

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770125
 研究課題名(和文) 超高感度時間分解赤外分光システムの開発 ～プロトンポンプ機構の
 解明～
 研究課題名(英文) Development of a Time-Resolved Infrared Spectrophotometer ～
 Elucidation of the proton pumping mechanism ～
 研究代表者
 山口 悟 (YAMAGUCHI SATORU)
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
 研究者番号：20347529

研究成果の概要(和文)：

フェムト秒赤外白色レーザーを光源とした赤外分光装置を試作設計した。微弱信号の赤外測定は水蒸気由来の信号の影響が大問題となるので測定システムすべて覆うチャンバーを作成し、乾燥窒素ガス充填を行った。微小流路中を流れる試料にポンプ/プローブ法を用いる時間分解測定のためにマイクロフローチップを作製した。これらの装置を用いて光路長 50 μm のセルを用いて緩衝液中の存在するチトクロム c の酸化還元差スペクトルの測定に成功した。

研究成果の概要(英文)：

A femtosecond infrared laser was combined to our infrared spectrometer for light source. A chamber was constructed to cover while optical system because the water vapor makes IR spectra worth remarkably and it was filled with dry N_2 gas. For time-resolved IR experiment, a micro flow cell that dimension has 50 x 10^{-6} m (light path length) and 400 x 10^{-6} m (flow pass width) was made by sandwiched SU-8 polymer between CaF_2 windows. A difference spectra between reduced state and oxidized state of cytochrome c oxidase was acquired by using these system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,330,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：時間分解測定 赤外分光 プロトンポンプ

1. 研究開始当初の背景

チトクロム c 酸化酵素はミトコンドリア電子伝達系に存在し、 O_2 を水に還元すると同時に電子伝達に共役してプロトンを膜の内側か

ら外側に能動輸送する。プロトンポンプ機構を解明するためには Asp51 側鎖カルボキシル基の化学状態を決定する必要がある。可視吸収をもたないアミノ酸残基の構造解析に

は赤外吸収分光法が利用されるが、水溶液中の蛋白質に適用できる高精度・高感度の赤外分光装置はいままで開発されていなかった。

2. 研究の目的

赤外分光装置に赤外レーザーを組み合わせて高感度時間分解赤外分光装置を完成させ、その後、Asp51 側鎖カルボキシル基の変化を時間軸にそって追跡してプロトンポンプ反応機構を解明する。

3. 研究の方法

1. フロー法を用いた高感度時間分解赤外分光装置の完成

輝度が高く、中赤外域で連続した波長成分を含む赤外白色レーザーを光源として現有の装置に組み合わせる。

2. Asp51側鎖カルボキシル基の時間分解測定

プロトン放出基の一つと推定されている Asp51 側鎖カルボキシル基のプロトンが O_2 還元反応の「どの時点」で移動し、ポンプされるのかを明らかにする。静的な実験から 1738cm^{-1} に観測される信号は Asp51 の側鎖カルボキシル基（プロトン化型）に帰属されているので、酸素反応開始直後から時間軸にそって「 1738cm^{-1} の信号」を追跡する。

4. 研究成果

現有の赤外分光装置に赤外白色レーザーはフェムト秒レーザーを数種類組み合わせた。安定化の為に、温調、湿度のコントロールを行った。また種となるレーザーの電源ノイズを極力減らした。その結果、中赤外域（ $1000\text{cm}^{-1} \sim 2000\text{cm}^{-1}$ ）で 400cm^{-1} の幅を持つ安定な発振に成功した。さらに測定に使われる全ての機器を一台のコンピューターで制御するプログラムを新たに作成した。またコンピューター内部の電源を源泉とするノイズを極限にまで減らす工夫を行った。これらにより精度の高い繰り返し積算が行なえるようになった。我々が目指している蛋白質由来の微弱信号を精度良く測定するためには、水蒸気由来の信号の影響が大問題となる。そこで測定システムすべて覆うチャンパーを作成し、乾燥窒素ガス充填を行い、相対湿度をほぼ0%にすることに成功した。蛋白質は緩衝液に懸濁されているが、 H_2O の信号は $4 \times 10^{-3} A/\text{cm}$ の温度依存性があり、この温度依存性は微小変化の追跡には許されないふらつきとなる。そこでセルと恒温槽と組み合わせることで温調、恒温を可能とする新しいセルを設計、製作した。この装置を用いて光路長 $50 \mu\text{m}$ のセルを用いて緩衝液中の存在するチトクロム c の酸化還元差スペクトルの測定に成功した。ここにフェムト秒赤外白色レーザーを光源とした赤外分光装置が完成した。

さらに時間分解実験の検討を行った。微小流路中を流れる試料にポンプ/プローブ法を用いて時間分解測定を計画をした。

まず、我々の目的の速度で均一に二液を混合することが出来るミキサーの検討を行った。比較検討した結果、市販のミキサーが最適であることが分かった。次にマイクロフローチップを作製した。赤外レーザー光を用いて水溶液の測定を行うので、光路長 $50 \mu\text{m}$ 、流路幅 $400 \mu\text{m}$ 径に設定し、試料と参照を同時に測定するダブルビーム方式で測定を行うのに最適なフッ化カルシウム製セルを設計/試作した。二枚のフッ化カルシウムの板の上に厚さ $50 \mu\text{m}$ の SU-8樹脂を塗布し、硬化させてセルを作製した。チップ内は高圧になるので極微小のピンホールも許されないが、試行錯誤を繰り返した結果マイクロフローチップを完成させた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計5件)

I. Kawamura, H. Yoshida, Y. Ikeda, S. Yamaguchi, S. Tuzi, H. Saitô, N. Kamo, A. Naito., Dynamics Change of Phorbodopsin and Transducer by Activation: Study Using D75N Mutant of the Receptor by Site-directed Solid-state ^{13}C NMR, *Photochem Photobiol.*, 84, 291-230, (2008)

K. Ikemura, M. Mukai, H. Shimada, T. Tsukihara, S. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura, Red-Excitation Resonance Raman Analysis of the $n_{\text{Fe=O}}$ Mode of Ferryl-Oxo Hemoproteins, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 14384-14385, (2008)

I. Kawamura, J. Tanabe, M. Ohmine, S. Yamaguchi, S. Tuzi, A. Naito, Participation of the BC loop in the correct folding of bacteriorhodopsin as revealed by solid-state NMR, *Photochemistry and Photobiology*, 85, 624-630, (2009)

J.G. Liu, T. Ohta, S. Yamaguchi, T. Ogura, S. Sakamoto, Y. Maeda, Y. Naruta, Spectroscopic Characterization of a Hydroperoxo-Heme Intermediate: Conversion of a Side-On Peroxo to an End-On Hydroperoxo, *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 9262-9267, (2009), selected VIP (Very Important Paper)

N. Uekama, T. Aoki, T. Maruoka, S. Kurisu, A.

Hatakeyama, S. Yamaguchi, M. Okada, H. Yagisawa, K. Nishimura, S. Tuzi, Influence of Membrane Curvature on the Structure of the Membrane-Associated Pleckstrin Homology Domain of Phospholipase C- δ 1, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembrane*, 1788, 2575-2583, (2009)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山口 悟 (YAMAGUCHI SATORU)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助

教

研究者番号：20347529