

4P061

液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いたシトクロム *c* の気相分光

学習院大院

○中村優里, 河内宣志, 浅見祐也, 河野淳也

Gas phase spectroscopy of cytochrome *c* isolated by using an infrared-laser ablation of droplet beam.

○Yuri Nakamura, Norishi Kawauchi, Hiroya Asami, Jun-ya Kohno

Department of Chemistry, Gakushuin University, Japan

【Abstract】 Molecular structure of protein is strongly affected by the existence of water molecules. Therefore, the aqueous solvent effect toward protein has been investigated in various areas. Although the simplest method is a structural comparison between gas phase and liquid phase, gas phase spectroscopy of protein is not easy because the sample concentration is extremely low in the gas phase. In this study, cytochrome *c* (Cyt *c*), which is one of heme proteins, was isolated in the gas phase by using an IR-laser ablation of droplet beam. The valance-selected [Cyt *c*]²⁺ ion in a quadrupole ion trap electrode was irradiated with UV-Vis laser (300-650 nm) for the measurement of its photodissociation spectrum. As a result, characteristic absorption bands related to heme structure (α and $n \rightarrow \pi^*$) are additionally observed in the gas phase, which differs from those (Soret and β) in the aqueous solution.

【序】 タンパク質は巨大な分子構造を持ちながら、生体環境で特異な機能を発現する生体高分子である。この時、周囲に存在する水分子はタンパク質構造の安定性に大きく寄与しており、水分子の有無でその安定構造は劇的に変化する。そのため、タンパク質の構造と機能の本質を理解するためには、水溶液中での構造と気相中での構造を比較することが重要となる。本研究では生体環境から切り離された気相中でのタンパク質構造を調べるため、液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いてヘムタンパク質シトクロム *c* (Cyt *c*) を気相単離し、四重極型イオントラップ装置を用いて [Cyt *c*]²⁺ イオンのみを選択的にトラップした。トラップした [Cyt *c*]²⁺ イオンの紫外 - 可視光解離分光測定を行うことで気相中での Cyt *c* の構造情報を得た。さらに水溶液中での紫外 - 可視光吸収スペクトルとの違いから気相中と水溶液中の Cyt *c* 構造の違いを議論した。一般的にヘムタンパク質は、波長 400 nm 付近に Soret 帯と呼ばれる非常に強い吸収帯をもつ。この Soret 帯の長波長側には α 、 β および $n \rightarrow \pi^*$ 帯という 3 種の特徴的な吸収帯が存在する[1]。これらはヘムの酸化還元反応、pH 変化、変性剤の有無によって鋭敏に変化する。そこで本研究では、これらの吸収帯が観測される 300-650 nm の範囲で分光測定を行った。

【実験】 100 μ M の Cyt *c* 水溶液を液滴ノズルから直径約 70 μ m の液滴として大気中に射出した。生成した液滴を 3 段階の差動排気を通して高真空中 ($\sim 2 \times 10^{-6}$ Torr) に導入した。飛行時間型質量分析計のリング電極内部に到達した液滴に赤外レーザー光 (3591 cm^{-1} , 7.3 mJ/pulse) を照射することで溶媒を蒸発させ、液滴中の Cyt *c* イオンを気相単離した。リング電極に RF 電圧 (130 kHz, 1.2 kV_{p-p}) を印加することにより [Cyt *c*]²⁺ イオンを価数選択的トラップした。70 ms のトラップ時間経過後に加速電極にパルス電圧を加えてイオンを加速し、リフレクトロン型の飛行時間型質量分析計を用いて質量スペクトルを測定した。また、トラップした気相 [Cyt *c*]²⁺ イオンに紫外 - 可視光 (300-650 nm, 2.9-29 mJ/pulse) を照射し、光解離信号を観測した。

【結果・考察】 トラップした[Cyt c]²⁺に紫外 - 可視光を照射した結果、光解離信号としてヘムイオン(616 m/z)、Fe⁺、H⁺ (H₂O)_n (n=1-5)がフラグメントイオンとして観測された。波長 405 nm のレーザー光を照射したときに生成するヘムイオンの面積強度と可視レーザー強度に対する依存性を図 1 に示す。横軸、縦軸はそれぞれレーザー強度、ヘムイオンの面積強度の自然対数をとったものである。図 1 の傾きから[Cyt c]²⁺の光解離は一光子過程が支配的であることが明らかになった。次に、ヘムイオンをモニターして測定した気相[Cyt c]²⁺の紫外 - 可視光解離スペクトルと Cyt c 水溶液の吸収スペクトルを図 2 に示す。Cyt c 水溶液の吸収スペクトルでは Soret 帯、β 帯がそれぞれ 410、530 nm に観測された。一方、気相[Cyt c]²⁺イオンの光解離スペクトルでは Soret 帯に帰属できる~385 nm のピークに加え、470-650 nm に溶液のスペクトルより長波長に広がるブロードなピークが観測された。Soret 帯(~385 nm)では吸収スペクトルに比べて気相中のスペクトルは短波長側にシフトした。Soret 帯のピークの左にある肩(~350 nm)は吸収スペクトル、紫外 - 可視光解離スペクトルの両方で観測されている。470-650 nm の範囲では、水溶液中では β 帯のみが観測されたのに対し、気相では α 帯 (575-620 nm)、n→π*帯 (620-650 nm)も観測された。このようなスペクトルの形状変化は、Cyt c 周囲の(1) pH が中性から酸性に変化する、もしくは(2) ナトリウムイオンや塩化物イオンなどのイオン濃度が上昇する際に顕著に観測される[2]。いずれの状態も Cyt c 内の α - ヘリックス構造がランダムコイル構造に変化することに伴って、ヘムに配位するヒスチジン残基の結合状態の変化と鉄イオンのスピン状態の変化を生じる[2]。本研究では気相環境での Cyt c を標的としている点や、比較的低価数の Cyt c イオンを観測している点を踏まえると、後者の要因が主にスペクトル形状の差異に影響していると考えられる。今後は β 帯、α 帯、n→π*帯でのレーザー強度依存性を調べ、解離スペクトル内での相対強度の比較を試みる。また、気相 Cyt c 内のヘム構造を詳細に解明するために、共鳴ラマンスペクトルの測定を行う予定である。

【参考文献】

- [1] M. R. Dayer, A. A. Moosavi-Movahedi, M. S. Dayer., *Protein & Peptide Letters*, **17**, 473 (2010).
- [2] M. coletta, H. Costa, G. D. Sanctis, F. neri, G. Smulevich, D. L. Turner, H. Santos, *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 24800 (1997).

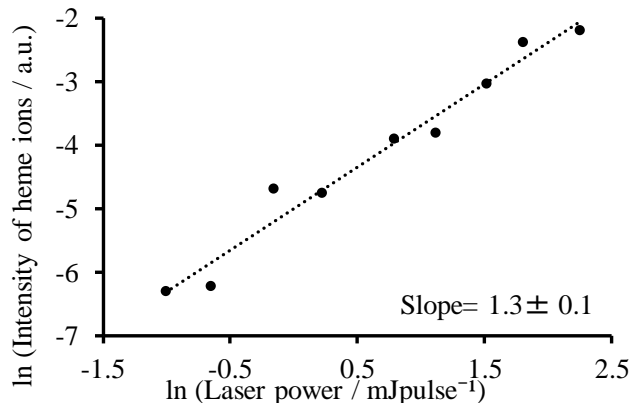


Fig.1 Intensity of heme ions as a function of visible laser (405 nm) power.

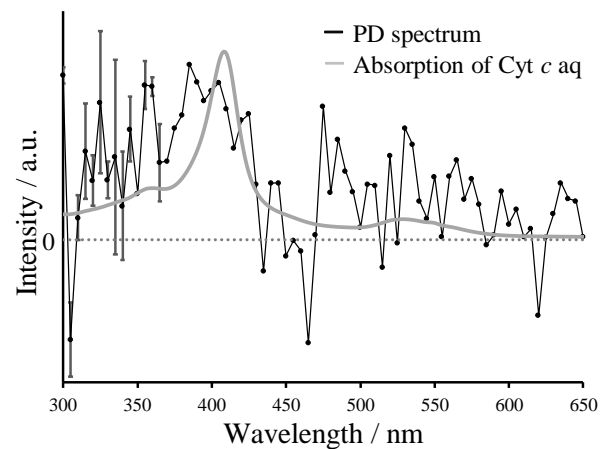


Fig.2 A photodissociation(PD) spectrum obtained from gas phase Cyt c and an absorption spectrum of aqueous Cyt c solution.