

共同利用研究ハイライト

減衰全反射遠紫外分光法と量子化学計算による凝縮層における有機化合物の電子状態の研究

尾崎 幸洋 関西学院大学理工学部化学科 教授

筆者らは約10年前から遠紫外 (FUV) 分光法の研究を始めた。最初は遠紫外といっても水の第一吸収帯の長波長側の裾を利用するというものであった。その後減衰全反射 (ATR) 法をFUV領域に適用することに成功し、140-200 nmの領域のATR-FUV分光法を確立することができた。この領域には様々な電子遷移によるバンドが観測されることが予測されるが、これまでFUV領域における液体、固体試料のスペクトル測定は、非常に強いバンドを観測できる装置がなかったため極めて限られていた。筆者らはATR-FUV分光法を用いてこれまでに水やアルコールといった分子の第一吸収帯の観測を行い、電子状態の変化に関する興味深い知見を得た。その後、比較的構造の単純な液体アルカンやケトンの炭素数や構造依存性によるスペクトル変化の研究を行い、FUV領域で観測される σ 電子の関与する様々な電子状態に関する知見を得

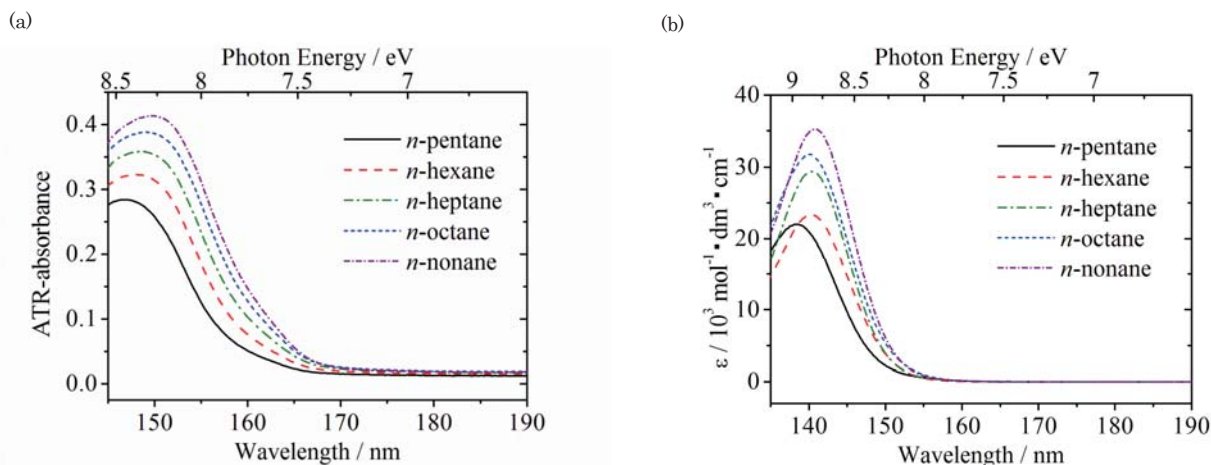
た。FUV領域に観測されるスペクトルがRydberg状態に強く寄与することや、分子構造、特に炭素の分岐によって特徴的な変化を示すことを明らかにした。

その後、FUV域に観測されるバンドの帰属や電子遷移の研究を深めるために量子化学計算を用いた研究を始めたが、量子化学計算による研究をさらに発展させるためにはやはり量子化学の専門家と共同研究することがぜひとも必要と考え、分子研の江原教授に共同研究を申し入れた。この共同研究には森澤勇介博士研究員(現近畿大学理工学部講師)が中心的な役割を果たし、現在も分子研-関学-近大という共同研究体制で研究を進めている。また多くの学生がこの共同研究に参画している。これまでに得られた共同研究の成果は以下の通りである。

図1に液体 n -アルカン (C_nH_{2n+2} ; $n=5-9$) の 8.55-6.53 eV (145-190 nm) の領域のATR-FUVスペクトルと

TD-CAM-B3LYPの結果を比較する。測定した全ての液体アルカンが8.3 eV付近にブロードな吸収を示し、それがアルキル鎖が長くなるとともに強度増大を伴いながら、低エネルギー(長波長)側にシフトしていることが分かる。理論の結果はこの傾向を再現していることが分かる。SAC-CI法で計算した n -ペンタンおよび n -ヘキサンの理論スペクトルから吸収は、HOMO-2 ~ HOMOからRydberg 3s, 3p状態への遷移が混合したバンドに帰属することができた。これらの遷移で重要な分子軌道を図2に示す。

分枝アルカン研究では8.3 eV付近のバンドは n -アルカンのそれに比較して低エネルギー側にシフトし、しかも7.7 eV付近のバンドの強度が強くなることが分かった。また分枝が増えるほど、8.3 eVのバンドは低エネルギー側にシフトしている。7.7 eVのバンドはRydberg 3sへの遷移に帰属したが、禁

図1 n -アルカン (C_nH_{2n+2} ; $n=5-9$) のATR-FUVスペクトルおよび理論の比較

制遷移である3s遷移がn-アルカンから分枝アルカンになるに従って対称性が低くなり、強度が強くなったと考えられる。

さらに、アルカンの液体から固体への相転移を追跡した低温温度変化実験では、液体で観測された153 nmの吸収が減少し、200, 230, 260 nmに3本の吸収が現れた。この実験結果を2分子の距離を変化させたアルカンクラスターの計算結果と比較すると、アルカンクラスターにおいても分子間距離が短くなると、実験で見られたような大きな長波長シフトが計算された。このシフトは、十分距離を置いたクラスターにおいてはHOMO-2であった準位が、アルカン距離の短縮によって、大きな高エネルギーシフトを起こした結果、遷移エネルギーが低エネルギーへシフトすることが原因であることが分かった。

また、炭素鎖を主体とする骨格だけでなく極性基が骨格となるものとしてアミド、ナイロンについても研究を行った。各種アミドと炭素鎖の異なる各種

ナイロンについて、ATR-FUVスペクトル測定を行った。また、計算としてはアミドと長鎖アルキル鎖を持つアミドの計算を行った。ナイロンのスペクトル測定において、炭素鎖の異なるアミド間で、 $\pi\pi^*$ 遷移とその短波長側に現れる遷移の比が異なることが解った。計算からその原因は、短波長に現れる遷移が炭素鎖に局在する電子状態によるものであり、 $\pi\pi^*$ 遷移がアミド基に局在する電子状態によるものであるからであることがわかった。

このように筆者らと江原教授らは共同研究により、ATR-FUV法と量子化学計算法を合わせ用いて液相における有機化合物のFUV域における電子遷移を研究する方法を確立した。今後この方法を用いてさらにさまざまな有機化合物の電子状態、電子遷移の研究を進めるとともに固体の有機化合物、高分子さらにはそれらの超薄膜の研究などにも発展させたいと考えている。



おさき・ゆきひろ

1978年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了、1978年9月カナダ国立研究所(NRC) 研究員(Research Associate)、1981年4月東京慈恵会医科大学 助手、1988年4月東京慈恵会医科大学 講師、1989年4月関西学院大学 助教授(理学部)、1993年4月関西学院大学 教授(理学部)、2001年4月学部改変により関西学院大学教授(理工学部)。
〔専門〕分子分光学(特に振動分光学と遠紫外分光学)
ozaki@kwansei.ac.jp
<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~ozaki/>

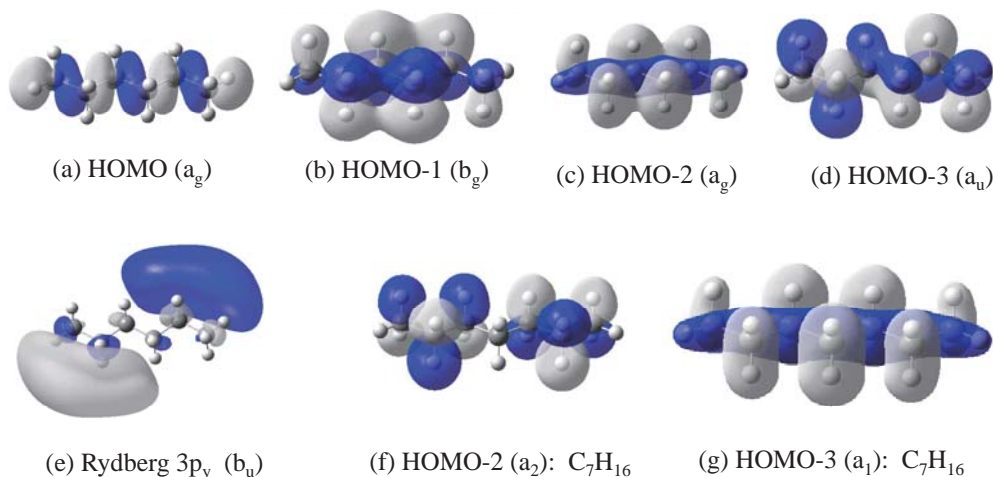


図2 アルカンの電子遷移に関連する重要な分子軌道

参考文献

- [1] Y. Morisawa, S. Tachibana, M. Ehara, Y. Ozaki, "Elucidating Electronic Transitions from σ Orbitals of Liquid n- and Branched Alkanes by Far-ultraviolet Spectroscopy and Quantum Chemical Calculations", *J. Phys. Chem. A* **116**, 11957-11964 (2012).

共同利用研究ハイライト

正方形の古細菌が持つ光受容タンパク質の 特徴的な構造変化

須藤 雄気 名古屋大学大学院理学研究科 准教授

1. はじめに

可視光は、生物にとって第一義的に重要なエネルギー源であり情報源である。生物は、その光を有効に利用するため、様々な可視光受容タンパク質分子を発達させてきた。ビタミンAのアルデヒド型であるレチナルを発色団とする7回膜貫通型光受容タンパク質は、総称してレチナルタンパク質と呼ばれる。10年ほど前までは、比較的限られた生物種のみが持つ稀なタンパク質であると考えられてきたが、現在では生物の三大ドメイン（古細菌、真正細菌、真核生物）に万を超える分子の存在が確認されている^[1]。

これらレチナルタンパク質の光反応は、約100フェムト秒で起こるレチナルのトランス \leftrightarrow シス異性化という“共通のイベント”により開始される。一方、最終的な生理機能は“多様”であり、イオン輸送体としてエネルギー産生に関わるだけでなく、光センサーとして情報伝達を司る^[2]。私達は、様々なテクニックを駆使して、微生物型レチナルタンパク質の単離・同定と機能発現機構の理解を目指した研究を行っており^[1,2]、最近では、分子科学に立脚した光操作ツール開発も行っている^[3]。本稿では、その過程で発見した新規分子・ミドルロドプシン（MR）の構造変化を、時間分解赤外分光法により明らかにした結果について述べる^[4]。

2. ミドルロドプシン（MR）

我々は、「多種多様なロドプシン分子がどのように生まれて（進化して）きたのか？」について興味を持っている。も

し、2つのレチナルタンパク質に進化的な関係があれば、変異導入により互いの機能変換が可能なのではないかと考え、機能が異なる2つの分子、バクテリオロドプシン（BR：光駆動プロトンポンプ）とセンサーロドプシンII（SRII：青色光センサー）に着目した。高感度pH電極による測定の結果、SRIIには弱いながらもBRと同様のプロトン輸送能が備わっていること、BRからSRII様センサーへの変換は、3つのアミノ酸の置換により実現できること^[6]がわかった。この研究により、両者の進化的関連性が示唆され、わずか3箇所のアミノ酸置換で機能変換が可能であることが明らかとなった。一方で、両者で変化した性質は実質的に機能のみであり、他の異なる性質（光反応、吸収極大波長など）は、変化しな

かった。そのため、機能以外の性質がどのように変化していったのかは不明であった。

そこで、次にBRとSRIIの分子系統樹で中間に位置する分子（ミドルロドプシン、MRと命名）に着目した（図1A）。この分子の遺伝子を正方形をした古細菌・*H. walsbyi*から単離し、大腸菌での組み換え体として発現させ、その性質を主に分光学的に検討した^[7]。その結果、MRの光反応はBR型、吸収波長（色）はSRII型であることがわかり（図1B）、BR \rightarrow SRIIへの分子進化の過程で、まず色が大きく変わり、その後センサー能を獲得するとともに光反応（特にその速度）が大きく変化したことを考察した^[7]。

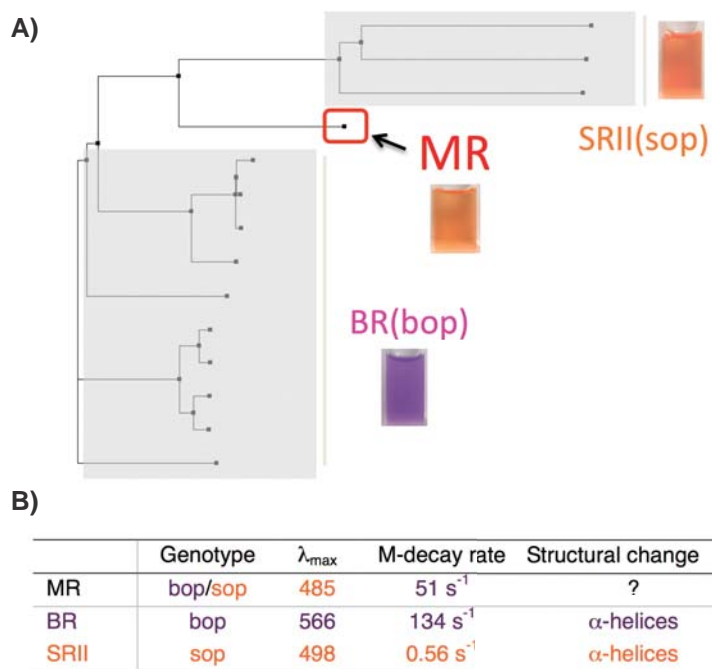


図1 A) BR, SRIIとMRの分子系統樹。B)分光学的性質の比較。

3. 時間分解赤外分光法による構造変化解析

生命・錯体分子科学研究領域・古谷祐詞准教授と我々は、これまでにBRとSRIIの光誘起差赤外スペクトルを取得することに成功しており、両者で特徴的な分子構造の変化をアミノ酸側鎖レベルで明らかにしてきた^[8-10]。本研究ではこれまで培ってきた手法をMRに適用し、構造変化はBR型なのか、あるいはSRII型なのかを検討した。BRにおいては、天然膜に高度に濃縮発現している特性から、時間分解分光解析が精力的に行われ、タンパク質内部の水

分子を含めた微細構造が明らかになっている。一方、他の微生物型ロドプシンでは赤外差スペクトルが微弱であること、試料調製の難しさなどから解析が進んでいない。我々は、MRの界面活性剤中での精製条件、及び脂質への再構成条件を詳細に検討するとともに、古谷グループの持つ高精度の赤外分光装置と計測法により、高いS/N比での測定に成功した(図2)。得られた振動モードの帰属は、タンパク質部分やレチナル発色団に¹³C安定同位体を導入し、そのスペクトルとの比較から慎重に行った。その結果、光励起後95 μ s

で、 β シートに(レチナルの変化と比較して)大きな構造変化が起こることを見出した(図2)。この変化は、BRやSRIIではどの時間領域でもみられないMRに特徴的なものであった。これまで構造が明らかになっているレチナルタンパク質の構造は、互によく似ており、共通して細胞外に β シートを持つ。そのため、レチナルと大きく離れたこの部位が、早い時間領域で大きく構造変化を起こすと推察した(図2)。

4. おわりに

このように、MRの構造変化は、当初、BRとSRIIのどちらかに類似したものとして予想していたが、そのいずれでもない特徴的なものであることが明らかとなった。MRは、既存のレチナルタンパク質の機能(イオン輸送能^[3]、光センサー能^[6]、転写調節能^[11])を示さないため、全く新しい生理機能を持つと考えられる。今回見出した変化は、その独特の機能と関係しているのかもしれない。最後に、本研究にご協力頂きました神戸薬科大学・和田昭盛博士、沖津貴志博士、大阪大学・水谷泰久博士、水野操博士に心から感謝いたします。

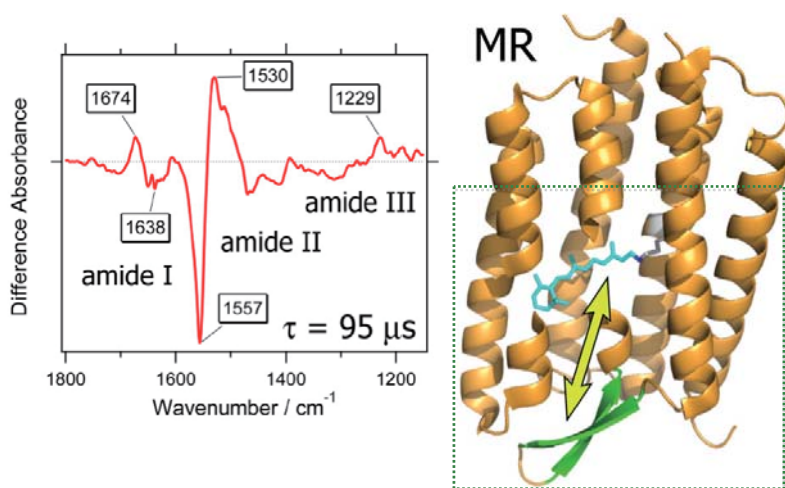


図2 MRに特徴的な β シートの構造変化。 β シートの振動数に対応するアミドI、アミドII、アミドIIIの変化が観測された(左)。この変化は、BRの結晶構造をもとに、細胞外側の β シートの構造変化によるものと推察した(右)。

参考文献

- [1] Y. Sudo, *CRC Handbook of Org. Photochem. Photobiol.* **2011**, pp1173.
- [2] Y. Sudo, M. Homma, *薬学雑誌*, **2012**, 132, 407.
- [3] Y. Sudo, A. Okazaki, H. Ono, J. Yagasaki, S. Sugo, M. Kamiya, L. Reissig, K. Inoue, K. Ihara, H. Kandori, S. Takagi, S. Hayashi, *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 20624.
- [4] Y. Furutani, T. Okitsu, L. Reissig, M. Mizuno, M. Homma, A. Wada, Y. Mizutani, Y. Sudo, *J. Phys. Chem. B*, **2013**, 117, 3449.
- [5] Y. Sudo, M. Iwamoto, K. Shimono, M. Sumi, N. Kamo, *Biophys. J.*, **2001** 80, 916-922.
- [6] Y. Sudo, J.L. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, 16129.
- [7] Y. Sudo, K. Ihara, S. Kobayashi, D. Suzuki, H. Irieda, T. Kikukawa, H. Kandori, M. Homma, *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 5967.
- [8] Y. Furutani, M. Shibata, H. Kandori, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, 4, 661.
- [9] Y. Sudo, Y. Furutani, A. Wada, M. Ito, N. Kamo, H. Kandori, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 16036.
- [10] Y. Sudo, Y. Furutani, J.L. Spudich, H. Kandori, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 15550.
- [11] H. Irieda, T. Morita, K. Maki, M. Homma, H. Aiba, Y. Sudo, *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287, 32485.



すどう・ゆうき

1977年神奈川県生まれ。2000年北海道大学薬学部卒業。2005年同博士課程修了(うち2年間は奈良先端大特別研究学生)。2005年名古屋工業大学・ポスドク、2005-2007年テキサス大学ヒューストン校・ポスドクを経て、2007年名古屋大学大学院理学研究科・助教。2009年より現職。2008-2012年JSTさきがけ研究員兼任。専門は生物物理学、光生物学。