

業績紹介：タンパク質中エネルギー散逸の直接観測：チトクロム c を用いた研究

水野操 (阪大院理・計画研究分担者)

水谷泰久 (阪大院理・計画研究代表者)

論文題目: "Direct observation of vibrational energy flow in cytochrome c"

著者: Naoki Fujii, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani

雑誌巻号: *J. Phys. Chem. B* **115**, 13057-13064 (2011)

振動エネルギー緩和は、凝縮相の化学反応を理解するうえで非常に重要である。タンパク質についても、ヘムタンパク質を中心として、振動エネルギー緩和がよく研究されている。ヘムタンパク質は、補欠分子族として、鉄ポルフィリン錯体の一種であるヘムを含むタンパク質である。ヘムを光励起すると、サブピコ秒の内部転換を経て、多くのエネルギーが振動エネルギーとしてヘムに残される。このエネルギーは、ヘムから周囲のタンパク質部分を通り、溶媒へと散逸していく。これまでに、ヘム振動冷却過程[1]および、溶媒の温度上昇[2]は観測例があるが、タンパク質内のエネルギー移動を直接観測した例はない。これは、タンパク質内のエネルギー散逸過程を直接観測する手法がなかったためである。今回、我々は時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマン (UVRR) 分光法を用いて、エネルギー散逸機構を直接観測することを試みた。UVRR スペクトルでは、共鳴効果によって、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンなど芳香族アミノ酸残基のラマンバンドが選択的に観測される。一方、アンチストークスラマンバンド強度は、振動励起状態の分布を反映する。したがって、アンチストークス UVRR スペクトルを時間分解測定することによって、芳香族アミノ酸残基のもつエネルギーを直接観測することができると考えられる。そこで本研究では、ヘムタンパク質のひとつであるチトクロム c を用いて、タンパク質中エネルギー散逸の直接観測を試みた。チトクロム c を選んだ理由は、トリプトファン残基が一つのみであり、タンパク質内で一つの残基を選択的に観測できること、また、酸化形チトクロム c は光反応をほとんど起こさないことが知られていることのためである。我々は今回初めて、アミノ酸残基単位で、タンパク質中のエネルギーの流れをとらえることに成功した。

酸化形チトクロム c のアンチストークス時間分解 UVRR スペクトルには、強いバンドが 756 cm^{-1} と 1009 cm^{-1} に観測された。これらはともにトリプトファン残

基によるもので、それぞれ W18 と W16 バンドに帰属できる。これらのバンドの強度は光励起とともにいったん増し、その後ゼロに減衰した。バンド強度の増大は、ヘムからトリプトファン残基への振動エネルギーの流入に、バンド強度の減少は、トリプトファン残基から周囲のアミノ酸残基への振動エネルギーの流出を反映していると考えられる。時間分解 UVRR スペクトルで観測されたストークスバンドの時間変化を考慮して解析したところ、エネルギーの流入と流出の時定数はそれぞれ 1-3 ps および約 8 ps と見積もられた。

図 1 に示すように、チトクロム c のトリプトファン残基は、ヘムのプロピオン酸基に隣接しているため、ヘムから直接エネルギーを受け取る可能性が高いと考えられる。デオキシ形ミオグロビンについては、溶媒(水)へのエネルギー散逸が水の温度上昇として観測されている[2]。溶媒の温度上昇には二つの成分があり、速い成分の時定数は $7.5 \pm 1.5\text{ ps}$ 、遅い成分は約 20 ps と求められている。チトクロム c とミオグロビンは、いずれも球状タンパク質で、大きさも同程度であることから、チトクロム c の場合も近い値の時定数で水へのエネルギー散逸が起きると考えられる。トリプトファンからのエネルギー流出の時定数として得られた約 8 ps という値は、水の温度上昇の時定数と同程度かそれより小さく、ヘム → タンパク質 → 水と、エネルギーが伝搬していることと矛盾しない。

これまで、タンパク質内のエネルギー散逸の詳細は不明であったが、本研究の知見は、その解明のための第一歩になると考えられる。

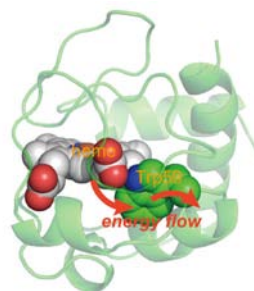


図 1. チトクロム c 中の振動余剰エネルギーの流れ

引用文献

- [1] Y. Mizutani and T. Kitagawa, *Science* **278**, 443-446 (1997).
[3] T. Lian, B. Locke, Y. Kholodenko, and R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem.* **98**, 11648-11656 (1994).

業績紹介：フラビンの青色光吸収で活性化される酵素 PAC について

低温単一分子分光によりフラビン結合部位の構造変化を観測

松下道雄 (東工大院理工・計画研究代表者)

藤芳 暁 (東工大院理工・研究協力者)

論文題目：“Structural change of a cofactor binding site of flavoprotein detected by single-protein fluorescence spectroscopy at 1.5 K”

著者：S. Fujiyoshi, M. Hirano, M. Matsushita, M. Iseki and M. Watanabe

雑誌巻号：Phys. Rev. Lett. **106**, 078101 (2011).

青色光を吸収するフラビンと結合し、青色光のセンサーとして働くタンパク質が幾つか知られている。その中に、青色光センサーであると同時に、青色光によって自らの酵素としての機能を活性化して細胞内信号伝達物質の一つである cAMP を産生する、photo-activated adenylyl cyclase (PAC) と呼ばれるタンパク質がある。PAC はミドリムシの走光性を司る物質として発見された。我々は、フラビンによる青色光吸収が引き起こす酵素機能活性化の初期過程を探るため、ミドリムシから抽出・精製した天然の PAC (native PAC) 一個一個の蛍光スペクトルを、温度 1.5 K で測定した。

PAC は α と β の 2 種類のポリペプチド 2 本ずつからなる四量体タンパク質であり、 α 鎖、 β 鎖ともにフラビン結合部位が 2 箇所あるので合計 8 個のフラビンを結合している。フラビン結合部位一箇所だけを含む部分タンパク質は再構成可能であるが、8 量体の PAC 全体を大量発現できる系はまだ見つかっていない。このため native PAC はミドリムシから抽出するほかなく、一度に精製できる量が限られている。単一タンパク質分光では一回のサンプル調製に 10^{-11} M の溶液を数 μ l しか使わない。このため、精製した試料がごく少量でも問題なく測定ができたことは注目に値する。

ミドリムシから単離・精製した native PAC 1 個の蛍光強度の時間変化を図 1 に示す。温度 1.5 K でも段階的に光退色を起こし、50 分後には完全に蛍光がなくなっている。しかし蛍光強度は単調に減少し続けたのではなく、図中 c と e に見られるように一時的な強度回復を含んでいる。図中 a から e で示した時間のスペクトルを図 2 に示す。c と e の強度の回復は、約 50 nm のスペクトルのシフトを伴う可逆的な過程であること

が分る。同様のスペクトル変化は、フラビン結合部位一箇所だけを再構成したポリペプチドでも観測された。

50 nm ものスペクトル変化を引き起こしているのは、フラビンとタンパク質間の水素結合を作っているプロトンだと考えられる。フラビンに対する影響が一番強いこのプロトンでも、フラビンの Stark 効果などから見積るかぎり、観測されたシフトの 20% しか説明できない。50 nm のシフトは単なるプロトンの動きだけでなく、フラビンの電子状態も変化していることを示唆している。

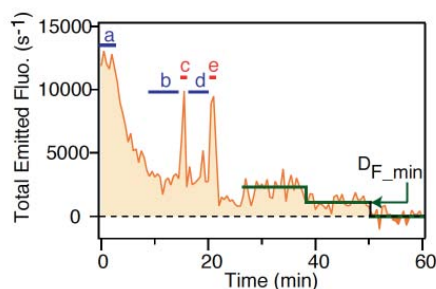


図 1. native PAC 1 個の 1.5 K における蛍光強度の時間変化。

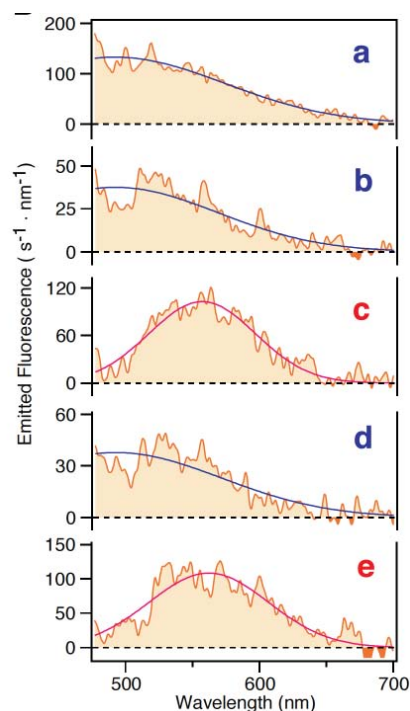


図 2. Native PAC 1 個の 1.5 K における蛍光スペクトルの時間変化。A から e は図 1 に示した時間に対応する。