

2P098 光反応中間体におけるイエロープロテインのタンパク質構造：発色団周辺水素結合変化の変異体紫外共鳴ラマン測定による解析

(阪大院理¹、奈良先端大物質創成²)

○水野 操¹、上久保 裕生²、片岡 幹雄²、水谷 泰久¹

【序】

イエロープロテインは、紅色光合成細菌に含まれる光センサータンパク質であり、この細菌が示す負の走光性に関与すると考えられている。センサー部位である発色団は、*p*-クマル酸である。これが青色光を吸収し、光異性化が起こる。発色団の構造変化に連動して、タンパク質部分を構造変化が伝播し、タンパク質の機能が生み出される。時間分解紫外共鳴ラマン分光法は、機能と直接関わるタンパク質部分の構造ダイナミクスの実時間観測が可能である。紫外共鳴ラマンスペクトルには、共鳴ラマン効果により、タンパク質骨格中に含まれる芳香族アミノ酸残基やペプチド結合に由来する振動バンドが部位選択的に観測される。紫外共鳴ラマンスペクトルの変化を追跡することで、幅広い時間領域におよぶタンパク質部分における構造ダイナミクスを議論できる。我々はこれまでに、イエロープロテインのピコ秒時間領域における光反応初期中間体において、チロシン (Tyr) およびトリプトファン (Trp) 残基の周辺構造、二次構造に変化があることを見出し報告した[1]。今回、変異体の時間分解紫外共鳴ラマン測定を新たに行い、光反応中間体においてスペクトル変化を示した Tyr 残基の帰属を行った。この結果をもとに、光反応初期中間体における発色団周辺のタンパク質構造を議論する。

【実験】

時間分解紫外共鳴ラマン測定では、紫外共鳴ラマンスペクトルの高感度測定を行うため、チタンサファイヤレーザーから出力されたピコ秒パルス光 (789 nm, 1 kHz) を光源にもちいて、種々の非線形光学効果による波長変換を行った。ポンプ光には、イエロープロテイン中に含まれる *p*-クマル酸の吸収ピーク (446 nm) の青色可視光を使用した。プローブ光には、Tyr 残基に由来する振動バンド観測に適した波長 236 nm の紫外光を使用した。これらの光を、試料溶液でできた液膜に集光し、タンパク質からの紫外共鳴ラマン散乱光を得た。迷光除去のためプリズム型前置分光器をフィルターとして用いた後、ラマン散乱光を主分光器で分散し、CCD 検出器で検出した。装置の時間分解能は約 3 ps であった。

タンパク質試料は、野生型、および通常の水素結合よりも距離が短い水素結合を *p*-クマル酸と形成するアミノ酸残基[2]の変異体 (Tyr42→Phe (フェニルアラニン) : Y42F、Glu (グルタミン酸) 46→Gln (グルタミン) : E46Q) のイエロープロテインを、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に溶かしたもの (濃度 100 μM) を使用した。実験は室温で行った。

【結果と考察】

野生型および変異体イエロープロテインの時間分解紫外共鳴ラマン差スペクトルを図 1 に示す。光励起 3 ps 後のスペクトルは、センサーである *p*-クマル酸が電子励起状態にあるときのタンパク質構造を反映する。野生型の差スペクトル (図 1a) には、Tyr 残基の振動バンドである Y8a (1618 cm⁻¹)、Y7a (1210 cm⁻¹)、Y9a (1179 cm⁻¹)、および Y1 (845 cm⁻¹) バンドの位置に負のバンドが観測された[1]。この負のバンドは、ポンプ光未照射の状態と

比較して、反応中間体のバンド強度が減少したことを表している。観測されたバンド強度の減少は、*p*-クマル酸が励起状態である場合に、Tyr 側鎖のヒドロキシル基が関与している水素結合が強化されたことを示唆する。差スペクトルに観測される Tyr 残基の振動に由来する負のバンドは、発色団の異性化に伴って時間とともに減衰する。これは、励起状態と比較して Tyr 残基の振動バンド強度が回復し、異性化により水素結合強度が弱化したことを示している。

イエロープロテイン中には、5 個の Tyr 残基がある。差スペクトルに現れた Tyr 残基のバンド強度変化は、5 個の Tyr 残基のうち、*p*-クマル酸と直接水素結合している Tyr42 残基の構造変化の可能性がもっとも高いと考えられる。これを確かめるため、Y42F 変異体の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルの測定を行った (図 1b)。野生型の差スペクトルと比較して、Y42F 変異体の差スペクトルには、バンドがまったく観測されなかった。このことから、野生型のスペクトルで観測された Tyr 残基の振動スペクトル変化は、Tyr42 残基のみの構造変化を反映すると帰属した。したがって、*p*-クマル酸と Tyr42 残基の水素結合が、励起状態において強化し、その後、発色団の異性化に伴い弱化する結論できる。

一方、*p*-クマル酸は、Tyr42 残基とともに Glu46 残基とも水素結合を形成している。このアミノ酸残基の変異体 (E46Q) の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを測定したところ (図 1c)、差スペクトルでは、Tyr 残基の振動バンド強度が、野生型と同様に、励起状態において減少し、発色団の異性化に伴って回復することがわかった。この結果は、E46Q 変異体では、Tyr42 残基の構造変化が、野生型と同じように起こることを示唆する。野生型における Glu46 残基と、E46Q 変異体における Gln46 残基では、後者の方が、発色団との距離が長く、したがって水素結合が弱いと考えられる。今回観測された E46Q 変異体のスペクトル変化は、*p*-クマル酸と Glu46 残基との水素結合が、*p*-クマル酸および Tyr42 残基の構造ダイナミクスに大きな影響を与えないことを示唆している。反応初期の構造ダイナミクスについて、最近の中性子結晶構造解析の結果もあわせ、さらなる検討を行う必要がある。

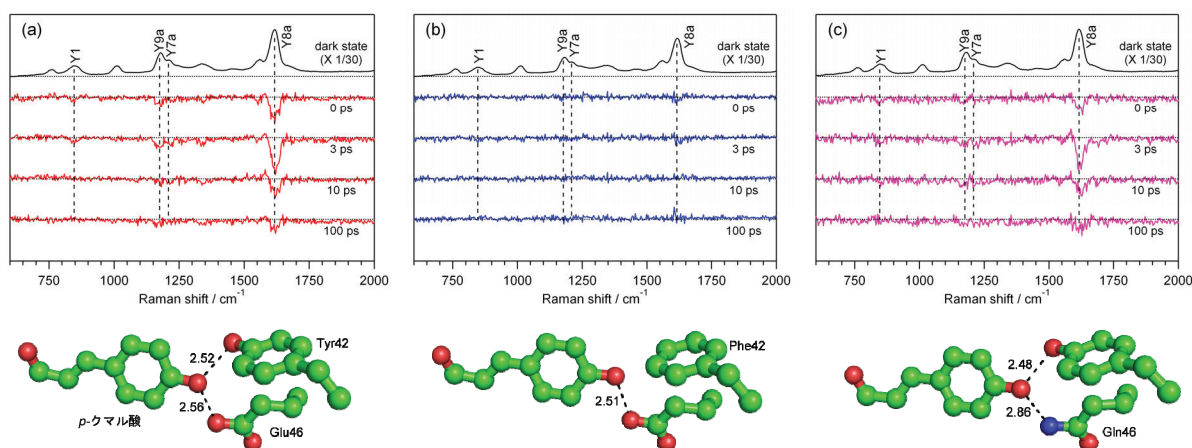


図 1. イエロープロテインの紫外共鳴ラマンスペクトル (黒線) と時間分解ラマン差スペクトル (赤, 青, および紫線). (a) 野生型, (b) Y42F 変異体, (c) E46Q 変異体. Tyr 残基の振動バンドは、頭文字に Y を用いて表示する. スペクトル下部に、それぞれのイエロープロテインの基底状態における発色団周辺の結晶構造 (PDB ID= 2ZOH: 野生型, 1F9I: Y42F, 1UGU: E46Q) を示す. 図中数字は、酸素原子 (*p*-クマル酸) - 酸素または窒素原子 (アミノ酸残基) 間の距離 / Å である.

【参考文献】

[1] M. Mizuno, et al., *JPCB* **111**, 6293 (2007). [2] S. Yamaguchi, et al., *PNAS* **106**, 440 (2009).