HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光誘起フーリエ変換赤外差スペクトル法
Author(s)	野口, 巧
Description	4章 分光測定 2. 分光測定法 e
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 483-489
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39182
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-067.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

2．分光測定法
e．光誘起フーリエ変換赤外差スペクトル法

野口　　巧[1)]

光誘起フーリエ変換赤外（FTIR）差スペクトル法を用いることにより，光合成蛋白質における電子伝達成分などのコファクター及びその結合部位の構造や反応を原子・分子レベルで調べることができる．本手法の原理，及び測定・解析法について解説する．

Fourier transform infrared difference spectroscopy

Takumi Noguchi

Light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy provides information on the structures and reactions of cofactors such as redox components in photosynthetic proteins at the atomic and molecular level. In this article, the principle of this spectroscopy and the methods of measurements and spectral analysis are explained.

2.e.1　はじめに

近年，光化学系Ⅰや光化学系Ⅱを含め，多くの光合成蛋白質の三次元構造がX線結晶解析により解明され，蛋白質中における色素やアミノ酸残基の構造や位置関係が明らかとなってきた．しかし，各コファクターの電子・プロトン移動反応や励起移動反応のメカニズムを分子レベルで理解するためには，活性部位における水素結合構造やプロトン化構造など，通常のX線結晶解析の分解能を越える，より詳細な構造情報が必要となる．また，実際の光合成反応を解析するためには，生理条件下における反応を直接観測することのできる分光学的手法が必要不可欠である．光誘起フーリエ変換赤外（FTIR）差スペクトル法は，こうした要求に答え，光合成蛋白質におけるコファクター及びその結合部位の構造・相互作用，及び反応を原子・分子レベルで調べることのできる手法である．

2.e.2　光誘起フーリエ変換赤外差スペクトル法：原理

赤外分光法やラマン分光法などの振動分光法は，分子の基準振動を検出することにより，化学結合や相互作用の存在及び強度としての分子構造情報を与える手法である[1,2)]．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といえる．後者が分解能（一般的には1-3Å）以下の構造の違いに鈍感であるのに対し，基準振動の振動数は，分子の極めて微小な構造変化や相互作用変化を鋭敏に反映する．また，振動分光法は，化学結合や水素結合の生成や切断，強度変化を直接的に表すため，反応プロセスの解析に適している．

赤外分光法では，一般的に，振動基底状態から第一振動励起状態への赤外線吸収による遷移を検出する．生体系への応用としては，蛋白質のポリペプチド骨格のアミドⅠバンド（C＝O伸縮振動：1700–1600 cm^{-1}）を用いた二次構造解析が広く行われてきた[3)]．一方，分散型赤外分光計からフーリエ変換赤外（FTIR）分光計への移行に伴い，蛋白質の全体構造だけではなく，蛋白質中の活性部位のより詳細な構造や反応の解析が可能になった．

FTIR法では，干渉計によって生じる干渉光を，駆動鏡の位置の関数（インターフェログラム）として測定し，それをフーリエ変換することにより，波数を横軸とした赤外光分布を計算する[4,5)]．従って，分散型分光計のように赤外光の波数スキャンは行わない．駆動鏡の位置はFTIR分光計に内蔵されたHe-Neレーザーの633 nmの発振線により正確に決められるため，得られた赤外スペクトルの波数精度は極めて高いという特徴がある．そのため，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から，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である．通常の測定条件下（数分間のデータ積算）において，ΔA で 10^{-5} オーダーのシグナルを検出することができ，光化学系Ⅱや光

1）筑波大学　大学院数理物質科学研究科　物性・分子工学専攻

化学系Ⅰのような分子量の大きな蛋白質複合体においても，各アミノ酸及びコファクター中の化学結合や相互作用の変化を調べることができる．このように，反応による蛋白質等の構造変化をFTIRを用いて検出し，その構造及び反応の情報を得る手法が反応誘起FTIR差スペクトル法である[6−8]．

反応を誘起するためのトリガとして光を用いた場合には，光誘起FTIR差スペクトル法と呼ばれ，光によって反応を進めることができる光合成試料では主にこの手法が用いられる[9−14]．また，電位を変化させることによって，電子伝達成分の酸化還元反応由来のFTIR差スペクトルを測定することも可能である[9,10]．本稿では，光合成分野においてより一般的な光誘起FTIR差スペクトルの測定法について述べる．電気化学反応誘起の場合でも，試料部以外の測定・解析法はほぼ同じである．

生体物質は基本的にすべて赤外活性であると考えてよい（酸素分子も金属に結合して対称性が崩れれば赤外活性となる）．よって，反応によってある分子または構造部分に何らかの変化が起これば，それらは必ずFTIR差スペクトルに現れる．つまり，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FTIRによって検出することができる．これは，励起光に共鳴する特定の色素の振動だけが検出される共鳴ラマン法と対照的である．コファクターの構造変化だけではなく，それに共役した蛋白質や水分子の反応を捉えることができるのはFTIR差スペクトル法の大きな長所である．

2.e.3　測定法

2.e.3.1　測定系

図1に，光誘起FTIR差スペクトルの測定システムの一例を示す．通常の中赤外領域（4000–600 cm^{-1}）の測定には，高感度MCT（HgCdTe）検出器を用いる．FTIR分光計に標準的に装着されているTGS（triglycine sulfate）検出器では，十分なS/N比のスペクトルは得られない．MCT検出器は，感度が高いものほど，低波数側の測定範囲が狭くなる．いわゆる狭帯域MCTでは～800 cm^{-1}までの測定が可能であり，中帯域で～600 cm^{-1}，広帯域では～420 cm^{-1}以上となる．600 cm^{-1}以下の低波数振動を測定したい場合には，Siボロメータを用いるのが一般的である[15]．

光合成試料のような光応答性試料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てくるHe-Neレーザーの赤色光を，光学フィルターで除去することである．4000–650 cm^{-1}の領域を透過するGe基板の多層膜干渉フィルターを用いれば，通常の赤外領域をカバーできる．様々な透過領域の赤外フィルターが市販されているので，目的に応じて選択する．フィルターは赤外ビームに沿って試料の前に置く．また，光照射に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ので，試料と検出器の間にもフィルターを置く必要がある．

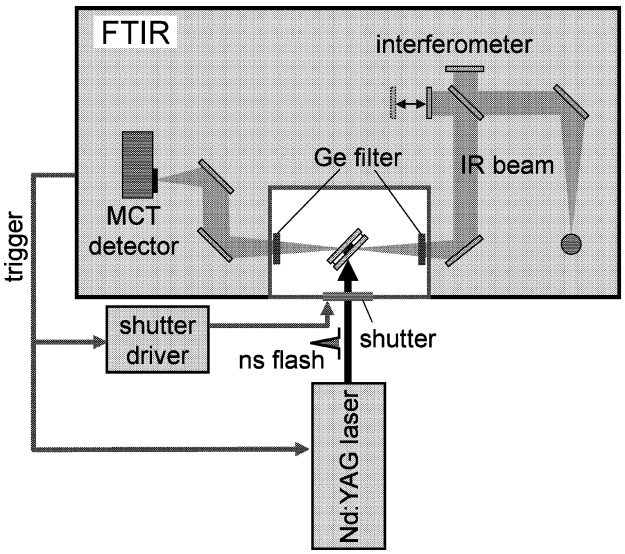

図1：光誘起FTIR差スペクトル測定システム．ここでは，Nd：YAGレーザーのパルス光を用いて水和試料を励起し，FTIR差スペクトルを測定する場合を示している．

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からの閃光を用いる．図1の例では，試料を赤外ビームに対して45°傾け，パルスレーザー光を直角方向から入射している．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．

2.e.3.2　試料部

試料を挟む赤外透過板には，通常，水に不溶・難溶性のCaF_2やBaF_2を用いる．BaF_2の方が低波数側の透過域が広いが（BaF_2：＞700 cm^{-1}；CaF_2：＞1100 cm^{-1}），わずかに水に溶けるので，長時間常温で水溶液試料に接するような使用法は避けた方がよい．より低波数の測定にはZnSe（＞450 cm^{-1}）やAgBr（＞300 cm^{-1}）などを使うことができる．

試料は，なるべく濃い状態で，これらの赤外透過板に挟む．水の赤外吸収バンド（OH伸縮振動：～3400 cm^{-1}；HOH変角振動：～1640 cm^{-1}）が蛋白質のバンドに重なるためである．1650 cm^{-1}付近のバンド（水の

HOH 変角振動＋蛋白質のアミドⅠ振動）の吸光度を１以下に抑えるようにする．膜試料の場合には，遠心によって得たペレットを細いガラス棒などで掻き取り，赤外透過板の上に載せて，もう一枚の窓板に挟んで押し込むとよい．押し込む力の程度で試料の厚さをコントロールできる．溶液試料の場合には，濃縮した試料を窓板上で窒素ガスなどを用いて軽く乾燥させ，他の窓板に１μL 程度の水を載せて挟む．

FTIR 差スペクトル測定用の試料作成において特に重要な点は，試料の変動を極力抑えることである．試料の変動はベースラインの歪みとなって現れ，正しいスペクトルを測定する妨げとなる．そこで，クライオスタットを用いて試料を凍結するのがよい．低温測定は，中間状態の寿命を延ばし，差スペクトルの S/N 比を向上させるのにも有効である．また，低温において電子伝達鎖の一部の反応が阻害されることから，特定の電子伝達成分のスペクトルを選択的に測定するための条件ともなる．

FTIR 差スペクトル測定に有効なもう一つの試料形態は，蛋白質あるいは膜標品の水和試料である（図２a）[16]．溶液試料を窓板上で適度な大きさに広げ，窒素ガスで軽く乾燥させる．この試料を，シリコーングリースを塗ったスペーサーともう一枚の窓板で密閉する．この密閉した赤外セル中には，試料に触れないようにグリセリン水溶液を数μL 入れておき，セル中の相対湿度をコントロールする．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．20–40%（V/V）グリセリン水溶液を用いれば，活性を保ったまま適度に水和した試料が得られる．このような水和試料を用いることにより，常温に近い温度において，試料の変動を抑えて測定を行うことが可能となる．冷水を循環させた銅製ホルダーなどに試料を取り付け，温度をコントロールする．この水和試料の最大の利点は，バルクの水の吸収バンドを最小限に抑えることによって，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ことである．例えば，この試料を用いて，光化学系Ⅱにおける水分解（酸素発生）系の基質水分子の反応を調べることができる[17,18]．

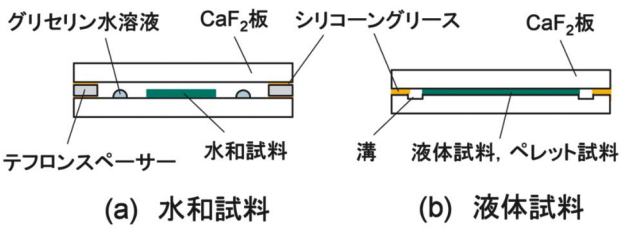

図２：FTIR 差スペクトル測定用試料セルの例．（a）水和試料；（b）液体またはペレット試料．

溶液試料またはペレット試料をそのまま，常温に近い温度で測定するためには，溝付き窓板を用いるとよい（図２b）[19,20]．溝の外側にシリコーングリースを塗り，内側に試料を置いて挟む．ホルダーで押さえつける力の加減によって，試料の厚さをある程度コントロールできるが，必要ならば，外側のグリース部にアルミホイルの小片を置いて試料の厚み（数μm）を確保する[21]．凍結試料や水和試料に比べてベースラインは変動しやすいので，スキャン時間を短くしたり，ベースラインの変動を暗中で別に測定しておいて光誘起差スペクトルから差し引くなどの工夫をする．

2.e.3.3　全反射吸収法の利用

上で述べた透過法に対し，全反射吸収法（ATR 法）を利用して測定することも可能である[22,23]．ATR 法は，ATR 結晶と試料の界面において赤外光が全反射する際の，試料側へのわずかな潜り込みを利用して赤外吸収を測定する手法である．ATR 結晶上に試料を吸着させることにより，緩衝液を自由に交換することができ，同一試料を用いて様々な条件下での測定が可能になる[23]．

塩や界面活性剤を極力除いた試料を ATR 結晶上で適度に乾燥させてそれに吸着させ，ホルダーを取りつけた後，緩衝液を流して安定させる．ATR 結晶に Si や Ge など，可視光を透過しないものを用いれば，He-Ne レーザー光を除去するための赤外フィルターは不要である．光照射によって光誘起差スペクトルを測定するだけではなく，酸化還元剤によって電位を変えた緩衝液を交換し，その際の酸化還元差スペクトルを測定することも可能である[22]．ATR 法は将来性のある有力な手法であるが，光合成試料への応用例は多くはなく，方法論の確立にはまだ時間が必要である．

2.e.3.4　差スペクトルの計算法

FTIR 差スペクトル法では光照射前後（または光照射前と光照射中）で赤外スペクトルを測定し，その差スペクトルを計算する．入射赤外光強度を I_0，光反応前後での透過赤外光強度をそれぞれ I_D，I_L とすると，光反応前後での吸光度 A_D，A_L の差 ΔA は，

$$\begin{aligned}\Delta A = A_L - A_D &= -\log(I_L/I_0) + \log(I_D/I_0) \\ &= -\log(I_L/I_D)\end{aligned} \qquad (1)$$

で表される．よって，実際には光照射の前後でシングルビームスペクトル（I_D，I_L）を測定し，それらを使って吸光度計算をすれば差スペクトルを計算したのと同じことになり，試料の赤外吸収スペクトルそのもの（A_D，A_L）を測定する必要はない．しかし，測定したい領域の吸収

が飽和していないかどうか，試料が均一な状態かどうか（不均一の場合，部分的に飽和するため，バンドがつぶれた形になる）などを確認するため，試料のない状態でレファレンススペクトル（I_0）を測定しておき，A_D のスペクトルを確認しておくべきである．

2.e.3.5 FTIR 差スペクトル測定における注意

FTIR 差スペクトル測定の際には，いくつか注意すべきことがある．紫外・可視分光では問題にならない事柄がほとんどであるので，同じ感覚で FTIR スペクトルを測定すると，誤ったスペクトルを測定してしまうことになる．また，ΔA で 10^{-4}－10^{-5} オーダーのバンドを観測するため，測定系と試料系を安定させ，慎重に測定を行う必要がある．FTIR 差スペクトルは，正しく測定すれば，極めて再現性が良く，別の測定系を用いても基本的に全く同じスペクトルが得られる．しかし，誤った測定法のために，〝artifact〞バンドを正しいものとして報告している例がかなりあるので注意が必要である．

まず，赤外スペクトルは温度変化に極めて敏感であるため，温度コントロールを精密に行う必要がある．クライオスタットで温度を設定した場合には，目的の温度で安定するまで根気よく待たねばならない．暗状態で差スペクトルを測定し，蛋白質の赤外吸収の変化が無くなるのを確認する．最も気を付ける必要があるのは，試料の光吸収による局所的な温度上昇によって現れる，いわゆる「熱バンド」である．水の温度上昇はコールドフィルターによって近赤外光を除くことで防ぐことができるが，クロロフィルなどのアンテナ色素の光吸収による温度上昇は，ある程度避けられない．なるべく強度を抑えた飽和光を用い，また，長波長側の吸収帯（クロロフィルの Qy 帯など）で励起するようにするなど，余分な熱を発生させない工夫が重要である．また，定常光励起の場合には，照射時間をなるべく短時間（典型的には 10 秒以下）に抑えるようにする．強光または長時間照射を行って，熱バンドの位置や形を把握して，実際の光照射条件によって，熱バンドが現れないかどうかを確認しておくことは有効である[24]．

FTIR 分光計では乾燥ガスのパージや真空引きなどによって水蒸気を除く工夫がなされているものの，その振動回転遷移による複数のピーク（4000–3400 及び 2000–1300 cm^{-1}）を完全に除くのは困難である．赤外光路中の水蒸気量の微妙な変化によって，水蒸気のピークが差スペクトルに重なる場合が多い．蛋白質やコファクターのバンドが現れない 2000–1800 cm^{-1} の領域にも鋭い複数のピークが現れるので，判別は容易である．目的とするバンドに対して水蒸気のピークが比較的小さい場合には，あらかじめ試料のない状態で測定しておいた水蒸気のスペクトルを差し引くことによって，それらを除くことができる．水蒸気のバンドが非常に大きい場合には，このような補正操作をしても，異なる条件下で測定した水蒸気のスペクトルの微小な違いによって，水蒸気のピークを完全にはキャンセルできない場合がある．そのような場合には，光誘起差スペクトル測定の直前に暗状態での差スペクトルを測定し，そこに現れる水蒸気のピークを用いて差し引く．二重差スペクトルを取ることによってスペクトルの S/N 比は下がるが，正しいスペクトルを得ることを優先しなければならない．

装置の安定性は，FTIR 差スペクトルを測定する上で重要な要素である．通常の FTIR 差スペクトル測定に要する数十秒から分オーダーでの分光計の安定性は，装置仕様上の S/N 比などでは表すことができない．安定性が悪い場合には，試料の大きな赤外バンド（例えば蛋白質のアミド I バンド）の領域に変化が生じ，ベースラインの歪みの原因となる．乾燥ガスの圧力変動や，電圧変化，室内温度の変化などを極力抑える必要がある．安定した試料に対し，暗状態で差スペクトルを測定することにより，測定系の安定性を確認しておく必要がある．

2.e.4 スペクトル解析法

得られた FTIR 差スペクトルには，構造変化を起こした複数の分子・置換基の赤外吸収が現れるので，バンドの帰属を慎重に行う必要がある．およその帰属は，経験的なグループ振動によって行うことができる[25]．しかし，複数の振動モードが現れる波数領域については，より正確な帰属を行うために，様々な安定同位体置換が必要となる．蛋白質全体の ^{15}N，^{13}C 置換[26]，や各アミノ酸側鎖の選択的同位体置換（例えば，[4-^{13}C]Tyr や [^{15}N]His など）[27,28]，同位体ラベルしたコファクターの再構成[29] などが一般に行われる．重水中での測定により，解離性プロトンを含む振動を同定することができる．また，$H_2{}^{18}O$ 及び $D_2{}^{18}O$ 置換は，水分子のバンドの帰属を与える[17,18]．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[30]．但し，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．

最近は，密度汎関数法などによる量子化学計算を，研究室のコンピュータを用いて手軽に行えるようになった．モデル化合物の量子化学計算による振動解析によって，各アミノ酸側鎖やコファクターの振動数と赤外強度を求め，バンドの帰属に役立てることができる[31–33]．

赤外スペクトルやラマンスペクトルのような振動スペクトルには，様々な構造や相互作用の情報が含まれる．しかし，振動モードにはそれぞれ個性があり，振動数や強度から構造情報を導くための解析基準は，対象とする置換基ごとに異なる．多くの置換基について，そのような解析基準が経験的に得られている．例えば，カルボキシル基(COO⁻)の配位構造(単座配位，架橋配位，キレート配位）に関しては，対称及び逆対称伸縮振動の振動数差との相関が知られている[34,35]．また，クロロフィル類のケト C=O 基の伸縮振動と水素結合構造や極性環境との関係も調べられている[36,37]．このような解析基準が確立されていない場合には，モデル化合物の実測と，様々な相互作用構造を仮定したモデル系の量子化学計算から，振動数や強度と構造との相関を求める[32,33]．

2.e.5 測定例

光化学系 I，II及び光合成細菌の反応中心における各反応性コファクターの FTIR 差スペクトルの測定に関しては，それぞれの試料系について既にほぼ確立した手法がある．総説[9−14,30,38]と引用されている原著論文を参照していただきたい．重要なことは，目的とするコファクターのみを反応させるような条件下で測定を行うことである．そのためには，試料形態(膜標品，光化学系 I，IIコア複合体，反応中心蛋白質など)，特定のコファクターの除去(マンガンクラスター除去，Q_A 除去など)，温度(低温における電子伝達反応の阻害)，緩衝液の酸化還元電位，励起光（定常光，閃光）などの条件を様々に変える必要がある．

反応中心における電荷分離反応により，必ず酸化側と還元側の変化が同時に起こる．単一のコファクターの反応によるスペクトルのみを測定したいときには，適当な電子受容体または電子供与体を添加し，電子または正孔を蛋白質の外に逃がすようにする．その際，フェリシアン化物イオンのような無機物を使うと，そのバンドが蛋白質のバンドを重ならず，都合がよい．酸化側，或いは還元側のどちらかが測定できれば，電荷分離による差スペクトルとの二重差スペクトル計算し，もう片方のスペクトルを求めることもできる．以下に，光化学系IIの第一電子受容体 Q_A と酸素発生系についての測定例を示す．

2.e.5.1 光化学系IIの第一電子受容体 Q_A[39,40]

ホウレンソウより調製した光化学系II膜標品を緩衝液（40 mM Mes-NaOH，400 mM sucrose，20 mM NaCl；pH 6.5）に懸濁し（0.5 mg Chl/ml），NH_2OH（最終濃度 10 mM）及びジクロロフェニルジメチル尿素（DCMU）（最終濃度 0.1 mM）を加える．NH_2OH 処理によりマンガンクラスターは除去され，また同時に，NH_2OH は測定の際の外来電子供与体としても働く．DCMU によって Q_A から Q_B への電子伝達は阻害される．マンガンクラスター除去にはトリス処理（0.8 M Tris-HCl，pH 8.5)を行ってもよい．また，Q_A^- アニオンの再酸化を速めて繰り返し測定を行うために，phenazine methosulfate（PMS）などの酸化還元メディエータを加えることもあるが[41]，PMS の変化がキノンのスペクトルに重なることがあるので注意が必要である．

この試料を 150,000 G で 30 分遠心し，膜標品のペレットを得る．ペレットをガラス棒ですくって CaF_2 窓板(直径 13 mm）上へ置き，別の CaF_2 板で挟んで押し込む．試料が窓板全体に均一に広がるように押し込むのが，ベースラインの変動が少ないきれいなスペクトルを測定するこつである．試料をクライオスタット（Oxford DN1704）へ挿入し，250 K に設定する．暗状態で差スペクトル測定を行い，試料の温度が一定となりベースラインが安定するのを待つ．赤色光(～30 mW/cm²)で 10 秒間試料を照射し，その前後でそれぞれシングルビームスペクトル（150 s スキャン）を測定し，差スペクトルを計算する．

得られたスペクトルを図 3 に示す．負のバンドは中性 Q_A，正のバンドは Q_A^- アニオン状態のときのプラストキノン及び蛋白質のバンドであり，この反応によって変化した構造部分が現れている．最も顕著なバンドは 1479

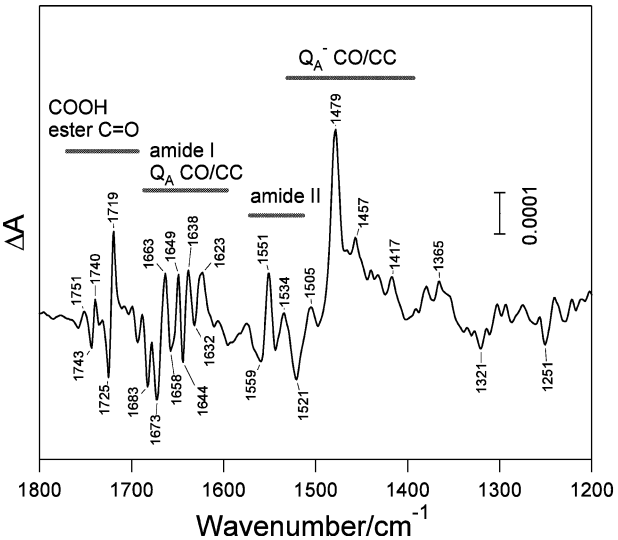

図 3：光化学系IIにおける第一キノン電子受容体 Q_A の一電子還元による光誘起 FTIR 差スペクトル．試料はホウレンソウより調製した光化学系II膜標品．電子供与体として NH_2OH，電子伝達阻害剤として DCMU を含む．温度は 250 K．

cm^{-1} のセミキノンアニオンの CO 伸縮振動と CC 伸縮振動がカップルしたバンドである．このバンドの振動数は 2 つの CO 基の水素結合強度やその対称性によって変化するため，水素結合構造を調べる指標となる．例えば，シアン処理により鉄中心に CN^- が結合すると，水素結合状態が変わり，4 cm^{-1} の低波数シフトを示す[39]．また，Q_B 部位に様々な除草剤を結合させると，フェノール系除草剤が結合したときのみ，このピークは小さな（〜1 cm^{-1}）低波数シフトを示す．この水素結合構造の変化と Q_A の酸化還元電位とは相関が見られ，Q_B 部位に結合した除草剤が Q_A の相互作用に影響を及ぼしていることがわかる[40]．

2.e.5.2　酸素発生系の S 状態サイクル[16,17]

パルスレーザーを用いて酸素発生反応における S 状態サイクルを 1 ステップずつ動かすことにより，各 S 状態遷移の際の FTIR 差スペクトルを測定することができる．

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の光化学系 II コア蛋白質を緩衝液（10 mM MES-MaOH，5 mM NaCl，5 mM $CaCl_2$，0.06% *n*-dodecyl β-D-maltoside）に懸濁し（4.5 mg Chl/ml），4 μL を取って 100 mM フェリシアン化カリウム水溶液 1 μL と混合する．それを CaF_2 板（直径 25 mm）上で楕円状（6×9 mm）に引き伸ばし，窒素ガスを用いて軽く乾燥させる．20%（V/V）グリセリン水溶液 2 μL を試料に触れないように周りに置き，シリコーングリースを塗ったテフロンスペーサ（厚さ 0.5 mm）と別の CaF_2 板で密閉する（図 2 a）．試料は銅製ホルダーで押さえ，冷水を流して 10°C に保つ．試料を 1 時間程その状態で放置し，試料が十分に水和し，安定するまで待つ．FTIR スペクトルを測定することによって水和の過程を追うことができる．

Q スイッチ Nd: YAG レーザーからの 532 nm のナノ秒パルス光（〜7 ns：〜10 mJ $pulse^{-1}cm^{-2}$）を用いて試料に光照射を行う．まず，酸素発生系を S_1 状態に揃えるため，2 発の閃光（1 Hz）を照射し，1 時間暗順応させる．その後，10 秒間隔で 4 発の閃光を照射し，その閃光照射の前，閃光間，閃光後の FTIR スペクトルを測定する．サンプルを 1 時間暗順応させ，このサイクルを繰り返すことによってスペクトルの S/N 比を向上させる．

このようにして得られた各閃光照射における FTIR 差スペクトルを図 4 に示す．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，基本的に酸素発生系のみに由来するスペクトルが得られている．1，2，3，4 閃光目のスペクトルは，それぞれ $S_1 \rightarrow S_2$，$S_2 \rightarrow S_3$，$S_3 \rightarrow S_0$，$S_0 \rightarrow S_1$ 遷移

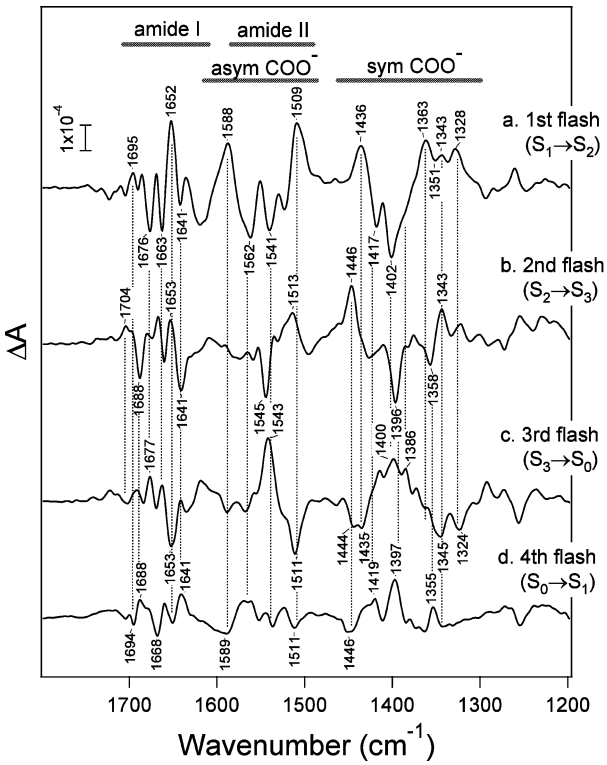

図 4：光化学系 II における酸素発生 S 状態サイクルの閃光誘起 FTIR 差スペクトル．1 (a)，2 (b)，3 (c)，4 (d) 閃光目のスペクトルは，それぞれ S 状態サイクルの $S_1 \rightarrow S_2$，$S_2 \rightarrow S_3$，$S_3 \rightarrow S_0$，$S_0 \rightarrow S_1$ 遷移の際の構造変化を示す．試料は好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* より調製した光化学系 II コア蛋白質複合体の水和試料．電子受容体としてフェリシアン化物イオンを含む．温度は 10°C．

の際の構造変化を表している．実際には 12%程のいわゆるミスファクターがあるので，後のスペクトルほど，他の遷移の混入が増えてくる．しかし，ミスファクターを考慮して補正をしてもスペクトルの形自体は大きくは変化しないので定性的な議論をするには問題がない．

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 ^{15}N 置換で全く変化せず，^{13}C 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[26]．1760–1700 cm^{-1} の COOH 基の C=O 伸縮振動の領域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．図4のスペクトルは，酸素発生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．

参考文献

1）水島三一郎，島内武彦，「赤外線吸収とラマン効果」，共立出版，1958．
2）中川一朗，「振動分光学」，学会出版センター，1987．
3）D. M. Byler & H. Susi, *Biopolymers* **25** (1986) p.469.
4）田隅三生　編著，「FT-IRの基礎と実際」，第2版，東京化学同人，1994．
5）平石次郎，「フーリエ変換赤外分光法 ── 化学者のためのFT-IR」，学会出版センター，1985．
6）W. Mäntele, *Trends Biochem. Sci*. **18** (1993) p.197.
7）R. Vogel & F. Siebert, *Curr. Opin. Chem. Biol*. **4** (2000) p.518.
8）C. Zscherp & A. Barth, *Biochemistry* **40** (2001) p.1875.
9）W. Mäntele, Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, eds. R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, p.627.
10）W. Mäntele, Biophysical Techniques in Photosynthesis, eds. J. Amesz & A. J. Hoff, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1996, p.137.
11）J. Breton & E. Nabedryk, *Biochim. Biophys. Acta* **1275** (1996) p.84.
12）J. Breton, *Biochim. Biophys. Acta* **1507** (2001) p.180.
13）T. Noguchi & C. Berthomieu, Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase, eds. T. Wydrzynski & K. Satoh, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005, p.367.
14）T. Noguchi, *Photosynth. Res*. **91** (2007) p.59.
15）H.-A. Chu, M. T. Gardner, W. Hillier & G. T. Babcock, *Photosynth. Res*. **66** (2000) p.57.
16）T. Noguchi & M. Sugiura, *Biochemistry* **41** (2002) p. 2322.
17）T. Noguchi & M. Sugiura, *Biochemistry* **41** (2002) p. 15706.
18）H. Suzuki, M. Sugiura & T. Noguchi, *Biochemistry* **47** (2008) p.11024.
19）R. Hienerwadel, D. Thibodeau, F. Lenz, E. Nabedryk, J. Breton, W. Kreutz & W. Mäntele, *Biochemistry* **31** (1992) p.5799.
20）T. Noguchi & M. Sugiura, *Biochemistry* **40** (2001) p. 1497.
21）H. Suzuki, Y. Taguchi, M. Sugiura, A. Boussac & T. Noguchi, *Biochemistry* **45** (2006) p.13454.
22）M. Iwaki, S. Andrianambinintsoa, P. Rich & J. Breton, *Spectrochim. Acta A* **58** (2002) p.1523.
23）T. Okubo & T. Noguchi, *Spectrochim. Acta A* **66** (2007) p.863.
24）K. Onoda, H. Mino, Y. Inoue & T. Noguchi, *Photosynthesis Research* **63** (2000) p.47.
25）G. Socrates, Infrared characteristic group frequencies, John Wiley & Sons, Chichester, 1994.
26）T. Noguchi & M. Sugiura, *Biochemistry* **42** (2003) p. 6035.
27）T. Noguchi, Y. Inoue & X.-S. Tang, *Biochemistry* **38** (1999) p.10187.
28）T. Noguchi, Y. Inoue & X.-S. Tang, *Biochemistry* **36** (1997) p.14705.
29）J. Breton, J.-R. Burie, C. Berthomieu, G. Berger & E. Nabedryk, *Biochemistry* **33** (1994) p.4953.
30）R. J. Debus, *Coord. Chem. Rev*. **252** (2008) p.244.
31）K. Hasegawa, T. Ono & T. Noguchi, *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) p.4253.
32）R. Takahashi & T. Noguchi, *J. Phys. Chem. B* **111** (2007) p.13833.
33）K. Takei, R. Takahashi & T. Noguchi, *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) p.6725.
34）G. B. Deacon & R. J. Phillips, *Coord. Chem. Rev*. **33** (1980) p.227.
35）K. Nakamoto, Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds (5th Ed.), part B, John Wiley & Sons, New York, 1997, p.59.
36）S. Krawczyk, *Biochim. Biophys. Acta* **976** (1989) p.140.
37）Y. Koyama, Y. Umemoto & A. Akamatsu, *J. Mol. Struct*. **146** (1986) p.273.
38）T. Noguchi, *Coord. Chem. Rev*. **252** (2008) p.336.
39）T. Noguchi, J. Kurreck, Y. Inoue & G. Renger, *Biochemistry* **38** (1999) p.4846.
40）A. Takano, R. Takahashi, H. Suzuki & T. Noguchi, *Photosynth. Res*. in press.
41）C. Berthomieu, E. Nabedryk, W. Mäntele & J. Breton, *FEBS Lett*. **269** (1990) p.363.