

イエロープロテイン励起状態における フェムト秒構造ダイナミクスの実時間追跡

倉持光¹, 竹内佐年¹, 上久保裕生², 片岡幹雄², 田原太平¹

理研・田原分子分光¹, 奈良先端大・物質創成²

イエロープロテイン(Photoactive Yellow Protein: PYP)は紅色光合成細菌(*Halorhodospira halophila*)の負の走行性を担う光受容タンパク質と考えられており、Cys69残基に繋がれた発色団分子p-クマル酸 (pCA: 図1) のフェムト秒〜ピコ秒スケールで進行するtrans-cis光異性化がその機能を誘起するとされている[1]。すなわち、この光異性化は、その後の多くの過渡種を伴ったミリ秒に渡る光サイクルを引き起こす重要な光反応初期過程であり、PYPの機能発現機構を分子レベルで理解するために様々な側面から興味を持たれてきた。しかし実験上の困難により、これまでこの超高速初期過程における構造変化の知見は得られておらず、その包括的な理解は未だに得られていない。

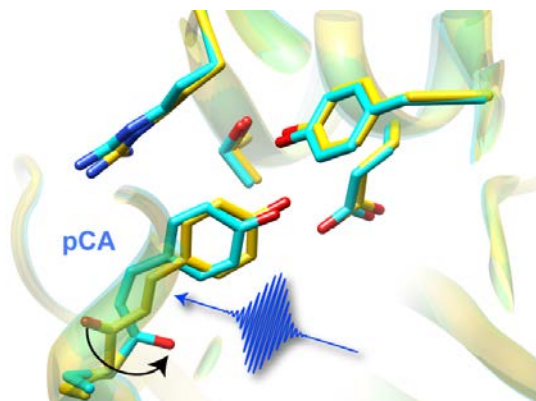


図1. PYP 中における pCA の光異性化。

このような状況のもと、最近我々は新たにフェムト秒時間領域での時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを得ることができる紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光法 (UV-FSRS) を開発した[2]。このUV-FSRSを用いて水溶液中におけるpCAの励起状態構造ダイナミクスを研究し、フェムト秒時間領域での過渡ラマンスペクトル形状の変化を観測することに初めて成功した[3]。そのスペクトル変化から、水溶液中ではpCAの励起状態における構造変化はC_{et}=C_{et}結合のねじれではなく主に分子平面内の変形である、と結論した。この結果は、pCAが励起状態でC_{et}=C_{et}結合まわりにねじれるという、PYPについてこれまで予想されてきた描像と大きく異なるため、実際のタンパク質環境中におけるpCAの振舞いの解明が一層興味深い課題となっていた。そこで、今回我々はUV-FSRSを用いてPYPの励起状態におけるフェムト秒構造ダイナミクスの実時間観測を行った。

UV-FSRS は3つの光パルスを用いて行う。まず光反応を開始させるための励起光 (Ex) により電子励起状態を生成させる。任意の遅延時間の後、励起状態の吸収に共鳴する紫外狭帯域ラマンポンプ光 (Rp) とフェムト秒白色光 (Pr) を同時に照射し、励起状態の振動をラマン利得信号として検出する。実験では光源としてチタンサファイア再生増幅器の出力(800 nm, 80 fs, 1 kHz)を用い、OPA の出力の第3高調波(450 nm)をEx光として、またCaF₂中で発生させたフェムト秒白色光をPr光として用いた。また紫外Rp光には狭帯域OPAの出力の第2高調波(330 nm)を用いた。この時間分解スペクトル測定における波数分解能と遅延時間精度はそれぞれRp光の帯域幅、Ex光とPr光の相互相関幅で決まり、それぞれ約15 cm⁻¹, 100 fsであった。

図2にPYPの吸収、蛍光スペクトルと450 nmで光励起した場合に得られるフェムト秒過渡吸収スペクトルを示す。まず光励起直後には375 nmをピークとして320 nm から400 nmに幅広い励起状態吸収帯が現れる。加えて基底状態吸収のブリーチ信号、及び誘導放出信号がそれぞれ

450, 500 nm を中心として観測された。これらの信号は約 0.8, 2.5, 13 ps の 3 つの時定数で表される減衰を示した。この 3 つの時定数は発色団を囲むタンパク質環境が不均一なことに起因する励起状態寿命の違いを反映していると考えられている。励起後 20 ps 以降のスペクトルには 500 nm 付近に pCA が cis 体である基底状態の中間体 (I_0 状態[4]) に帰属される長寿命の過渡バンドも確認できた。観測された PYP 励起状態の構造ダイナミクスを調べるために我々は、Rp 光の波長が励起状態吸収のみに共鳴する条件で UV-FSRS 測定を行った。励起状態吸収帯に共鳴する 330 nm の Rp 光を用いた場合に観測される UV-FSRS スペクトルを図 3 に示す。このデータから分かるように、400 cm^{-1} から 1700 cm^{-1} にかけて複数の過渡ラマンバンドが観測された。これらのバンドは励起状態の消失に伴って減衰するが、その間に大きなスペクトル形状の変化は見られない。また高波数領域 (1400 cm^{-1} から 1700 cm^{-1}) において多くのバンドが観測されており、異性化反応追跡のマーカとなる $C_{et}=C_{et}$ 伸縮振動バンドもこの領域に含まれていることが示唆される。これらの結果は、pCA の $C_{et}=C_{et}$ 結合が励起状態においても依然として二重結合性を有しており、大きくねじれてはいないことを示している。

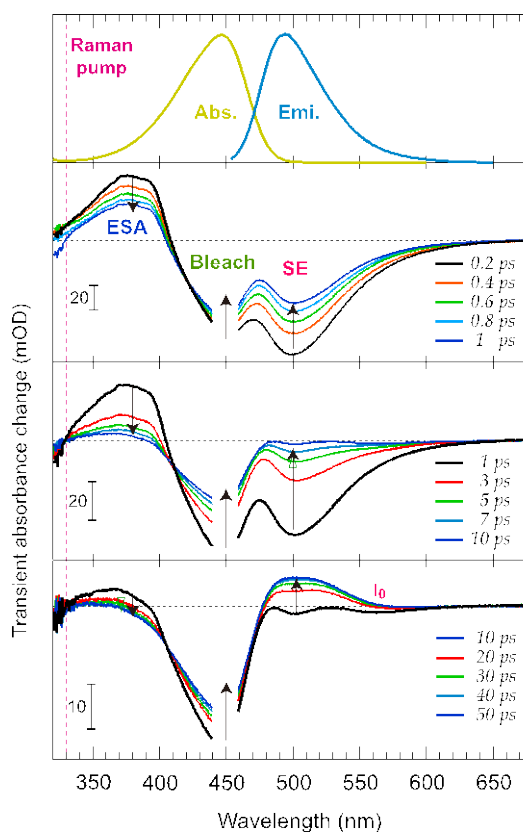


図 2. PYP の定常状態吸収、蛍光スペクトル及びフェムト秒過渡吸収スペクトル。

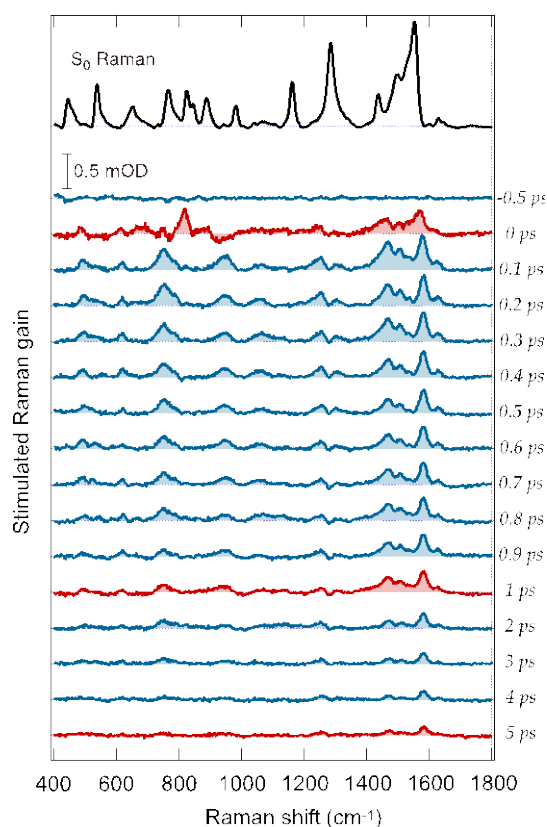


図 3. UV-FSRS スペクトル($R_p=330$ nm)と基底状態のラマンスペクトル。観測はストークス側で行っている。

【参考文献】

- [1] Hellingwerf, K. J.; Hendriks, J.; Gensch, T. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 1082. [2] 竹内佐年・倉持光・田原太平, 第 5 回分子科学討論会, 2011, 2P023 [3] Kuramochi, H.; Takeuchi, S.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 2025. [4] Ujj, L.; Devanathan, S.; Meyer, T. E.; Cusanovich, M. A.; Tollin, G.; Atkinson, G. H. *Biophys. J.* **1998**, 75, 406.