

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：74417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22750021

研究課題名（和文） 蛋白質内超高速光反応のコヒーレントダイナミクス

研究課題名（英文） Coherent Dynamics of Ultrafast Photoreactions in Proteins

研究代表者

谷口 誠治 (TANIGUCHI SEIJI)

(財) レーザー技術総合研究所・レーザーバイオ化学研究チーム・研究員

研究者番号：00342725

研究成果の概要（和文）：本研究では、光に対し顕著な応答を示す光活性蛋白質の極初期で起こる光分子反応過程を、時間幅 7.5 フェムト秒 (10^{-15} 秒) の超短パルスレーザーを用いた過渡吸収法により検討した。その結果、光合成細菌の目の機能を果たす蛋白質 (PYP) の光励起状態における発色団分子の振動モードの観測に初めて成功し、蛋白質の持つ構造が特定の分子振動を誘起することにより超高速異性化を引き起こす一因となることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have investigated initial photo-reaction processes of photo-active proteins which shows remarkable response to light irradiation by transient absorption measurement using ultrashort pulse laser with 7.5 femtosecond (10^{-15} second) width at time. As a result, we succeeded in the observation of the vibration modes of the chromophoric molecule in the photo-excited state of protein (PYP) which functioned as the eyes of the photosynthetic bacteria for the first time and elucidated that the structure of the protein causes ultrafast isomerization by evoking specific vibration modes of the chromophore.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：分子分光・光化学

1. 研究開始当初の背景

光活性蛋白質は、一般に光を吸収して反応する分子（発色団）が蛋白質内に巧みに配置されており、その反応は高い効率で起こることが知られている。これらの代表的なものとして、光合成の初期過程において光誘起電子

移動を示す反応中心複合体や、視覚機能の初期段階で発色団であるレチナールの光異性化を示すロドプシン等は古くから知られており、その反応メカニズムを解明することを目的として数多くの研究が行われてきた。中でも、パルスレーザーを光源として用いた時

間分解計測手法は、反応過程を直接的に観測できることから多く用いられ、それらの初期反応が寿命 200fs 以下の超高速過程を含む等、多くの事実が示されてきた。

このような研究と関連し、我々はこれまで、パルス幅約 100fs の超短パルスレーザーを用いた時間分解蛍光計測法（蛍光アップコンバージョン法）を主として用い、光活性蛋白質 Photoactive Yellow Protein (PYP) (図 1(a)) のフェムト秒領域での蛍光ダイナミクスを観測し、その光初期反応メカニズム、ダイナミクスを明らかとする研究を行ってきた。PYP は青色光から逃げる性質（光負走光性）をもつ好塩菌 (*Halorhodospira halophila*) 中に含まれ、青色光を吸収する発色団 (*p*-クマル酸) を持つ。PYP は発色団の光吸収による trans-cis 異性化反応 (図 1(b)) がトリガーとなり、蛋白質の構造変化を伴ういくつかの中間体を経て元の状態に戻る光サイクル反応を示すことから、バクテリアの視覚機能を果たす蛋白質であると考えられている。これまでの研究で明らかとなった結果をまとめると以下ようになる。

- (1) *p*-クマル酸の光異性化は約 100fs の寿命成分を含む超高速過程である。
- (2) 発色団の蛍光は凝集系では励起後数 ps までに見られる Dynamic Stokes shift を示さず、水による溶媒和の影響を受けない。
- (3) 蛋白質の構造を解いた状態では光異性化は起こらないか、或いは非常に遅くなる (>10ps)。
- (4) パルス幅を約 70fs まで圧縮し時間分解能を高めた (約 120fs) 測定から、蛍光減衰曲線に 2 種のコヒーレント振動モード (約

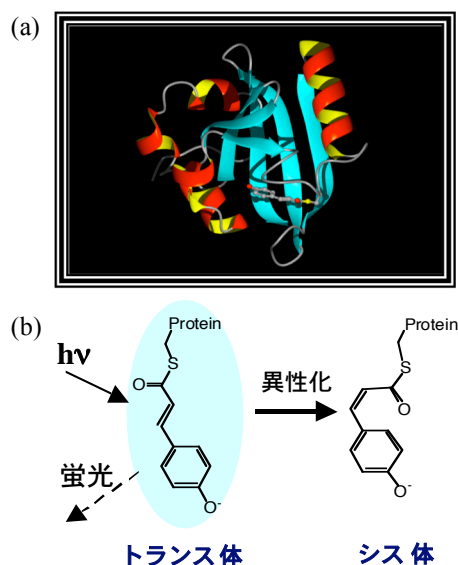


図 1 (a) 光活性黄色蛋白質 PYP の立体構造と (b) 発色団 (*p*-クマル酸) の光異性化

140 cm^{-1} 、 $\sim 50\text{cm}^{-1}$) が付随していることを明らかにした (図 2)。更にラマン分光測定、理論計算との比較等から、約 140 cm^{-1} の振動成分が *p*-クマル酸の面外骨格振動 (γ_{16} モード) であると同定した。この結果は、蛋白質の持つ構造により光起時に系のコヒーレンスが保たれ、発色団の特定の分子振動モードが誘起されることで超高速異性化反応の起因となっている可能性を示唆したものである。

これらの結果は蛋白質環境場における光反応過程が特異的なものである事を示している。一方、測定手法によるデータ精度の問題から振動成分の振動数やダンピング時間の解析精度がやや悪く、また測定の間分解能の限界からより高振動の振動成分が検出されない等問題点は残された。

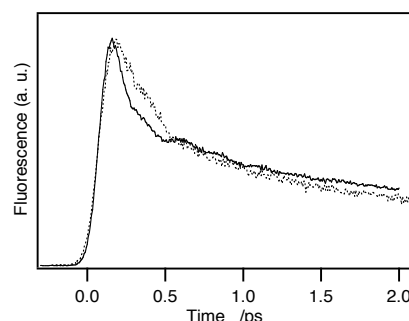


図 2 PYP の蛍光減衰曲線 (観測波長 470nm (実線)、580nm (点線))

また我々は、フラビン蛋白質の光反応の研究についても同様に行ってきた。フラビン蛋白質は多くの動植物や微生物中に含まれ、生体内での酸化還元反応や電子輸送等の重要な役割を担っており、酸化還元能の高い分子として FMN (flavin mononucleotide) あるいは FAD (flavin adenine dinucleotide) を内包している。フラビン蛋白質の反応は通常暗条件で起こり、光により誘起されるものではないが、光励起によっても電子移動反応を引き起こす事が知られる。発色団は FMN あるいは FAD 中のイソアロキサジン (ISO) (図 3) であり、光励起により ISO 近傍に存在する芳香環を持つアミノ酸 (トリプトファン、チロシン、(図 3)) から ISO への電子移動反応が起こる。我々はフラボドキシ (Flavodoxin) やリボフラビン結合蛋白質 (Riboflavin Binding Protein)、FMN 結合蛋白質 (FMN Binding Protein) 等種々のフラビン蛋白質のフェムト秒蛍光計測を行い、概して寿命 200fs 以内の超高速で電子移動反応が起こることを明

らかとしている。一方、PYP で観測されたような蛍光振動成分は観測される事は無かった。しかしながら、このような超高速電子移動には反応とカップルするより高い振動数の複数の振動モードが関与する可能性がある。

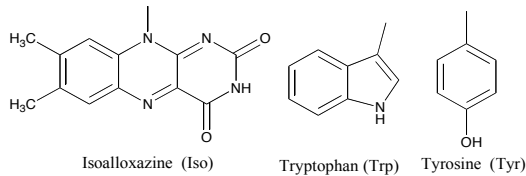


図3 フラビン蛋白質の発色団(ISO)および電子移動に関与するアミノ酸(Trp、Tyr)

2. 研究の目的

上記の時間分解蛍光計測法による研究では、時間幅 70fs のパルスレーザーを用いたため、データ精度の問題から振動数やダンピング時間の解析精度が若干悪く、また時間分解能の限界から高振動数領域 ($>500\text{cm}^{-1}$) の成分が検出されない等、問題点は残された。これらの問題を解決するためには、より高い時間分解能でより精度の高い分光手法による観測が必要である。そこで本研究では、これまでよりも更に時間幅が短い sub-10fs のパルスレーザーを光源とした計測法を用いて光活性蛋白質の光励起過程を観測し、反応に関わる振動モードを抽出、解析することで蛋白質環境場下での超高速光反応の起因を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

光活性蛋白質のコヒーレントダイナミクスを観測するため、本研究では sub-10fs の超短パルスレーザーを光源とした過渡吸収計測法は、第一の光 (ポンプ光) により試料を励起した後、タイミングを変えて第二の光 (プローブ光) を照射することで、光励起後の試料の任意の時間での吸収スペクトル (過渡吸収スペクトル) を観測する手法である。この手法により、パルス光の時間幅が分子振動の周期よりも短くなり、吸光度の経時変化に振動成分が付随するようになる。これらの振動成分の周波数等の解析により、(電子励起状態での) 分子振動と光反応過程の関連性がより明確になることが期待される。超短パルス光源として、チタン-サファイアレーザーの第二高調波を中空ファイバーに通して波長域を広げ、その後プリズムペアとデフォーマ

ブルミラーを組み合わせた分散補償システムによりパルス光の時間幅を圧縮したものをを用いた。これにより、波長幅 80nm (中心波長 $\sim 400\text{nm}$)、パルス光の時間幅約 7.5fs (FWHM) の超短パルス光が得られる。このパルス光を2つに分け、一方をポンプ光に、もう一方をプローブ光として用いた。また光検知には128チャンネルの同時検出が可能なマルチチャンネルロックイン-アンプシステムを用いた。計測中は光照射による蛋白質試料の劣化を防ぐためフローセル、あるいは回転セルを用いた。またフローセルはガラスの板厚および光路長が 0.5mm のものを用い、ポンプ光、プローブ光の分散による時間分解能の低下を抑えた。

4. 研究成果

(1) PYP の光初期反応のコヒーレントダイナミクス

光活性蛋白質 PYP について、過渡吸収計測法により観測した励起後 150fs から 1800fs の各時間における過渡吸収スペクトルを図 4 に示す。PYP の電子励起状態からの trans-cis 異性化反応により $S_n \leftarrow S_1$ 吸収は時間の経過と共に減少し、それに対応してブリーチは小さくなる。

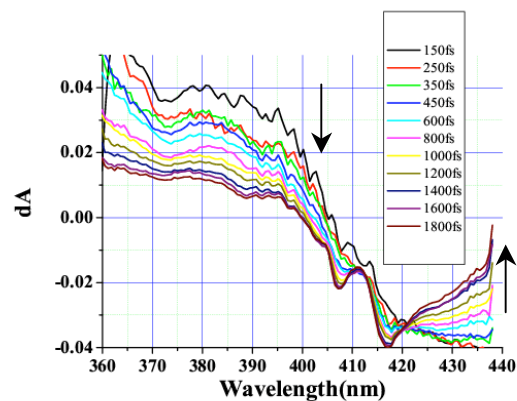


図4 PYP の過渡吸収スペクトル (励起後 150fs-1800fs の各スペクトル、矢印は時間経過に伴う吸光度の変化の方向を示す)

図5に各波長での吸光度の経時変化を示す。 $S_n \leftarrow S_1$ 吸収の波長領域 (370-377nm) では、吸光度は寿命約 100fs の減衰成分を含む多成分指数関数で減衰し、これは時間分解蛍光測定で得られた挙動とほぼ同様である。また同様に低周波数域の振動成分も観測されるが、そ

の大きさは蛍光測定で得られたものと同様であり、低周波数域ではより明確な振動成分は観測されなかった。一方、他の波長（378-385nm、409-416nm、431-437nm）では、これまでの測定では見られなかった振動成分が数種新たに観測され、波長により主に観測される振動数が異なる。また、波長 378-385nm、431-437nm での振動成分は励起後 500fs 程度でほぼ消失（ダンピング）しており、PYP の異性化反応における超高速寿命（ ~ 100 fs）との相関が見られることから、この分子振動が PYP の超高速過程に寄与している可能性がある。新たに観測された振動成分の分子振動モードの同定を行うため、観測データをフー

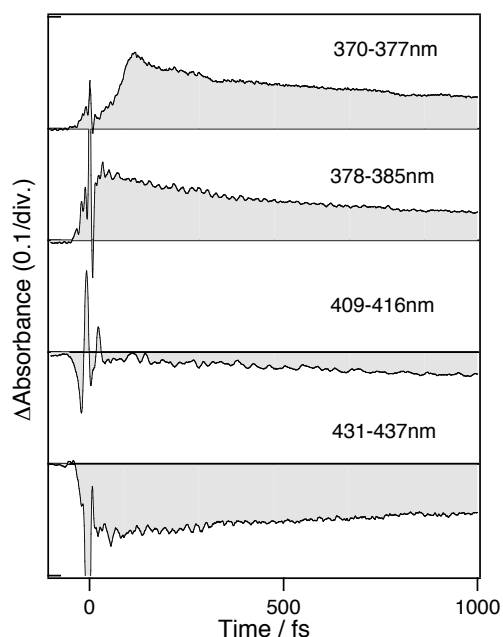


図5 各波長での PYP の吸光度の経時変化 (吸光度の平均値)

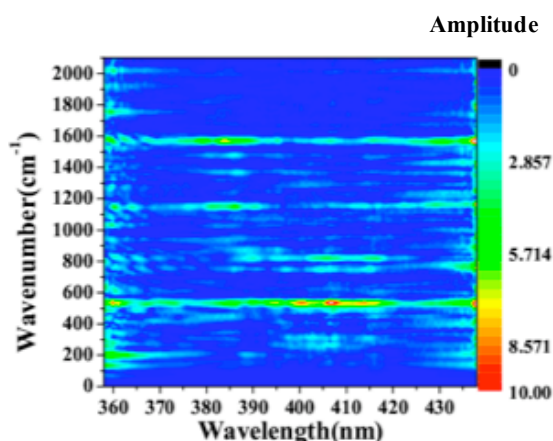


図6 各波長における振動成分 (横軸は波長、縦軸は波数、振動強度 (amplitude) は色の変化で示す)

リエ変換し振動成分を抽出した。結果を図 6 に示す。1570 cm^{-1} 、1163 cm^{-1} 、537 cm^{-1} に顕著なピークが観測されており、1570 および 1163 cm^{-1} のものは主として $S_n \leftarrow S_1$ 吸収の領域 (<400nm) で高い強度を持ち、一方 539 cm^{-1} の振動はブリーチ (>400nm) で強く観測されている。このことから、上記した励起後 500fs でダンピングする分子振動モードは 1570 cm^{-1} (または 1163 cm^{-1}) の振動数を持つことが分かる。次に、これらのピーク値を PYP の共鳴 raman 散乱測定結果と比較した。それぞれ類似した波数に raman ピークが観測されており、振動成分はそれぞれ分子平面に水平な面内 (in-plane) 振動 ν_{13} モード、 ν_{25} モード、 ν_{36} モードとして同定できる (表 1)。ただし、各振動成分の波数、特に ν_{13} モードの値はラマン測定値に対し 13 cm^{-1} と大きく高波数側にシフトしており、この振動成分は PYP の電子励起状態のものであると考えられる。分子軌道計算により得られた *p*-クマル酸の各面内 (in-plane) 振動モードを図 7 に示す。 ν_{13} モードは、trans-cis 異性化反応の軸となる C7-C8 位間の二重結合の (伸縮) 振動に寄与を持つことが分かる。このことから、PYP の励起直後には C=C (二重結合) の振動が特に誘起されて結合が不安定化し、超高速異性化反応を引き起こす一因となっている可能性が示唆された。一方で、 ν_{36} モード (537 cm^{-1}) は raman 測定値 (539 cm^{-1}) に対して 2 cm^{-1} のシフトしか示しておらず、この振動成分は PYP の基底状態を反映したものであると考えられる。

表1 *p*-クマル酸の分子振動モードと各測定により得られた振動数

vibrational modes	Wave number / cm^{-1}	
	Transient Absorption	Raman
ν_{13}	1570	1557
ν_{25}	1159	1163
ν_{36}	537	539

(2) フラビン蛋白質の超高速電子移動ダイナミクス

フラビン蛋白質の超高速電子移動過程について検討するため、試料としてピロリ菌由来フラボドキシンを選択し、その光初期電子

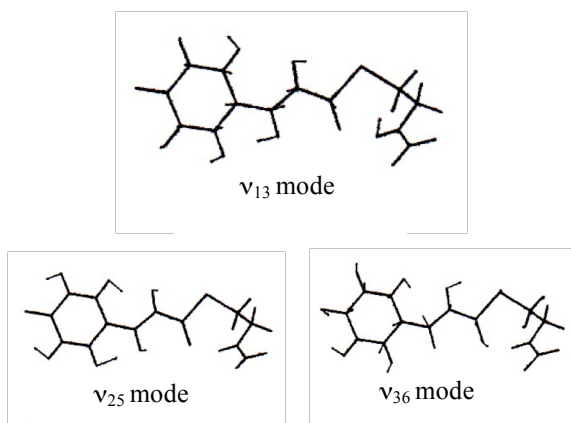


図7 観測された *p*-クマル酸の面内振動モード

移動過程について検討した。ピロリ菌 (*Helicobacter Pylori*) は、人の体内に寄生し胃炎等の要因となる細菌として知られ、体内にフラボドキシンを持つ。このフラボドキシンはピロリ菌の代謝に関わるピルビン酸塩の酸化電子を仲介する役割を担う。蛋白質内には補酵素フラビンモノヌクレオチド (Flavin mononucleotide (FMN)を含む。FMNの近傍には電子供与性の高い芳香族アミノ酸残基 (チロシン (Tyr)、トリプトファン (Trp)) が配置されており発色団分子イソアロキサジン (isalloxazine (ISO)) の光励起により、ISO とアミノ酸残基間の光誘起電子移動反応が優先して起こる可能性がある。実験には時間分解能 120fs の時間分解蛍光計測法 (蛍光アップコンバージョン法) を用いた。その結果、電子移動反応に起因する寿命 210fs の蛍光減衰が観測され、(図8) 反応は ISO 近傍の芳香族アミノ酸チロシン (Tyr92) との間で起こることが分かった。また蛋白質

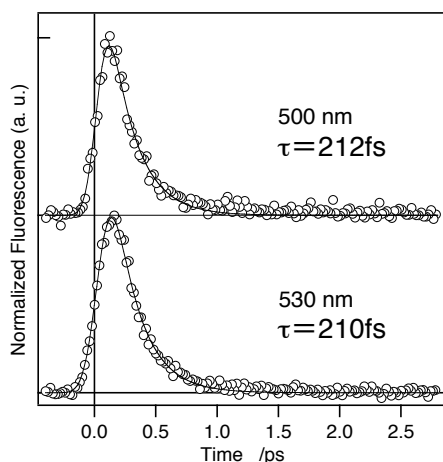


図8 ピロリ菌由来フラボドキシンの時間分解蛍光計測結果

構造を検討した結果、ISO-Tyr92 間の分子配向や、ISO および Tyr92 と水分子との相互作用により電子移動が加速されている可能性があることが分かった。一方、本試料および同様の電子移動反応を示す FMN 結合蛋白質を用いて過渡吸収計測を試みたが、蛋白質試料の濃度、高強度レーザーパルス照射による劣化の問題により有為な結果を得ることができなかった。今後、光耐性の高い蛋白質試料の探索、高濃度試料の調整法、マイクロポンプ、試料位置の移動等を含めた光照射光学系の更なる改良を行うことが必要である。

本研究において、時間幅 7.5fs の超短レーザーパルスを用いて光活性蛋白質 PYP の過渡吸収測定を行った。その結果、PYP の励起状態での振動成分の観測に初めて成功した。振動モード解析の結果、振動成分はそれぞれ分子平面に水平な面内 (in-plane) 振動 v_{13} モード、 v_{25} モード、 v_{36} モードとして同定できる。また、 v_{13} モードは、trans-cis 異性化反応の軸となる C=C 二重結合の (伸縮) 振動に寄与を持つことから、PYP の励起直後にはこの振動が特に誘起されて結合が不安定化し、超高速異性化を引き起こす一因となる可能性があることが分かった。光活性蛋白質内の光反応過程と分子振動との関連性について検討した研究は、世界的にみてもバクテリオロドプシン等極一部の試料でしか行われておらず、この成果は蛋白質内環境での高効率反応の鍵となる要因の一つを直接捉えたものとして、生物、化学分野に大きなインパクトを与えることができると考えられる。

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4件)

- ① H. Chosrowjan, S. Taniguchi, T. Wongnate, J. Sucharitakul, P. Chaiyen, F. Tanaka, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 査読有, Vol. 234, 2012, 44-48.
DOI:10.1016/j.jphotochem.2011.11.013.
- ② 谷口誠治、コスロービアン ハイク、フェムト秒時間分解蛍光顕微鏡による光活性蛋白質微結晶の蛍光ダイナミクス、レーザー研究、査読有、39巻、2011、931-937.
<http://www.lsj.or.jp/laser/>
- ③ K. Lugsanangarm, S. Pianwanit, F. Tanaka, H. Chosrowjan, S. Taniguchi, N. Mataga, Photoinduced ET in WT/Mutated

FD from *D. Vulgaris Strain Miyazaki*:
Energy Gap Law, Journal of
Photochemistry and Photobiology
A: Chemisrty, 査読有, Vol. 219, Issue 1,
2011, 32-41.

DOI:10.1016/j.jphotochem.2011.01.013

- ④ H. Chosrowjan, S. Taniguchi, N. Mataga,
T. Nakanishi, Y. Haruyama, S. Sato,
M. Kitamura, T. Tanaka, Effects of the
Disappearance of One Charge on
Ultrafast Fluorescence Dynamics of the
FMN Binding Protein J. Phys. Chem. B,
査読有, vol. 114, 2010, 6175-6182.
DOI: 10.1021/jp912137s

[学会発表] (計9件)

- ① 谷口誠治、コスロービアン ハイク、田中
文夫、荻野公美子、中西 猛、北村昌也、
ピロリ菌由来フラボドキシンの超高速光
誘起反応ダイナミクス、日本化学会第92
春季年会、2012年3月26日、慶応大学
② コスロービアン ハイク、谷口誠治、中島
信昭、K. Lugasanangarm, S. Pianvanit,
S. Kokpol, N. Nunthaboot、田中文夫、
中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ (MCAD)
の光誘起電子移動の観測と理論解析：正常
領域における電子移動過程、日本化学会第
92 春季年会、2012年3月26日、慶応大学
③ 谷口誠治、コスロービアン ハイク、小林
孝嘉、Jin Liu、今元 泰、sub-10fs ポン
ププローブ測定による光活性黄色タンパ
ク質 (PYP) の光初期異性化ダイナミクス、
2011年光化学討論会、2011年9月6日、
宮崎市河畔コンベンションエリア
④ コスロービアン ハイク、谷口誠治、田中
文夫、P. Chaiyen, T. Wongnate、セリン
ヒドロキシメチル転移酵素 (SHMT) の超高
速蛍光ダイナミクス、2011年光化学討論会、
2011年9月6日、宮崎市河畔コンベンショ
ンエリア
⑤ H. Chosrowjan, S. Taniguchi, Y. Imamoto,
Fluorescence dynamics and
Photoconductivity effect in PYP single
crystals, The Madrid Conference on
Femtochemistry (FEMTO10), 10-15th,
July, 2011, Spain
⑥ 谷口誠治、コスロービアン ハイク、又賀
昇、小林孝嘉、Jin Liu、今元 泰、
sub-10fs 過渡吸収測定による光活性黄色
タンパク質 (PYP) の光初期異性化ダイナ
ミクス、日本化学会第91 春季年会、2011
年3月28日、神奈川大学
⑦ コスロービアン ハイク、谷口誠治、又賀
昇、P. Chaiyen, 田中文夫、セリンヒドロ

キシメチル転移酵素 (SHMT) の超高速蛍光
ダイナミクス、日本化学会第91 春季年会、
2011年3月28日、神奈川大学

- ⑧ 谷口誠治、コスロービアン ハイク、又賀
昇、T. Phongsak, P. Chaiyen、田中文夫、
HPA (p-hydroxyphenyl-acetate) 水酸化酵
素の超高速蛍光ダイナミクス、2010年光
化学討論会、2010年9月8日、千葉大学
⑨ コスロービアン ハイク、谷口誠治、又賀
昇、T. Phongsak, P. Chaiyen、田中文夫、
ピラノース 2-オキシダーゼ (P20) とその
変異体の超高速蛍光ダイナミクス：グルコ
ースおよびアセテート存在下での光過程、
2010年光化学討論会、2010年9月8日、
千葉大学

[その他]

ホームページ等

谷口誠治、Sub-10fs レーザーパルスを用い
たタンパク質の超高速光反応の計測、
(財) レーザー技術総合研究所機関誌
レーザークロス No. 283、
<http://www.ilt.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 誠治 (TANIGUCHI SEIJI)
(財) レーザー技術総合研究所・
レーザーバイオ化学研究チーム・研究員
研究者番号：00342725