

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

(阪大院理) ○藤井直樹, 水野操, 水谷泰久

【序】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、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。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[1]。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, 2]および、溶媒の温度上昇[3]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。

【実験】ピコ秒時間分解 UVRR スペクトル測定は、再生増幅器型チタンサファイアレーザー (1 kHz) を用い、ポンプ-プローブ法で行った。UVRR 測定では、ポンプ光は、波長 405 nm、エネルギー 20 μJ 、プローブ光は波長 230 nm、エネルギー 1.0 μJ のものを用いた。ポンプ光とプローブ光の相互相関時間は、3.6 ps であった。

酸化形チトクロム c は光反応を起こさないことが知られているが、時間分解ラマン測定後の試料を調べたところ、ヘムの還元された成分がわずかに含まれていることがわかった。これは、低収率で起きる光還元の生成物が蓄積したためだと考えられる。そこで、チトクロム c の天然の電子受容体であるチトクロム c 酸化酵素を加えることによって、還元形の蓄積を防いだ。

また、ヘムの振動エネルギー緩和測定を行うために、時間分解アンチストークス可視共鳴ラマン測定を合わせて行った。可視共鳴ラマン測定では、ポンプ光の波長とエネルギーは、540 nm, 32 μJ 、プローブ光の波長とエネルギーは、442 nm, 0.3 μJ という条件で測定を行った。

【結果】酸化形チトクロム c のアンチストークス時間分解 UVRR 測定の結果を図 1 に示す。図 1 のスペクトルは、時間分解スペクトルからプローブ光のみで測定したスペクトルを差し引いた差スペクトルである。差スペクトルの計算は、内部強度標準として入れた硫酸イオンのバンド強度を基準にして行った。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。図 2 に、W18 バンド強度の時間変化を示す。W18 バンド強度の増大と減少の時定数はそれぞれ、 5.6 ± 1.4 ps と、 5.6 ± 1.4 ps と求められた。W18 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、W18 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に対応していると考えられる。また、時間分解アンチストークス可視共鳴ラマンスペクトルにおいて、ヘムのアンチストークスラマンバンド (ν_4 バンド) 強度の変化が観測された。図 3 にそのバンド強度の時間変化を示す。 ν_4 バンド強度の減少の時定数は、 1.5 ± 0.1 ps と求められた。 ν_4 バンド強度の減少は、ヘムの振動エネルギー緩和過程に対応していると考えられる。

【考察】今回、時間分解アンチストークス UVRR 測定によって、タンパク質内のエネルギー移動をとらえることに初めて成功した。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。しかしながら、今回求められたヘムのバンド (ν_4 バンド) 強度の減少の時定数 (1.5 ± 0.1 ps) と、トリプトファン残基のバンド (W18 バンド) 強度の増大の時定数 (5.6 ± 1.4 ps) は一致しなかった。このことから、 ν_4 モードのエネルギーが直接 W18 モードに伝わっているのではなく、別のモード、すなわち、ヘムの ν_4 以外のモードあるいは、トリプトファン残基の W18 以外のモードを介して、W18 モードに伝わっていると考えられる。

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 [3]。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 ± 1.5 ps、遅い成分は、およそ 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 5.6 ps という値は、水の温度上昇の時定数より小さく、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。

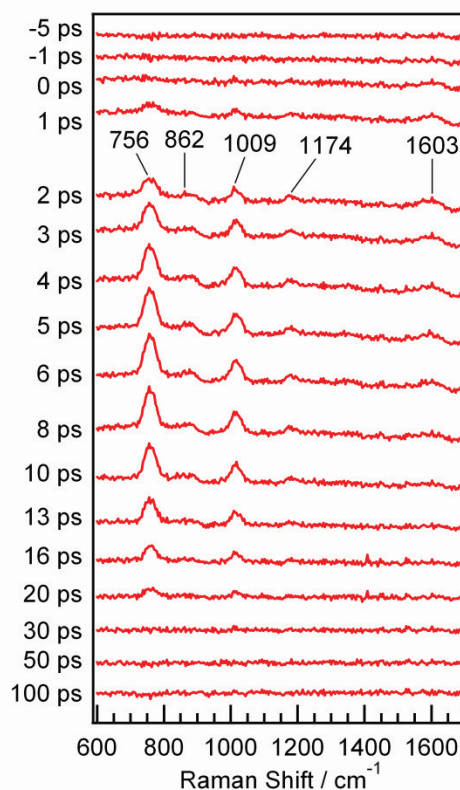


図 1 酸化形チトクロム c の時間分解アンチストークス UVRR スペクトル

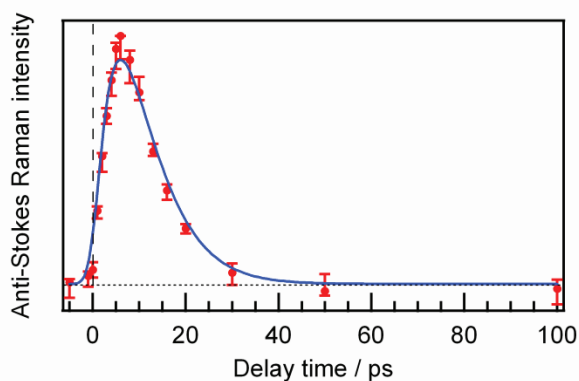


図 2 W18 バンド強度の時間変化. 実線は $A[\exp(-t/\tau_{\text{rise}}) - \exp(-t/\tau_{\text{decay}})]$ と装置応答関数をコンボリュートした関数でフィットした結果である。

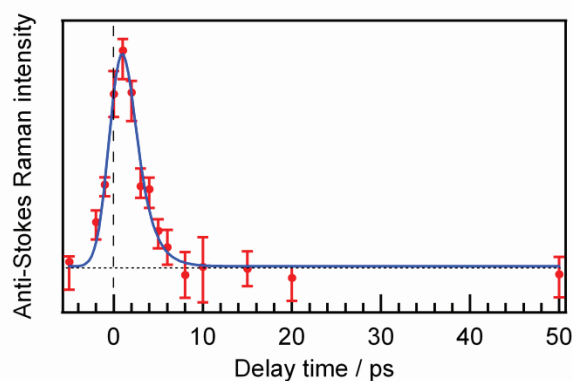


図 3 ν_4 バンド強度の時間変化. 実線は $A\exp(-t/\tau_{\text{decay}})$ と装置応答関数をコンボリュートした関数でフィットした結果である。

【謝辞】チトクロム c 酸化酵素のサンプルをご提供して下さった小倉尚志教授 (兵庫県立大) に感謝致します。

【参考文献】

- [1] Y. Mizutani and T. Kitagawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **75**, 623-639 (2002).
- [2] 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).