フーリエ変換赤外差スペクトル法： 蛋白質の活性部位構造と分子メカニズム解析

野 口 巧

筑波大学大学院数理物質科学研究科 茨城県つくば市天王台 1-1-1 (〒305-8573)

(2008年9月17日受領, 2008年10月12日受理)

Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy:
Analyses of Active-site Structures and Molecular Mechanisms of Proteins

Takumi NOGUCHI

Institute of Materials Science, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

(Received September 17, 2008; Accepted October 12, 2008)

For full understanding of the molecular mechanisms of enzymatic reactions, it is crucial to obtain the detailed structural information of the active sites of proteins. Reaction-induced Fourier transform infrared (FTIR) difference spectroscopy, which detects minute changes in the infrared absorption upon some reaction, is a powerful method to investigate the structures and reactions in the active sites of proteins at the atomic and molecular levels. In particular, light-induced FTIR difference spectroscopy that uses light as a trigger to initiate reactions has been extensively used in the studies of molecular mechanisms of photosensitive proteins. In this review article, the methods of measurement and analysis of light-induced FTIR difference spectra are described and applications to the studies of photosensitive proteins are introduced.

Keywords: Fourier-transform infrared spectroscopy, Photosensitive proteins, Molecular mechanism, Vibrational spectroscopy, Structural biology

1. はじめに

1.1 「構造生物学」における振動分光学

生命体が持つ精緻で複雑なシステムを可能にしているものは、その構造体の構築、及び様々な酵素反応を担う、多くの蛋白質である。20種類のアミノ酸の一次元配列と有限の種類の有機・無機コファクターによって、無限とも言える多様な反応を可能にする、そのメカニズムを原子・分子レベルで明らかにし、そこに潜む共通原理と多様性を可能にする要因とを理解することこそが、生命科学が目指す究極の目的であると言っても過言ではあるまい。その生命原理がすべて明らかになったとき、人工的な新規機能蛋白質の設計が可能になり、新たな応用生命科学への道が開かれていく。

蛋白質の機能・反応機構を分子レベルで理解するためには、まず、その構造を知ることが必要不可欠である。この「構造から機能へ」のスローガンの下、いわゆる「構造生物学」が生命科学の重要な位置を占め、光合成蛋白質やチ

トクロム酸化酵素のような巨大な蛋白質複合体を含め、多くの蛋白質の三次元構造がX線結晶構造解析によって明らかにされてきた。それでは蛋白質の三次元構造が明らかにされた結果、蛋白質の反応機構は本当に解明されたであろうか？ 答えは否である。蛋白質の構造の美しさに感動し、ドメイン構造の共通性に納得し、色素配置の対称性に感嘆したものの、実際の酵素反応の分子機構を理解するために必要な活性部位の詳細構造を表すには、X線結晶解析の構造情報では全く不十分である。なぜなら、多くの蛋白質のX線構造では水素が検出されず、基本的にすべての酵素反応において最も重要な役割を果たす水素結合構造やアミノ酸のプロトン化構造が明らかとならない。また、蛋白質結晶中の静的な構造を表すのに適しているX線結晶解析は、生理的条件下における水溶液中の動的な構造変化、つまり実際の酵素反応の現場を捉えるには非常に不向きである。それでは、どのような手法を用いれば、X線結晶解析の欠点を補い、真に酵素反応を理解するのに必要な構造・反応情報が得られるであろうか。その答えとなる有

力な手法が振動分光法である。

赤外分光やラマン分光などの振動分光法は、分子の基準振動の振動数を検出し、化学結合や相互作用（主に水素結合）の存在や強度によって分子構造を表わす。これは、X線結晶解析が原子（電子密度）の位置によって分子構造を表すのに相対する手法である。後者が分解能（一般的には1-3 Å）以下の構造の違いに対して鈍感であるのに対し、基準振動の振動数は、分子の微小な構造変化（例えば典型的なC=O結合の場合、0.001 Åのオーダー）や相互作用変化を鋭敏に反映する。また、結合の解離や生成を直接的に表し、X線結晶解析による検出が困難であるプロトン化構造を、X-H(XはO, N, Sなど)伸縮振動や変角振動、またはそれらとカップルした振動モードなどで検出、追跡することにより、容易に判断することができる。このように、振動スペクトル変化は化学変化を直接的に反映しており、その解析から反応のプロセスを知り、分子機構を理解することができる。

蛋白質全体の三次元構造が視覚的に表示されるX線結晶解析が「構造生物学」の中核であることには間違いはない。しかし、そうした構造が比較的容易に得られるようになった今、三次元構造によるアミノ酸側鎖、及びコファクターの位置情報は、一次配列と同レベルの、メカニズム研究に必須な「基礎データ」となり、それらの情報を基に研究が進められるようになった。現在では、研究者はそれらの基礎データだけでは生体系における複雑な反応のメカニズムを理解することができないことも知っている。そして今、蛋白質構造の基礎データを知った上での構造・機能解析としての振動分光学の重要性、必要性が改めて認識され、注目されてきている¹⁾。

1.2 反応誘起フーリエ変換赤外差スペクトル法

振動分光法の中でも、ラマン分光法は、共鳴効果による強度増大（共鳴ラマン散乱）を利用して、蛋白質の活性部位における色素の振動スペクトルを選択的に得ることができることから、古くからヘム蛋白質など、色素コファクターを含む構造機能解析に多く利用されてきた。しかし、逆にその高い選択性ゆえに、色素中の特定の振動モードのみが観測され、活性部位を構成するアミノ酸側鎖や蛋白質コンフォメーションの情報など、反応の解析に必須な情報を得ることができないというジレンマがあった。

逆に、赤外スペクトルには、対象となる生体系に存在する基本的にすべての分子の振動モードが現れる。その結果、振動モードの数に勝る蛋白質アミド骨格のNH伸縮振動（アミドA： $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ ）、C=O伸縮振動（アミドI： $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ ）、及びNH変角+CN伸縮振動（アミドII： $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ ）によるバンドがスペクトルの主な強度を示し、アミノ酸側鎖やコファクターなど、他の置換基及び分子種のバンドは、ほとんどがその下に埋もれてしまう（図1a）。さらに、溶媒である水の吸収バンド（OH伸

縮振動： $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ 、HOH変角振動： $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ ）は大きな赤外強度を示し、蛋白質のバンドをマスクする。よって、かつての赤外分光法による蛋白質研究においては、重水置換した（アミドI領域から水の変角振動バンドを除く）蛋白質試料を用いて二次構造解析を行い、 α ヘリックスや β シート構造などの割合を評価する²⁾、といったものが主流であった。一方、活性部位における個々のアミノ酸側鎖や特定のコファクターの構造や反応に関しては、赤外スペクトルの中に情報が隠されているものの、それを取り出して解析することは極めて困難であった。

この様な状況は、20-30年程前に、従来の分散型赤外分光計がフーリエ変換型赤外（FTIR）分光計に取って代わったことにより一変した。FTIR分光計は、He-Neレーザーの波長を基準にして駆動鏡の位置を検出するため、インターフェログラムのフーリエ変換によって得られた赤外スペクトルの波数精度が極めて高いという特徴を持つ。よって、ある反応の前後で測定した2つのスペクトルの差スペクトルを計算することにより、強い吸収バンド下の極めて微小なスペクトル変化を検出することが可能になった（図1）。通常の測定条件下（数分間のデータ積算）において、 ΔA が 10^{-5} オーダーのシグナルを検出することができる程の感度を持つ。これは、アミド結合のバンドで考えると、10万残基より成る巨大な蛋白質複合体において、一つのアミノ酸残基の変化を検出する能力があることを示す。

このように、反応によって誘起される構造変化を差スペクトルの形で選択的に検出する手法を、反応誘起FTIR差スペクトル法と呼ぶ。この手法の重要な点は、反応に関与する構造部分に対する選択性と、赤外分光が持つ非選択性にある。生体中では赤外不活性な分子は存在しないと考えるため（酸素分子も金属に配位することにより対称性が崩れて赤外活性となる）、反応によって影響を受ける分子や置換基はすべてFTIR差スペクトル中に現れる。よって、コファクターのみならず、蛋白質骨格、各アミノ酸側鎖、基質、そして水分子など、系に含まれるあらゆる分子の構造変化を検出することができる。これは、後で述べるように解析を煩雑にする一要因ではあるものの、酵素反応で起こるすべての化学変化がスペクトル上に現れるという点において、共鳴ラマン法に対するFTIR差スペクトル法の優位点であるといえる。両者を併用することは、バンドの帰属、解析にとって有用である。

蛋白質において反応を誘起する方法として、光や電位変化などが一般的に用いられる。微小変化を測定する際には、試料そのものを入れ替えることは基本的にできないが、全反射吸収法（ATR法）を用いれば、試料を交換せずに緩衝液の交換や、基質の取り込みが可能であり、その際の差スペクトルを測定することができる。これらの中でも、光を反応トリガとして用いる光誘起FTIR差スペク

図1 蛋白質のFTIRスペクトルと光誘起FTIR差スペクトルの例

光化学系II膜標品(ペレット状態)の光照射前(a), 及び光照射後(b)のFTIRスペクトルとその光誘起FTIR差スペクトル(c, d). スペクトルdはスペクトルcを1000倍に拡大したもの. 差スペクトルには, 光化学系IIにおけるマンガンクラスターと第一キノン電子受容体 Q_A 間の電荷分離状態 $S_2Q_A^-$ の生成による構造変化が現れている. 測定温度は210 K.

トル法は光応答性蛋白質の反応機構研究に極めて有効であり, 早くからロドプシン³⁾や光合成蛋白質^{4,5)}に対して応用されてきた. 直接光に応答性を持たない蛋白質の場合にも, ケージド化合物による基質や金属イオンの光放出を利用すると, 結合部位の構造や反応を調べることができる. 本稿では, 光誘起FTIR差スペクトルの測定・解析法について簡単に述べ, その応用例について, 筆者らによって得られた結果を中心に解説する. 尚, 反応誘起FTIR差スペクトル法に関しては, これまでも多くの総説が出されているのでそれらを参照されたい⁶⁻⁸⁾.

2. 光誘起フーリエ変換赤外差スペクトル法の実際

2.1 測定法

図2に, 筆者らの研究室で使用している光誘起FTIR差スペクトル測定装置の概略を示す⁹⁾. 検出器には, 高感度での測定が可能なMCT検出器を用いる. 試料部は, 蛋白質の種類と目的に応じて様々な形態を取り得る. ここで

図2 光誘起FTIR差スペクトル測定装置の概略図

ここでは, Nd:YAGレーザーのパルス光を用いて水和蛋白質試料を励起し, FTIR差スペクトルを測定する場合を示している.

は, 蛋白質の水和試料を用いて10℃で測定する場合が記されている. 水和試料は, 密閉した赤外セル中に置いたグリセリン/水混合溶液によって, セル中の相対湿度をコントロールし, 軽く乾燥させた試料を適度に水和させることにより得る¹⁰⁾. グリセリンと水の割合を変えることにより, 試料の水和量を変化させることができる. このような水和試料を用いることにより, バルクの水の吸収バンドを抑え, そこに重なる蛋白質や蛋白質内水分子のバンドの測定が可能になる. また, 差スペクトル測定では試料の変動を極力抑えるのが望ましい. 水和試料は, 常温に近い生理的条件下で測定したいときに試料の安定性を向上させ, ベースラインの歪みを減らすのに適している. クライオスタットを用いて溶液試料を凍結することによっても, 同じ目的を達することができる. 低温測定は, 特定の反応中間状態を選択的に観測するためにも重要であり, また中間状態の寿命を長くし, それによって差スペクトルのS/Nの向上を図ることができる.

試料への光照射には, 目的に応じて, 定常光やパルスレーザー光を用いる. 試料室の光照射用の窓には電磁シャッターを設置する. 光照射及びシャッターの開閉は, FTIR分光計からのTTLトリガを用いてコントロールし, スペクトル測定と同期させる. 光応答性蛋白質の測定で特に注意が必要なのは, 干渉計から試料室に漏れ出るHe-Neレーザーの赤色光を, Ge基板の多層膜干渉フィルターなどでカットすることである. また, 尖頭値の高いパルス光を用いる際には, その反射光が検出器の素子を傷めることがあるので, 試料と検出器の間にもGeフィルターを置く.

ATR法と光誘起差スペクトル法の組み合わせも可能である. この場合, ATR結晶上に試料を吸着させ, 緩衝液を交換することにより, 同一試料を用いて様々な条件の測

定が可能になる¹¹⁾。ATR 結晶に Si や Ge など、可視光を透過しない材質のものをを用いれば、He-Ne レーザーからの可視光をカットするためのフィルターは不要である。

2.2 解析法

得られた FTIR スペクトルにおけるバンドの帰属法は、振動スペクトルに共通である。経験的なグループ振動¹²⁾により大まかな帰属は可能であるが、それを確認するためには、様々な安定同位体置換が必要となる。例えば、重水による解離性プロトンの D 置換、蛋白質全体の ¹⁵N, ¹³C, ³⁴S 置換¹³⁻¹⁶⁾、各アミノ酸の選択的同位体置換 (例えば, [4-¹³C]Tyr や [¹⁵N]His など)¹⁷⁻¹⁹⁾ などが一般に用いられる。部位特異的変異導入によるアミノ酸改変も有効な手段であるが²⁰⁾、変異による二次効果がスペクトル上に現れる可能性が高いので、スペクトルの解釈の際には十分に注意する必要がある。最近では、密度汎関数法などによる量子化学計算を、研究室のワークステーションなどを用いて手軽に行えるようになった。バンドの振動数から正しい構造情報を得るための解析基準を、様々な構造や相互作用状態を仮定したモデル化合物の振動計算と、入手可能な実測データから作成することができる²¹⁻²³⁾。また、同じ試料で共鳴ラマンスペクトルの測定が可能である場合には、その結果を FTIR スペクトルと比較することにより、色素と蛋白質のバンドをある程度区別することが可能である。

3. 光誘起 FTIR 差スペクトル法の応用

光誘起 FTIR 差スペクトル法の応用例として、筆者らの研究の中からいくつか取り上げる。ここで紹介するのは、光化学系 II 蛋白質における光合成酸素発生反応、シアノバクテリアが持つ青色光受容蛋白質 PixD、及びアミド合成酵素である光応答性ニトリルヒドラーゼの 3 つである。いずれも FTIR 差スペクトル法の特徴と有用性を示すのに適した系である。

3.1 光合成酸素発生酵素機構

植物やシアノバクテリアは、光合成過程において水を分解し、酸素を発生する。この光合成酸素発生は、地球大気の 21% を占める酸素の供給源であり、我々人間を含めた酸素呼吸生命の生存を支えている。しかしながら、この最も基本的な生命現象の一つである酸素発生反応の分子メカニズムは、未だほとんど解明されていない。触媒部位であるマンガングラスターの光誘起 FTIR 差スペクトルは 1992 年に筆者らが初めて報告し²⁴⁾、2001 年にはすべての光誘起中間状態遷移の FTIR 差スペクトルが測定された^{25,26)}。これまで、この FTIR 法を用いて配位子や水分子の構造・反応に関する様々な情報が得られてきた^{5,9,27-29)}。その中には、最近報告された 3.0-3.5 Å 分解能の X 線結晶構造^{30,31)} によって再確認されたものもあるが、逆に矛盾する点もあり、現在も筆者らを含めいくつか

のグループで詳細な解析が続けられている。また、蛋白質中の水分子の反応や水素結合相互作用の変化を、分子レベルで直接的に検出できることは、FTIR 差スペクトル法の利点の一つである。ロドプシンやバクテリオロドプシンなど、プロトン移動を起こす他の光応答性蛋白質においても、FTIR 法による水分子の研究が活発に行われている^{32,33)}。

3.1.1 光化学系 II における酸素発生反応

光合成は、太陽光エネルギーを用いて二酸化炭素を同化し、糖を合成するプロセスであり、地球上で行われる最大規模の生体エネルギー変換系である。植物やシアノバクテリアが営む酸素発生型光合成では、二酸化炭素を還元するための末端電子供与体として水分子を用いており、その酸化反応の副産物として酸素が放出される。光合成電子伝達系の酸化側末端に位置し、この酸素発生反応を担うのが光化学系 II である。光化学系 II は 30 種類もの蛋白質サブユニットと、クロロフィル、カロテノイド、プラストキノン、フェオフィチン、鉄、マンガンなど、様々な色素と金属イオンよりなる蛋白質複合体である³⁴⁾。反応中心における色素配置を図 3A に示す。クロロフィルの最低励起一重項状態から初発電荷分離が起こると、フェオフィチン (Pheo) とクロロフィル二量体 (P680) 間で電荷分離状態 (Pheo-P680⁺) が形成され、電子は、第一キノン電子受容体 Q_A、第二キノン電子受容体 Q_B へと順次渡される。一方、P680 上の正孔はチロシン残基 Y_Z (D1-Tyr161) を経由して、いわゆるマンガングラスターに渡され、そこで水の酸化反応が行われる。

マンガングラスターは 4 つのマンガンイオンと 1 つのカルシウムイオンよりなる金属クラスターであり、近傍のアミノ酸側鎖とともに、触媒部位としての酸素発生中心を構成する (図 3B)。現在までに得られている分解能 (3.0-3.5 Å) の X 線結晶構造^{30,31)} では、金属原子同士の位置関係や結合構造 (μ -オキソ架橋など) を正確に示すことはできていない。また、X 線照射による傷害により Mn の酸化数が変化し、本来の構造を保っていないとの報告もある^{35,36)}。基質水分子の位置も全く不明である。

酸素発生反応は S 状態と呼ばれる 5 つの中間状態 (S_i, i=0-4) の光駆動サイクル (S 状態サイクル) によって行われ、2 分子の水が 4 電子酸化され、一分子の酸素と 4 つのプロトンに分解される^{37,38)}。暗中で安定な S₁ 状態に閃光を連続的に照射すると、閃光ごとに S₂, S₃, S₄ へと順次遷移する。S₄ 状態は実体が未だ不明な過渡的状态であり、酸素を放出して S₀ 状態へと緩和する。4 閃光目で S₀ は S₁ へと遷移し、サイクルが完了する (図 3C)。この過程において基質である水分子がどこでサイクルに挿入されるのか、またプロトンがどのステップで放出されるのかなど、反応の基本的な事柄に関しても最終的な結論が得られていない。

図3 光化学系IIの電子伝達系と酸素発生中心

光化学系II反応中心の色素配置(A)と酸素発生マンガンクラスターの構造(B). 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の光化学系II蛋白質複合体のX線結晶構造 (PDB entry 2AXT)³¹⁾より作成. (C)酸素発生反応におけるS状態サイクル. S₁状態が暗中で最も安定であり, 4閃光で一周する.

3.1.2 S状態サイクルの閃光誘起FTIR差スペクトル

図3Aに示されるように光化学系IIには多く電子伝達成分が存在し, これらの反応は, それぞれの活性部位における蛋白質との相互作用によって制御されている. それらの分子機構を知るためには, 各活性部位における反応のFTIR差スペクトルを測定する必要がある. 現在では, 試料形態(膜標品, コア複合体, 反応中心複合体など)や, 特定のコファクターの欠失処理, 酸化還元電位, 電子伝達ドナー・アクセプターの添加, 温度など, 様々な条件を変えることにより, 光化学系IIにおける各コファクターの反応のみを表すFTIR差スペクトルを取り分ける手法が確立している⁵⁾.

図4Aに, 光化学系II蛋白質の水和試料にNd:YAGレーザーからの閃光(532 nm: ~7 ns)を照射することによって得た, S状態サイクルのFTIR差スペクトルを示す¹⁰⁾. フェリシアン化物イオンによって, キノン電子受容体から電子を蛋白質の外に引き抜くことにより, 酸素発生中心のみに由来するスペクトルを得ることができる. 1,

2, 3, 4閃光目のスペクトルは, 基本的に, それぞれS₁→S₂, S₂→S₃, S₃→S₀, S₀→S₁遷移の際の構造変化を表している. どのスペクトルにも, カルボキシル基の逆対称伸縮振動(1600–1500 cm⁻¹), 及び対称伸縮振動(1450–1350 cm⁻¹)の領域に複数の顕著なバンドが現れている. 特に, 後者の領域のバンドは¹⁵N置換で全く変化せず, ¹³C置換によってすべて低波数シフトを示したことから, これらは基本的にすべてカルボキシル基の振動であると帰属されている^{14,15)}. 1760–1700 cm⁻¹のCOOH基のC=O伸縮振動の領域²³⁾には顕著なバンドが観測されないことから, これらのバンドはカルボキシル基のプロトン化反応によって現れているのではなく, 脱プロトン化した状態で, 配位子として, または水素結合を通してマンガンクラスターと相互作用し, 反応に関与していると考えられる. また, アミドI領域(1700–1600 cm⁻¹)にも多数のバンドが観測され, 蛋白質の二次構造が酸素発生反応の過程で大きく変化することが分かる.

それぞれのバンドに対応して, 別の遷移において, ほぼ

図4 酸素発生中心の閃光誘起 FTIR 差スペクトル

A : 1800–1200 cm^{-1} 領域 ; B : 3800–2200 cm^{-1} 領域. 1(a), 2(b), 3(c), 4(d)閃光目のスペクトルは, それぞれ S 状態サイクルの $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$, $S_3 \rightarrow S_0$, $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移の際の構造変化を示す.

同じ振動数のバンドが逆の符号で現れており, マンガンクラスターの配位子及びその近傍の構造が S 状態サイクルの中で周期的変化をすることが明瞭に表されている. 酵素

反応において蛋白質は触媒としての役割を果たし, その構造変化は反応サイクルが一周することにより, 元の状態に戻る. 図 4A のスペクトルは, 酸素発生反応という酵素反応の際の蛋白質骨格や個々のアミノ酸側鎖の動きを, 中間状態ごとに原子・分子レベルで追跡できることを表している. つまり, このスペクトルを読み解くことにより, 酸素発生反応の反応プロセス全体を詳細に知ることができるはずである.

カルボキシル基の対称伸縮振動領域における対応するピークの数から, 5, 6 個のカルボキシル基がマンガンクラスターと相互作用していると考えられる. これは最近の X 線結晶構造^{30,31}で予想されたマンガンクラスターのカルボキシル配位子の数と一致する (図 3B). しかしながら, 配位子の候補に部位特異的変異を施しても FTIR スペクトルが変化しないと報告されているものが多く, FTIR スペクトルと X 線結晶解析の結果には明らかな矛盾点が見られる²⁰. カルボキシル基の各バンドの特定のアミノ酸側鎖への帰属が, 今後の大きな課題である.

Ca^{2+} イオンが酸素発生反応に必要であることは以前から知られており, これを除去することにより, S_2 以降の遷移が阻害される³⁷. X 線結晶解析のモデルにおいても, Ca 原子が Mn 原子の近傍に位置している^{30,31}. Ca^{2+} 除去によって, $S_1 \rightarrow S_2$ 遷移の FTIR 差スペクトルは大きく変化した^{39,40}. また, 酸素発生能が保たれる Ca^{2+} から Sr^{2+} への置換によって, 各 S 状態遷移のスペクトルにおける, いくつかのカルボキシル基の伸縮振動バンドが明らかなシフトを示した⁴¹. これらの結果は, Ca^{2+} が Mn イオンと強く相互作用しており, その除去や他の金属イオンへ置換により, マンガンクラスターの配位構造が変化することを示している.

ヒスチジンのイミダゾール基は 1100 cm^{-1} 付近に CN 伸縮振動のバンドを示し, プロトン化構造のマーカーとなる²¹. イミダゾール基の窒素を ^{15}N に同位体置換した試料の FTIR スペクトルから, S_2/S_1 差スペクトル中の 1114 cm^{-1} のピークはヒスチジン側鎖に由来することが示され, そのピーク位置と重水素置換の結果から, このヒスチジンは $\text{N}\pi\text{-H}$ (イミダゾール環中で側鎖に近い窒素が $\text{N}\pi$, 遠い窒素が $\text{N}\tau$) 構造を取り, $\text{N}\tau$ が Mn イオンと相互作用することが推測された¹⁷. また, 2900–2500 cm^{-1} には, ヒスチジンの NH 伸縮振動由来のフェルミ共鳴ピークが現れ, $\text{N}\pi\text{-H}$ は強い水素結合を形成していることがわかる. X 線結晶構造では, D1-H332 の $\text{N}\tau$ が Mn と配位できる距離に存在し (図 3B), また, その $\text{N}\pi$ は D1-Glu329 の骨格 C=O と水素結合可能な距離に位置している. これらは, FTIR の結果と一致する. 一方, D1-H337 もマンガンクラスターの近傍に存在しており, マンガンクラスターと何らかの相互作用している可能性が考えられる.

炭酸水素イオン (HCO_3^-) が酸素発生反応に関与していることを示唆する実験結果が、ここ10年程の間に次々と報告され、それがマンガングラスターの配位子の一つであるという説が提唱されていた⁴²⁾。実際、3.5 Å 分解能の結晶構造では、炭酸水素イオンを配位子としたマンガングラスターのモデルが報告された³⁰⁾。この真偽を確かめるために、筆者らは、 ^{12}C -炭酸水素イオンと ^{13}C -炭酸水素イオンを加えた光化学系II蛋白質を用いてS状態サイクルのFTIR スペクトルを測定した⁴³⁾。しかしながら、マンガングラスターに由来するバンドに同位体置換による変化は全く観測されず、炭酸水素イオンは酸素発生反応において何らかの役割を果たしているものの、マンガングラスターと構造的な相互作用をしていないことが示された。

3.1.3 水分子の反応の検出

水分解反応のメカニズムを解明するためには、基質水分子やそれを含む水素結合ネットワークの構造と反応を知る必要がある。図4Bに、S状態サイクルのFTIR スペクトルの高波数領域を示す⁴⁴⁾。ここには水素が関与する振動モードが現れる。3800–3000 cm^{-1} には水分子のOH伸縮振動が存在し、また3000–2200 cm^{-1} に観測される幅の広いバンドは水素結合ネットワークに由来する⁴⁵⁾。このバンドの存在は、極性プロトンを含む水素結合ネットワークの変化がマンガングラスターの周りで起こることを示している。弱い水素結合を形成する水分子は、OH伸縮振動領域の高波数側 (3700–3500 cm^{-1}) に比較的シャープなバンドを示すため、解析が容易である。一方、強い水素結合を形成することにより、バンド幅は大きく広がり、低波数シフトして3300 cm^{-1} 付近の蛋白質骨格のアミドA (NH伸縮) 領域と重なるため、解析はより困難となる。

弱い水素結合のOH領域において、一閃光目のスペクトル ($\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$) には3617/3588 cm^{-1} に微分形のバンドが現れ、2 ($\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$), 3 ($\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$), 4 ($\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$) 閃光目のスペクトルでは、それぞれ、3634, 3621, 3612 cm^{-1} に負のバンドが現れた (図4B)⁴⁴⁾。これらのバンドはすべて H_2^{18}O 置換により低波数シフトを示すことから、蛋白質由来のバンドではなく、水分子のOH伸縮振動に帰属された。一閃光での正負のバンドは、水分子の水素結合構造の変化を表している。 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1 溶液中で同様の測定を行い、水分子中の2つのOH振動をデカップルさせた際のシフト値から、そのカップリング強度を見積もった。その結果、この水分子は、強く水素結合をするOHと弱く水素結合をするOHよりなる非対称的な水素結合構造を持ち、 $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ 遷移によりその水素結合構造がさらに非対称化することが示された⁴⁶⁾。2, 3, 4閃光目の負のバンドは、 $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$, $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$, 及び $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ 遷移において、水分子からのプロトン解離、または弱い水素結合から強い水素結合への変換が起こることを示している。

水素結合によるバンド幅の広がりによって検出が困難に

なるOH伸縮振動に対し、1640 cm^{-1} 付近に現れる水の変角振動は、そのような著しいバンド幅の広がりを見せないため、バンドの同定が可能であれば、水分子の反応解析に非常に有益である。しかしながら、この領域には、強度が大きく、また試料や測定条件の僅かな違いに敏感であるアミドIバンドが多数存在しているため、蛋白質反応に関与する水分子のHOH変角振動の同定に関しては、これまで成功例が報告されていなかった。筆者らは、最近、重水置換した光化学系II蛋白質を用いて、水分解反応に関与する D_2O 分子のDOD変角振動バンドを検出した⁴⁷⁾。 D_2O 変角振動は1210 cm^{-1} 付近にバンドを示し、他の蛋白質のバンドとほとんど重ならないため、 D_2^{18}O 中でのスペクトルとの二重差スペクトルを計算することにより、DODバンドのみの抽出が可能である。S状態サイクルの際のDODバンドの変化を解析することにより、どの遷移においても、少なくとも2分子の水分子が、脱プロトン化していない構造で反応に関与していることが明らかとなった。また、基質水分子は、 $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ 及び $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ 遷移において、蛋白質中の分子内水クラスターから酸素発生中心に取り込まれることが示唆された。この結果は、これらの遷移が他の遷移に比べて水和量の減少に対して敏感であり、より顕著な効率の低下を示すという実験結果¹⁰⁾と一致している。

基質水分子からのプロトン放出が起こる遷移を同定する方法は、各S状態遷移のpH依存性を調べることである。この際、各S状態遷移に特有のFTIR差スペクトルの複雑なバンドパターンを、それらを表す「指紋」として利用することにより、pHを変化させた際の遷移効率を求めることができる。標準pH (pH 6.0) における4つの差スペクトルを標準スペクトルとし、様々なpHで得られた閃光誘起スペクトルを、これらの標準スペクトルの線形結合でフィッティングすることによって、各遷移の遷移効率を見積もった⁴⁸⁾。その結果、 $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ 遷移は広いpH範囲においてpH依存性を示さず、一方、 $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$, $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$, $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ 遷移ではどれも低pH領域での阻害が観測された (pKaはそれぞれ 3.6 ± 0.2 , 4.2 ± 0.3 , 4.7 ± 0.5)。この結果は、 $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ 遷移ではプロトン放出は起こらず、それ以外の3つの遷移において、基質からプロトンが放出されることを示している。

3.2 青色光受容蛋白質 PixD によるシグナル伝達

多くの生物は、光をエネルギーとしてではなく、シグナルとして用いることにより、生命活動に必要な様々な制御を行っている。青色光をシグナルとして利用するための光受容蛋白質には、色素としてフラビンを経結合したものも多く存在し、その光受容部のドメイン構造はPHR (photolyase homology region), LOV (light, oxygen, and voltage), 及びBLUF (blue light sensing using FAD) ドメインの3つに分類される。それらは、それぞれ異なっ

図5 青色光受容蛋白質 PixD のフラビン結合部位の構造
 A : *Thermosynechococcus elongatus* 由来の PixD の X 線結晶構造 (PDB entry 1X0P)⁵¹⁾ によるモデル.
 B : Tyr8 が水素結合供与体(a)及び受容体(b)として働く場合の水素結合ネットワークの構造.

たフラビンの初期光反応のメカニズムを持つことが知られている⁴⁹⁾.

シアノバクテリアが持つ青色光受容 BLUF 蛋白質である PixD (positive phototaxis factor D) は、走光性の制御に関わり、そのシグナル伝達カスケードの一端を担う⁵⁰⁾. PixD は、光を吸収すると、フラビンの電子吸収バンドが 10 nm ほど長波長シフトを示す中間状態 (明状態またはシグナル状態) に移行し、それに伴う蛋白質の構造変化がシグナルとして伝達される. 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の PixD の X 線結晶構造⁵¹⁾ によると (図 5A), フラビンの周辺にはグルタミンやアスパラギン, チロシンなどのアミノ酸残基が存在し、水素結合ネットワークを形成している. これらのアミノ酸残基のうち, Tyr8 や Gln50 に部位特異的変異を施すと, 正常な光反応が阻害されることから, これらのアミノ酸側鎖の水素結合相互作用が PixD の光反応とシグナル伝達機構に重要な役割を果たしていると考えられた^{51,52)}. 特に, 時間分解吸収の結果から, フラビンの最初の光反応は, Tyr8 からの電子移動とそれに共役したフラビン N₅ へのプロトン移動であることが示唆されている⁵³⁾. よって, Tyr8 から Gln50 を経由してフラビンに至る水素結合ネットワークの構造とその変化を明らかにすることが, PixD の光反応の分子機構を理解する上での鍵となる.

しかしながら, これまでに報告された X 線結晶構造⁵¹⁾ では水素原子は検出されておらず, また, Gln50 のアミド基の N と O の区別も実は明らかでない. そのため, Tyr8 が水素結合ドナーであるコンフォメーション (図 5Ba) と水素結合アクセプターであるコンフォメーション (図 5Bb) の区別はつかず, フラビンの光反応による水素結合構造の変化を解析することができない. 一方, このような水素結合構造の違いは分子振動に鋭敏に反映するため, FTIR 法を用いることにより, これらの区別を容易につけることができる. 以下に述べる, FTIR 差スペクトル法による PixD における Tyr 側鎖の水素結合構造の研究は, 本手法が蛋白質の活性部位におけるアミノ酸側鎖の水素結合構造決定に極めて有効であることを示す恰好の例である. また, システイン側鎖のチオール基 S-H は, 他の蛋白質のバンドと重複しない 2600–2520 cm⁻¹ の領域に伸縮振動バンドを示し, その反応を容易に調べることができる. 後に述べる研究例では, PixD のフラビン近傍にシステイン残基を導入し, 光照射によるフラビンとの反応を解析した.

3.2.1 チロシン側鎖の水素結合構造

PixD の光誘起 FTIR 差スペクトルを図 6Aa に示す. 負の強度を持つピークが反応前の暗状態を, 正のピークが光反応後の明状態を示す. このスペクトルで最も顕著なバンドは, フラビンの C₄=O 伸縮振動に帰属される 1713 cm⁻¹ のピークの 15 cm⁻¹ の低波数シフトである. これは BLUF ドメインを持つ蛋白質に共通の特徴であり, C₄=O 近傍の水素結合構造の再配置が, フラビン部位での光変換反応の主なメカニズムであることを示している⁵⁴⁾.

筆者らは, PixD の光反応における Tyr8 の相互作用変化を詳細に調べるため, まず, このスペクトル中に含まれる Tyr8 のバンド, 特に, 水酸基の水素結合構造に敏感である CO 伸縮振動 (ν CO), 及び COH 変角振動 (δ COH) バンドを抽出した⁵⁵⁾. そのため, 蛋白質中のチロシン残基を, 4 位の炭素を ¹³C でラベルしたチロシン ([4-¹³C] Tyr : 図 6A 挿入図) で置換した PixD 試料を作製した. [4-¹³C] Tyr 置換した PixD の FTIR スペクトル (図 6Ab) は, 予想通り, チロシンの ν CO/ δ COH (1300–1200 cm⁻¹) と ν CC (~1510 cm⁻¹) の領域のみに変化を示した. [4-¹³C] Tyr 置換 PixD と未置換 PixD の二重差スペクトル (図 6Ac) を計算すると, Tyr 以外のバンドはすべてキャンセルされ, 目的の振動モードのみを抽出することができた.

ν CO/ δ COH 領域のスペクトル (図 6B 実線) には暗状態及び明状態の ν CO と δ COH, 及びそれらの ¹³C シフトしたものの計 8 つのバンドが含まれている. さらに D₂O 中で同様な測定を行い (図 6B 点線), δ COH をこの領域から除去して ν CO のみを残すことによって, スペクトルをより単純化することができる. これらのスペクトルを Gaussian バンドでフィッティングし, それぞれのバンド

図6 PixDの光誘起FTIR差スペクトル

A: 非置換PixD (a)と $[4-^{13}\text{C}]$ Tyr置換PixD (b)の光誘起FTIR差スペクトル, 及びそれらの二重差スペクトル (c: $(a-b) \times 2$). B: 二重差スペクトルのCO伸縮/OH変角振動領域の拡大図. 実線: H_2O 中; 点線: D_2O 中. C: 野生型PixD (a)とI66C変異PixD (b)の光誘起FTIR差スペクトルのS-H伸縮振動領域.

の振動数を同定した (表1).

これらの $\nu\text{CO}/\delta\text{COH}$ 振動数からチロシンの水素結合構造を決定するため, 筆者らは, チロシン側鎖のモデル化合物である

-cresolのFTIR測定と, *p*-cresolの様々な水素結合複合体についての密度汎関数法計算により, チロシンの $\nu\text{CO}/\delta\text{COH}$ 振動数と各水素結合構造 (水素結合ドナー, アクセプター, ドナー・アクセプター) との相関を求めた²²⁾. その相関を解析基準として用い, PixDのTyr8の振動数を解釈すると, 暗状態, 及び明状態のいずれにおいても, Tyr8は水素結合ドナー構造 (図5Ba) を持ち, 暗状態から明状態への遷移に伴い, その水素結合強度が増加することが示された⁵⁵⁾.

BLUFドメインの光反応の機構として, Glnのアミド基

表1 PixDの光反応に関与するTyr8の暗状態及び明状態における νCO 及び δCOH 振動数 (cm^{-1})

	νCO		δCOH	
	^{12}C -Tyr	$[4-^{13}\text{C}]$ Tyr	^{12}C -Tyr	$[4-^{13}\text{C}]$ Tyr
in H_2O				
Dark state	1265	1242	1242	1232
Light state	1273	1252	1235	1226
in D_2O				
Dark state	1262	1239	—	—
Light state	1270	1247	—	—

が回転することにより, Tyrは水素結合アクセプター構造からドナー構造に変化し, アミド NH_2 がフラビンの $\text{C}_4=\text{O}$ と新たな水素結合を形成する (つまり, 図5Bにおける構造bから構造aへの変換), という説が提唱されていた⁵⁶⁾. しかし, PixDのFTIR解析の結果は, TyrのOHとGlnの $\text{C}=\text{O}$ との水素結合構造は保たれたまま, Glnの NH_2 基の水素結合がフラビンの N_5 から $\text{C}_4=\text{O}$ へと移行する, という光変換機構を意味している. フラビンからTyrへと伝達された水素結合ネットワークの変化が蛋白質の構造変化を引き起こし, 共役蛋白質であるPixEの脱離を誘発していると考えられる. このように, X線結晶構造では調べることのできない蛋白質活性部位におけるアミノ酸側鎖の水素結合構造やその強度変化を, FTIR差スペクトル法によって明らかにすることができる.

3.2.2 シス테인導入によるチオール基の光反応の検出

BLUFドメインの光反応がフラビン周辺の水素結合ネットワークの変化を誘発するのに対し, フォトリピンなどが持つLOVドメインでは, 光吸収によって, 近傍に存在するシス테인側鎖のチオール基がフラビンの C_{4a} 炭素と共有結合を形成することが知られている⁵⁷⁾. Iwataら⁵⁸⁾が測定したフォトリピンの光誘起FTIR差スペクトルには, 2570 cm^{-1} 付近に負のS-Hバンドが現れ, これが光反応によるフラビン-Cys結合の形成の確実な証拠となった.

筆者らは, PixDのフラビン結合部位において, LOVドメインのCys残基と同等な位置関係にあるIle66残基をCysに改変することにより, LOVと同様な光反応が起こるかどうかを, FTIR差スペクトル法を用いて調べた⁵⁹⁾. その結果, LOVと同様なSH基の負のバンドが 2554 cm^{-1} に現れた (図6C). 他のモードの倍音, 及び結合音の可能性を排除するため, D_2O 中での測定によって, SD伸縮振動が 1857 cm^{-1} に現れることを確かめた. $1800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ に現れるフラビンのバンドも, 本来のTePixDのものとは著しく異なっており, 逆にLOVのものと似通っていた. これらの結果から, BLUFドメインのアミノ酸残基を改変することにより, LOVドメインに特有な光

反応であるフラビン-Cys 結合の形成を再現できることが示された。このことは、フラビンを持つ青色光受容蛋白質の反応形式は、蛋白質のドメイン構造によって決まるのではなく、むしろ、フラビン近傍に存在し、反応の鍵となるアミノ酸側鎖の配置と相互作用によって決定されることを示している。この結果は、天然の蛋白質ドメインを利用して新規な機能を持つ蛋白質を創成するための蛋白質工学において、重要な知見を与えるものである。

3.3 ニトリルヒドラーゼ：一酸化窒素と光による反応制御機構

ニトリルヒドラーゼ (NHase) は、*Rhodococcus* などの細菌が持つ、ニトリルからアミドを合成する酵素である^{60,61}。本酵素はアクリルアミド化合物の合成に工業的に利用されており、その年間生産量は6000トンを越える⁶¹。反応はニトリルへの水分子の付加反応で表わされる。

NHase には活性中心に非ヘム鉄 (Fe^{3+}) 持つものと、 Fe^{3+} の代わりに Co^{3+} を持つものがあり、いずれも一次配列の相同性は高い。 Fe^{3+} 結合型 NHase は、暗中には不活性型であり、光照射によって活性型に変換する、という光活性化現象を示すことが知られていたが、そのメカニズムは全く不明であった。筆者らは X 線結晶構造の解明に先駆けて FTIR 差スペクトル法による解析を行い、光活性化反応の鍵となるコファクターとして一酸化窒素 (NO) の存在を明らかにした¹³。この研究は、振動分光法によるコファクターの同定によって、X 線結晶解析における電子密度の解釈が可能になった典型的な例といえる。

3.3.1 非ヘム鉄に結合する NO の発見と光活性化機構

図 7A に Fe^{3+} 結合型 NHase の光誘起 FTIR 差スペクトルを示す¹³。通常、蛋白質や有機化合物の FTIR スペクトルでは、 1800 cm^{-1} からシステインの S-H 伸縮が現れる $\sim 2550\text{ cm}^{-1}$ までの領域には基本音のバンドは現れない。しかし、NHase の FTIR スペクトルには、 1855 cm^{-1} に、倍音や結合音とは考えられない程、強度の大きな負のバンドが観測された。基質となるニトリル化合物のアナログであるシアン化物イオンの CN 伸縮振動 ($2200\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) とは振動数が大きく異なっており、NO や CO などの分子が Fe^{3+} の配位子として結合していることが示唆された。そこで、 ^{15}N で蛋白質全体をラベルした NHase について同様な測定を行ったところ、このピークは 35 cm^{-1} の低波数シフトを示した (図 7B)。このシフト値は、計算による NO の ^{15}N 置換による予想シフト値と一致していた。こうして、NHase の暗の中不活性型には一酸化窒素 NO が結合していることが明らかとなった¹³。さらに、単離した蛋白質では、一度光活性化した後には、再び

図7 NHase の光誘起 FTIR 差スペクトル

A: $2000\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ 領域. B: NO 伸縮振動領域. 実線: 非置換体; 点線: ^{15}N 置換体. C: SO 伸縮振動領域. 実線: 非置換体; 点線: ^{34}S 置換体.

不活性型に戻ることはできないが (細胞中では可能)、NO ガスを添加することにより不活性型に戻ることが示され、NO の光解離が光活性化のメカニズムであることが判明した (図 8A)^{62,63}。尚、 1869 cm^{-1} の小さな正のバンドは、光解離の際に一部の NO が蛋白質ポケットに残ってしまったものであり⁶²、また、 1847 cm^{-1} の肩は、熱平衡にある不活性型の別のコンフォメーションに由来すること⁶⁴がわかっている。

FTIR により NO の存在が明らかになった数年後に、NHase の X 線結晶解析の結果が報告された⁶⁵。予想通り、不活性状態において鉄原子の上部に 2 原子分子由来と考えられる電子密度が存在しており、NO が鉄に結合していることが確認された (図 8B)。NO が光解離することにより、基質が鉄中心に結合できる空間ができ、酵素活性が現れると考えられる。筆者らが NHase に結合する NO を発見した 1995 年頃はさながら NO ブームであり、NO が様々な生物種に存在し、血管拡張や神経伝達などのシグナルとして広く利用されていることが明らかになってきた時期であった。また、*in vitro* 系におけるヘム蛋白質の NO の光解離現象などはよく知られている。しかし、細胞内において NO の光解離によって実際に活性制御を行う蛋白質の存在は、未だ Fe^{3+} 結合型 NHase 以外には見つかっておらず、極めて特異な生体制御機構であると言える。

図8 NHaseの光活性化メカニズム(A)と不活性型NHaseの非ヘム鉄中心のX線結晶構造 (PDB entry 2AHJ)⁶⁵⁾(B)

光吸収によりNOが非ヘム鉄より解離し、活性型となる。細胞中ではNO合成酵素(NOS)によりNOが供給され、再び不活性型に戻る。単離蛋白質では、光活性化は不可逆であるが、NOの添加により不活性型に戻る。

NHaseの光活性化機構の解明は、FTIR法が蛋白質の反応機構研究に極めて有効であることを示している。

3.3.2 システイン修飾アミノ酸のプロトン化構造

NHaseが変わり種の蛋白質であることは、NOの結合に限らない。鉄中心の配位子として、システインの修飾アミノ酸であるシステインスルフィン酸(Cys-SO₂H)及びシステインスルフェン酸(Cys-SOH)が結合している。これらの修飾アミノ酸の存在は質量分析によって示唆され、結晶構造で確認された(図8B)⁶⁵⁾。ただ、これらの手法で明らかとならないのは、実際の活性部位においてこれらのアミノ酸がプロトン化しているのか、それとも脱プロトン化しているのかという点である。これらの修飾アミノ酸がアミド合成機構に直接的に関与していることが示唆されており、そのプロトン化構造を明らかにすることは、

メカニズム解明にとって不可欠である。プロトン化構造は振動スペクトルに鋭敏に反映するため、この問題をFTIRスペクトルの解析により解決することができる。

システインスルフィン酸(Cys-SOOH)及びシステインスルフェン酸のバンドを同定するため、³⁴SでラベルしたNHaseを調製し、そのFTIR差スペクトルを測定した(図7C)¹⁶⁾。³⁴S置換により、1150-1120 cm⁻¹と1040-1010 cm⁻¹に現れる強度の強いバンド、及び910 cm⁻¹付近の比較的弱いバンドが低波数シフトをすることが示された。D₂O中においてもバンドが保持されるという実験結果とモデル化合物の密度汎関数法計算とから、強い1140 cm⁻¹及び1030 cm⁻¹付近のバンドはそれぞれCys-SO₂⁻の逆対称伸縮と対称伸縮振動に、また、後者の910 cm⁻¹付近のバンドはCys-SO⁻のSO伸縮振動に帰属された。このように、FTIR法によって、これらのシステイン修飾アミノ酸が脱プロトン化した状態で存在していることが示された。

4. おわりに

上の応用例で述べたように、FTIR差スペクトルには蛋白質の構造・反応に関する様々な情報が含まれている。酵素反応の分子メカニズムを理解するためには、FTIR法を含めた振動分光法による解析が必須である。今後、X線結晶解析によって大まかな位置情報を取得した後、振動分光法により、より正確な化学結合・相互作用情報を獲得し、さらに酵素反応の現場を追跡する、といった研究手法が「構造生物学」における生命機構研究のオーソドックスな流れになると思われる。また、NHaseの例で見たように、蛋白質に含まれるコファクターの種類や反応中間体の構造を振動分光法であらかじめ調べておくことは、X線結晶解析の電子密度の正しい帰属に有効である。

一方、FTIR差スペクトル法が、より広く、一般的に利用されるようになるためには、いくつかの問題点を克服する必要があるように思う。まず第一に、如何に活性部位のFTIRスペクトルを得るかという問題である。FTIR差スペクトルを測定するためには、反応、基質の結合等により蛋白質に何らかの変化を誘起させる必要がある。様々な光応答性蛋白質がFTIR解析の対象となり、精密な解析がなされている理由はここにある。ATR法による緩衝液交換によって、光にも電位シフトにも応答しない蛋白質の反応を調べることができるが^{8,66)}、未だ応用例は多くはなく、さらなる方法論の確立とより多くの蛋白質への応用が望まれる。

第二に、得られたFTIRスペクトルから、構造・反応に関する正しい知見を導き出すための解析基準の問題である。振動スペクトルの解析は、スペクトルをプログラムにのせれば自動的に構造が出てくる、といった類のものではない。個々の振動モードには、それぞれの個性があり、他

のモードとのカップリングなどによって複雑な挙動を示す場合がある。同位体置換などを用いて正しくバンドを帰属し、その振動モードと分子構造・相互作用との相関をよく理解しなければ、正しい情報を得ることはできない。そのような解析基準の作成プロセスにとっての明るい材料は、近年の密度汎関数法などの量子化学計算の発展である。ある程度の大きさの分子ならば、水素結合を形成する複合体についても、かなり正確に基準振動モードの挙動を再現することができる^{22,23)}。今後、FTIR 差スペクトル法を含めた振動分光法が、構造生物学の中で X 線結晶解析と真に相補的な位置関係を占めるためには、量子化学計算を駆使した解析法をより体系化し、明確な解析基準を確立していく必要があるだろう。

参 考 文 献

- 1) 吉川信也: 生物物理 **45**, 63 (2005).
- 2) D. M. Byler and H. Susi: Biopolymers **25**, 469 (1986).
- 3) R. Vogel and F. Siebert: Biopolymers **72**, 133 (2003).
- 4) W. Mantele: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, eds. R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995) p. 627.
- 5) T. Noguchi and C. Berthomieu: *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*, eds. T. Wydrzynski and K. Satoh (Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005) p. 367.
- 6) W. Mantele: Trends Biochem. Sci. **18**, 197 (1993).
- 7) R. Vogel and F. Siebert: Curr. Opin. Chem. Biol. **4**, 518 (2000).
- 8) C. Zscherp and A. Barth: Biochemistry **40**, 1875 (2001).
- 9) T. Noguchi: Photosynth. Res. **91**, 59 (2007).
- 10) T. Noguchi and M. Sugiura: Biochemistry **41**, 2322 (2002).
- 11) T. Okubo and T. Noguchi: Spectrochim. Acta A **66**, 863 (2007).
- 12) G. Socrates: *Infrared characteristic group frequencies* (John Wiley & Sons, Chichester, 1994).
- 13) T. Noguchi, J. Honda, T. Nagamune, H. Sasabe, Y. Inoue, and I. Endo: FEBS Lett. **358**, 9 (1995).
- 14) T. Noguchi and M. Sugiura: Biochemistry **42**, 6035 (2003).
- 15) Y. Kimura, N. Mizusawa, A. Ishii, T. Yamanari, and T. Ono: Biochemistry **42**, 13170 (2003).
- 16) T. Noguchi, M. Nojiri, K. Takei, M. Odaka, and N. Kamiya: Biochemistry **42**, 11642 (2003).
- 17) T. Noguchi, Y. Inoue, and X.-S. Tang: Biochemistry **38**, 10187 (1999).
- 18) Y. Kimura, N. Mizusawa, A. Ishii, and T. Ono: Biochemistry **44**, 16072 (2005).
- 19) T. Noguchi, Y. Inoue, and X.-S. Tang: Biochemistry **36**, 14705 (1997).
- 20) R. J. Debus: Coord. Chem. Rev. **252**, 244 (2008).
- 21) K. Hasegawa, T. Ono, and T. Noguchi: J. Phys. Chem. B **104**, 4253 (2000).
- 22) R. Takahashi and T. Noguchi: J. Phys. Chem. B **111**, 13833 (2007).
- 23) K. Takei, R. Takahashi, and T. Noguchi: J. Phys. Chem. B **112**, 6725 (2008).
- 24) T. Noguchi, T. Ono, and Y. Inoue: Biochemistry **31**, 5953 (1992).
- 25) T. Noguchi and M. Sugiura: Biochemistry **40**, 1497 (2001).
- 26) W. Hillier and G. T. Babcock: Biochemistry **40**, 1503 (2001).
- 27) H.-A. Chu, W. Hillier, N. A. Law, and G. T. Babcock: Biochim. Biophys. Acta **1503**, 69 (2001).
- 28) T. Noguchi: Coord. Chem. Rev. **252**, 336 (2008).
- 29) T. Noguchi: Phil. Trans. R. Soc. B **363**, 1189 (2008).
- 30) K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, and S. Iwata: Science **19**, 1831 (2004).
- 31) B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, and J. Biesiadka: Nature **438**, 1040 (2005).
- 32) H. Kandori: Biochim. Biophys. Acta **1460**, 177 (2000).
- 33) 前田章夫, 神山 勉: 蛋白質・核酸・酵素 **52**, 1314 (2007).
- 34) *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*, eds. T. Wydrzynski and K. Satoh (Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005).
- 35) J. Yano, J. Kern, K. D. Irrgang, M. J. Latimer, U. Bergmann, P. Glatzel, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, K. Sauer, J. Messinger, A. Zouni, and V. K. Yachandra: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **102**, 12047 (2005).
- 36) M. Grabolle, M. Haumann, C. Muller, P. Liebisch, and H. Dau: J. Biol. Chem. **281**, 4580 (2006).
- 37) R. J. Debus: Biochim. Biophys. Acta **1102**, 269 (1992).
- 38) W. Hillier and J. Messinger: *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*, eds. T. Wydrzynski and K. Satoh (Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005) p. 567.
- 39) T. Noguchi, T. Ono, and Y. Inoue: Biochim. Biophys. Acta **1232**, 59 (1995).
- 40) Y. Taguchi and T. Noguchi: Biochim. Biophys. Acta **1767**, 535 (2007).
- 41) H. Suzuki, Y. Taguchi, M. Sugiura, A. Boussac, and T. Noguchi: Biochemistry **45**, 13454 (2006).
- 42) J. J. S. Van Rensen, and V. V. Klimov: *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*, eds. T. Wydrzynski and K. Satoh (Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005) p. 329.
- 43) C. Aoyama, H. Suzuki, M. Sugiura, and T. Noguchi: Biochemistry **47**, 2760 (2008).
- 44) T. Noguchi and M. Sugiura: Biochemistry **41**, 15706 (2002).
- 45) G. Zundel: J. Mol. Struct. **177**, 43 (1988).
- 46) T. Noguchi and M. Sugiura: Biochemistry **39**, 10943 (2000).
- 47) H. Suzuki, M. Sugiura, and T. Noguchi: Biochemistry **47**, 11024–11030 (2008).
- 48) H. Suzuki, M. Sugiura, and T. Noguchi: Biochemistry **44**, 1708 (2005).
- 49) M. A. Van der Horst and K. J. Hellingwerf: Acc. Chem. Res. **37**, 13 (2004).
- 50) K. Okajima, S. Yoshihara, Y. Fukushima, X. Geng, M. Katayama, S. Higashi, M. Watanabe, S. Sato, S. Tabata, Y. Shibata, S. Itoh, and M. Ikeuchi: J. Biochem. **137**, 741 (2005).
- 51) A. Kita, K. Okajima, Y. Morimoto, M. Ikeuchi, and K. Miki: J. Mol. Biol. **349**, 1 (2005).
- 52) K. Okajima, Y. Fukushima, H. Suzuki, A. Kita, Y. Ochiai, M. Katayama, Y. Shibata, K. Miki, T. Noguchi, S. Itoh, and M. Ikeuchi: J. Mol. Biol. **363**, 10 (2006).

- 53) M. Gauden, I. H. M. van Stokkum, J. M. Key, D. C. Luhrs, R. van Grondelle, P. Hegemann, and J. T. M. Kennis: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10895 (2006).
- 54) S. Masuda, K. Hasegawa, A. Ishii, and T. Ono: *Biochemistry* **43**, 5304 (2004).
- 55) R. Takahashi, K. Okajima, H. Suzuki, H. Nakamura, M. Ikeuchi, and T. Noguchi: *Biochemistry* **46**, 6459 (2007).
- 56) S. Anderson, V. Dragnea, S. Masuda, J. Ybe, K. Moffat, and C. Bauer: *Biochemistry* **44**, 7998 (2005).
- 57) D. Matsuoka, T. Iwata, K. Zikihara, H. Kandori, and S. Tokutomi: *Photochem. Photobiol.* **83**, 122 (2007).
- 58) T. Iwata, S. Tokutomi, and H. Kandori: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11840 (2002).
- 59) H. Suzuki, K. Okajima, M. Ikeuchi, and T. Noguchi: *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12884–12885 (2008).
- 60) M. Kobayashi and S. Shimizu: *Nature Biotechnol.* **16**, 733 (1998).
- 61) M. Kobayashi, T. Nagasawa, and H. Yamada: *Trends Biotechnol.* **10**, 402 (1992).
- 62) T. Noguchi, M. Hoshino, M. Tsujimura, M. Odaka, Y. Inoue, and I. Endo: *Biochemistry* **35**, 16777 (1996).
- 63) M. Odaka, K. Fujii, M. Hoshino, T. Noguchi, M. Tsujimura, S. Nagashima, M. Yohda, T. Nagamune, Y. Inoue, and I. Endo: *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3785 (1997).
- 64) H. Suzuki, M. Nojiri, N. Kamiya, and T. Noguchi: *J. Biochem.* **136**, 115 (2004).
- 65) S. Nagashima, M. Nakasako, N. Dohmae, M. Tsujimura, K. Tokio, M. Odaka, M. Yohda, N. Kamiya, and I. Endo: *Nature Struct. Biol.* **5**, 347 (1998).
- 66) P. R. Rich and M. Iwaki: *Mol. Biosys.* **3**, 398 (2007).

PROFILE

野口 巧

筑波大学大学院数理物質科学研究科 准教授 理学博士

〔略歴〕1991年東京大学大学院理学系研究科博士課程化学専攻修了，1991年理化学研究所研究員，2001年筑波大学助教授，2007年同准教授。〔専門〕生体系の分子分光学，光合成の生物物理学

http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~noguchi_lab/home.html