFD-IR) spectroscopy.



のレーザー光を集光することで、赤外の回折限界を突破した可視光と同等の回折限界を達成でき、水による赤外光の吸収に阻害されることなく、測定が可能になる。

**【実験】** 励起光源の可視光と赤外光を発生するために、再生増幅器によって増幅させたピコ秒レーザーシステム（パルス幅：2 ps）を採用した。赤外光は 5500 ~ 9000 nm まで波長を可変できるようにした。赤外光と可視光を同軸・同方向から入射し、反射対物レンズで CaF<sub>2</sub> セルの表面に集光させた。発生した過渡蛍光は入射に用いたのと同じ反射対物レンズで集光し、CCD カメラで過渡蛍光を画像として検出した。赤外スペクトルは検出した蛍光強度を赤外波長に対してプロットすることで構築した。

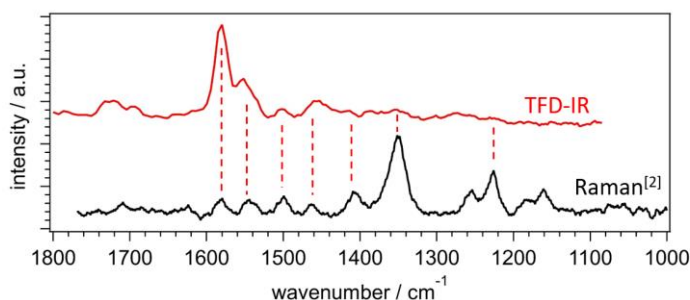
**【結果・考察】** 本研究では、まず、タンパク質補酵素であるフラビンモノヌクレオチド (FMN) について、水溶液中での赤外スペクトル測定を試みた。Fig. 2 は FMN の蛍光画像である。可視光のみを照射した場合、蛍光は観測されない。一方、可視と赤外光 (1598 cm<sup>-1</sup>) を同時に照射すると Fig.



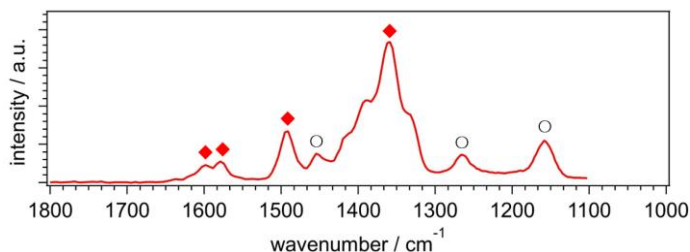
**Fig. 2.** Fluorescence image of FMN (a) without and with (b,c) IR irradiation ( $\nu_{\text{vis}}$ : 527 nm,  $\nu_{\text{IR}}$ : (b) 1598 cm<sup>-1</sup>, (c) 1538 cm<sup>-1</sup>).

2(b)に示すように強い蛍光が発生する。これは、赤外振動と分子振動が一致しているため、過渡蛍光が発生したからである。一方、赤外光が 1538 cm<sup>-1</sup> (Fig. 2(c)) では蛍光が殆ど観測されないが、これは分子による赤外光の吸収が殆ど起こっていないためである。観測された蛍光はスポットであるが、これは反射対物レンズの焦点からの蛍光のみをモニターしているためである。Fig. 3 は過渡蛍光強度の赤外波長依存性を示したもので、赤外スペクトルに相当する。スペクトルを見ると、水による吸収が存在する赤外波長域でもバンドが観測できていることが分かる。得られたスペクトルをラマンスペクトル[2]と比較する (Fig. 3) と、振動情報が一致しているため、本研究で開発した手法で赤外スペクトルに相当するものを測定できると結論した。

Fig. 4 には、同様の手法で水溶液中で蛍光タンパク質の 1 つである phiYFP を測定した結果を示す。図にはいくつかの明瞭なピークが観測されており、この結果を発色団モデル分子のラマンスペクトル[3]と比較すると、(○)においては同じ振動数にバンドが観測された。一方、構造変化に敏感なバンドと報告されている (◆) のピークは、phiYFP では周囲のアミノ酸との相互作用により異なる振動数にバンドが観測されたと考える。これより、phiYFP の発色団部位のみの赤外スペクトル測定に成功したと結論した。発表では、発色団部位は同じで蛍光波長の異なる蛍光タンパク質についても同様の測定を行い、発色団部位の構造や周囲との相互作用について議論する。



**Fig. 3.** TFD-IR and Raman (excitation: 620 nm) spectra of FMN.



**Fig. 4.** TFD-IR spectrum of the chromophore of phiYFP.

**【参考文献】** [1] M. Sakai *et al. Chem. Phys. Lett.* **439**, 171 (2007). [2] M. Sakai and H. Takahashi *J. Mol. Struct.*, **379**, 9 (1996). [3] A. F. Bell *et al. Biochemistry*. **39**, 4423 (2000).

## ヘモグロビンの電子励起状態の光学特性

<sup>1</sup>畿央大教育学習基盤センター, <sup>2</sup>大阪大院基礎工  
○冬木正紀<sup>1</sup>, 竹原輝<sup>2</sup>, 永井正也<sup>2</sup>, 芦田昌明<sup>2</sup>

### Optical Property of Electronically Excited Hemoglobin

○Masanori Fuyuki<sup>1</sup>, Hikaru Takehara<sup>2</sup>, Masaya Nagai<sup>2</sup>, Masaaki Ashida<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Center for Teaching, Learning and Technology, Kio University, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Japan

**【Abstract】** Optical property of electronically excited hemoglobin was investigated by conducting transient absorption measurement of hemoglobin in water. Electronic excitation by UV femtosecond (fs) pulse resonant to the gamma transition induced the decrease of absorbance in the wavelength region from 600 nm to 650 nm. Whereas, NIR fs pulse induced the increase of absorbance in the same wavelength region. The absorbance change remained for several ps after UV pulse irradiation, whereas the change distinguished within several hundred fs after NIR irradiation. These results indicate that hemoglobin molecules excited by UV multiphoton contributed to the negative absorbance change and those excited by NIR multiphoton to the electronic excited states energetically higher than the states reached by the UV multiphoton contributed to the positive absorbance change. In addition, the molecular band-like sequential absorbance change was observed in the wavelength range from 650 nm to 750 nm. The energetic difference between the bands was about  $450\text{ cm}^{-1}$  and the change was attributed to Fe-OH vibration.

**【序】** 血液循環は生体活動においてのみならず、腫瘍治療における薬の体内輸送を担うなど医療においても重要な役割を果たしている。その一方で、可視、近赤外領域において高い吸光特性を持つ血液中のヘモグロビンが、蛍光物質を用いた人体内部の腫瘍検出等を困難にしている。現在は 600nm から 900nm までの比較的吸光度の低い波長領域、いわゆる生体の窓を利用して、体表から数 cm の領域の腫瘍検出や光学力線療法、臓器のイメージング等が行われている[1,2]。

一般に分子は電子励起することによりその光吸収特性が変化する[3]。そこで、本研究では、ヘモグロビンの電子励起により生体の窓がさらに開く可能性の有無を明らかにすることをその目的と定めた。

**【方法】** ヘモグロビン水溶液に超短パルス照射し、水溶液の吸光度のポンプ＝プローブ遅延時間依存性を計測した。ポンプパルスとしてはヘモグロビンのポルフィリンの  $\pi$  電子の Soret 遷移に共鳴する 410nm の UV パルスと、その半分の光子エネルギーを持つ 820nm の NIR パルスを用意した。NIR パルスは、再生増幅器 (High Q Laser 社製、SC-1042-1000HE) からの出力パルス (1KHz、1042nm、約 470fs) を OPA 変換することにより発生させた。また、NIR パルスの 2 倍波を BBO 結晶より発生させて UV パルスとして用いた。そして、再生増幅器の出力パルスをサファイア結晶に照射して発生する白色パルスをプローブパルスとして用いた。ポンプパルスのサンプル上のスポット径は約 0.05mm であり、NIR および UV パルスの強度は各々約  $3\text{mJ}/\text{cm}^2$ 、 $1.3\text{mJ}/\text{cm}^2$  であった。

ヘモグロビン水溶液の濃度は約 0.8 % であり、酸素の溶解込みおよび熱効果を抑制するために約 20°C 以下で循環させた。サーキットには光路長約 0.5 mm の分光光度計

測用セル（ジーエルサイエンス社製、FLAB50-UV-02）を組み込み、ポンプおよびプローブパルスを照射した。そして、ポンプ＝プローブ遅延時間を変化させながら、サンプル通過後のプローブパルスを USB 分光器（Thorlabs 社製、CCS175/M）で分光計測した。

**【結果・考察】** 図 1 に NIR パルス照射直後の過渡吸収スペクトルを記す。600nm から 650nm の領域で吸光度の増加が観測された。電子基底状態のヘモグロビンは 530nm から 600nm にかけてポルフィリンの  $\pi$  電子の遷移に由来する  $\alpha$  および  $\beta$  帯の吸収ピークを持ち、600nm から 650nm の領域はその裾に相当する[4]。そのため、この吸光度変化はヘモグロビン内部のヘムタンパク質の構造が変化したことを示唆している。

図 2 には 625nm における吸光度変化のポンププローブ遅延時間依存性を示す。NIR ポンプパルスの時間幅（約 400fs）相当の時間のみ過渡的な吸光度の変化が観測された。NIR パルスの 2 光子励起で到達する準位での電子寿命が数百 ps と報告されているため[5]、今回の結果は NIR3 光子以上の励起により吸光度の過渡的な増加が引き起こされたことを示唆している。本実験の照射強度は NIR2 光子励起の飽和強度[6]を上回っているため、過渡的に高エネルギー状態が誘起されたと考えられる。

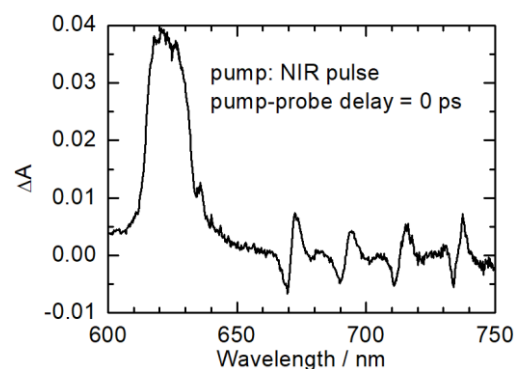
図 2 には UV パルス照射時の吸光度変化の時間プロファイルも示している。NIR 照射時と異なり負の変化が観測された。また、UV パルス照射後も数 ps にわたり負の吸光度変化が観測された。正の遅延時間領域の時間プロファイルは約 0.6ps と 2.6ps の時定数を持つ指数減衰成分の和によりよく再現される（図 2 実線）。これらの結果は、UV2 光子以上の多光子励起により負の吸光度変化が誘起されたこと、そして、その電子励起状態は NIR パルス照射時の電子励起状態よりも低エネルギーであることを示唆している。

なお、図 1 に示すように NIR パルス照射時には 650nm から 750nm にかけて正負が逆転した比較的細いバンドのペアがほぼ等間隔に観測された。これらの間隔は約  $450\text{cm}^{-1}$  であり、電子基底状態におけるヘムタンパク質の Fe と溶媒分子の OH 間の振動エネルギーに相当する[7]。今回の実験結果は、NIR パルス励起時に Fe-OH 結合強度が変化することによっても吸光度の変化が誘起されたことを示唆している。

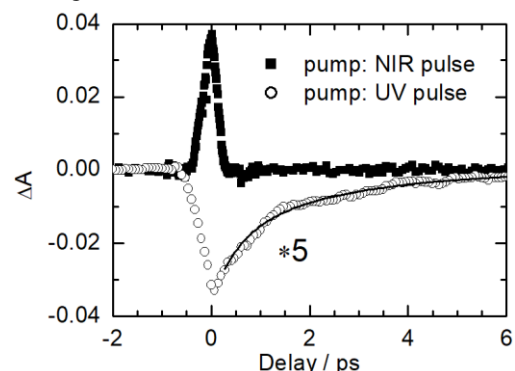
ポンプパルスの波長に対するヘモグロビンの吸光度変化の依存性を示した本研究の一連の結果は、ポンプパルスの波長を選択することにより、生体の窓をさらに開くことが出来る可能性を示唆している。

**【謝辞】** 大阪大学基礎工学部の谷本直輝氏の本研究への協力に感謝致します。

**【参考文献】** [1] J. T. Alander *et al.* *Int. J. Biomed. Imaging* Article ID 940585 (2012). [2] H. Tsujimoto *et al.* *Cancer Sci.* **105**, 1626 (2014). [3] G. Herzberg, “Molecular Spectra and Molecular Structure, III, Electronic Spectra and Electronic Structure of Polyatomic Molecules, 2nd ed.”, (Van Nostrand, New York, 1950). [4] R. Lemberg and J. W. Legge, “Haematin Compounds and Bile Pigments”, (Interscience Publ., New York, 1949). [5] I. Saytashev *et al.* *Biomed. Opt. Express.* **7**, 3449 (2016). [6] G. O. Clay *et al.* *J. Chem. Phys.* **126**, 25102 (2007). [7] T. Kitagawa and T. Ogura in *Progress Inorg. Chem.* (K. D. Karlin Ed.) (Wiley & Sons, New York, 1996) 45, pp. 431-479.



**Fig. 1.** Transient absorbance spectrum of hemoglobin in water.



**Fig. 2.** Absorbance change at 625 nm as a function of pump-probe delay time.



## 生物系に見られる一方向的なプロトンおよび電子移動の 化学的な機構について

<sup>1</sup>京大福井センター

○山本憲太郎<sup>1</sup>, 高塚和夫<sup>1</sup>

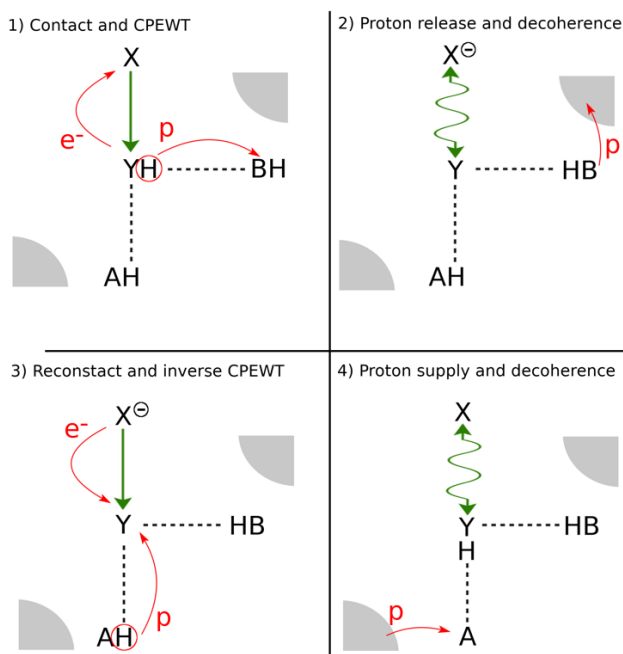
### A Chemical Mechanism of One-Way Proton-Coupled Electron Transfers in Biological Systems

○Kentaro Yamamoto<sup>1</sup>, Kazuo Takatsuka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Fukui Institute for Fundamental Chemistry, Kyoto University, Japan*

**【Abstract】** We propose a chemical reaction mechanism of unidirectional proton transportation, in an analogy of sequential one-way electron transfer [1]. The core molecular moiety that works to transfer protons from one site to another is schematically represented as “ $\cdots\text{AH}\cdots\text{Y}(\leftarrow\text{X})\text{H}\cdots\text{BH}\cdots$ ”, in which AH = acid, BH = base, YH = (weak acid), and X = (redox counterpart for Y). “ $\cdots$ ” denotes hydrogen bonding. Y should become a strong acid when it is oxidized by X. AH is hydrogen bonded to a proton supplying unit (PS), whereas BH is tied with a proton accepting unit (PA). It is shown that the system, if appropriately designed, can perform unidirectional proton pumping from PS to PA. The key to materialize this “chemical machinery” is the contact and the recession of X and Y to switch on and off the electronic coherence for the coupled proton electron-wavepacket transfer (CPEWT) and the inverse CPEWT.

**【序】** プロトンポンプは生化学における基本的な機構のひとつである。たとえば、bacteriorhodopsin (BR) や cytochrome *c* oxidase (CcO) はそのような機能を持ち、生じたプロトン勾配を ATP の合成に利用する。このプロトンポンプは、電子状態の変化と何らかの形でカップルしているため、proton-coupled electron transfer (PCET) として理解されている。実際には、BR では retinal の光励起に伴う、CcO では一連の酸化還元反応に伴う PCET によって、proton pumping がそれぞれ駆動される。どちらの場合も、electron と proton の動力学的な関係は単純ではなく、基本的な機構は明らかではない。本研究は、非対称性を持つタンパクの動作機構によるものではなく、「化学反応的な」原理による一方向的なプロトン移動の機構を提案する。この仕組みを実現する簡単な分子システムの構築とその非断熱電子動力学ダイナミクスの詳細を示す。



**Fig. 1.** Schematic representation of the mechanism of unidirectional proton transportation, which proceeds sequentially from Panel (1) to (4).

**【方法論】** Fig. 1 は、一方向的な電子移動の機構 [1]の類推から構築された、一方向的なプロトン移動の機構の概念図である。ここで AH= 酸, BH= 塩基, YH=弱酸, そして X=(Y に対する酸化および還元剤) である。Y は X に酸化されることによって強酸に変化する。破線は水素結合を示す。AH は proton supplying units (PS, Fig. 1 の各パネルの左下の領域) と, BH は proton accepting unit (PA, 同右上の領域) にそれぞれ水素結合している。そして以下に示すスキームによって実質的に, PS から PA に proton が移動する(= proton pumping): (1) X が YH に近づくことによって, 電子状態的なコヒーレンスが生じ, そこで coupled proton electron-wavepacket transfer (CPEWT) が起こって  $\text{HB}^+\text{H}$ ,  $\text{X}^-$ , そして  $\text{Y}^\bullet$  が生じる。(2) X が  $\text{Y}^\bullet$  から離れてコヒーレンスが切れるため, 逆反応がブロックされる。同時に,  $\text{HB}^+\text{H}$  の proton が PS に渡される。(3) ある程度の時間が経ってから, X が  $\text{Y}^\bullet$  の方に戻ることで再びコヒーレンスが生じ, inverse CPEWT によって X, YH の組が再生される。このとき, AH の方の proton が使われる。(4) X が YH から再び離れるときに, A が PS から proton をもらうことで, AH が再生する。よって, core の部分が最初の状態に戻る。このような機構が実現可能であることを示すために, Fig. 2 に示すような具体的なモデル系を構築する。そしてプロセス全体 (Fig. 3) に対して energetics を計算し, 重要な部分について全自由度の非断熱電子動力学 [2] を計算する。

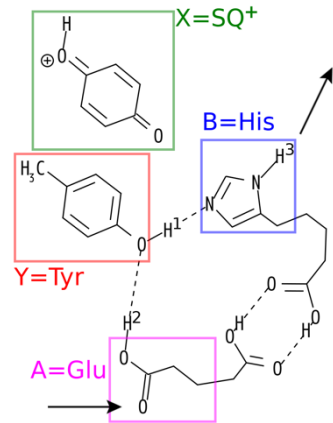


Fig. 2. Model system.

**【結果・考察】** Fig. 3 に示す I から VI の間の全てのモデル系について, 概念的に示す電子状態が, 基底状態として得られた。これらの中で, I→II および III→IV は, proton pumping の機構の鍵となるプロセスである。Proton transfer の一方向性を理解する上で重要なのは,  $\text{X} = \text{SQ}^+$  と  $\text{Y} = \text{Tyr}$  の距離によって, 電子のコヒーレンスの on/off が切り替えられることである。これによって, proton transfer の一方向性がもたらされる。計算結果から, 非断熱遷移がこのような役割を担うことわかる。本講演では, この機構 (proton transfer) に関する計算結果の詳細に加えて, electron transfer の機構 [1]との関連について述べる。これらの機構は, サイト間のコヒーレンスの on/off, および CPEWT によって, 統一的に理解することができる。

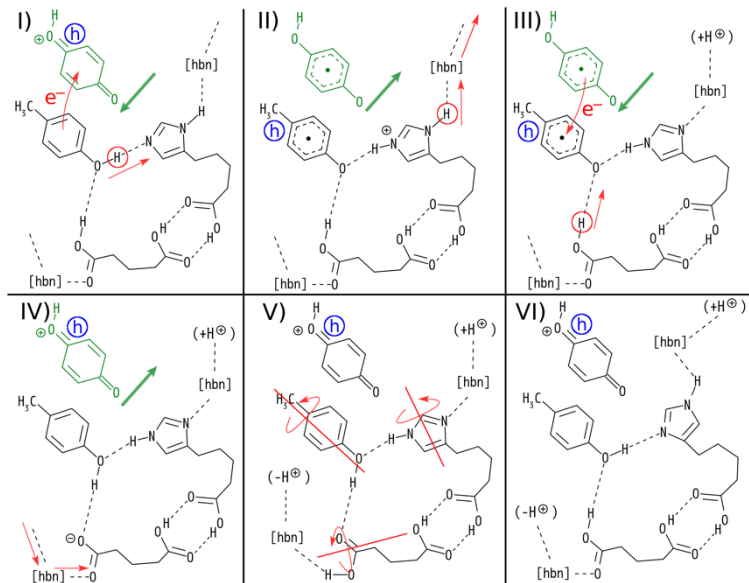


Fig. 3. Schematic snapshots of the one-way proton transfer dynamics; proceeding from panel I to VI. “h denotes hole position.

### 【参考文献】

- [1] K. Yamamoto and K. Takatsuka, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 1229 (2018).  
 [2] T. Yonehara, K. Hanasaki, and K. Takatsuka, *Chem. Rev.* **112**, 499 (2012).