

## 2B05 イエロープロテインの発色団周辺水素結合ネットワークの変化

(<sup>1</sup> 阪大院理、<sup>2</sup> 奈良先端大物質創成)

○水野 操<sup>1</sup>、上久保 裕生<sup>2</sup>、片岡 幹雄<sup>2</sup>、水谷 泰久<sup>1</sup>

**【はじめに】** タンパク質中の水素結合は、立体構造の保持や機能発現に重要な役割を担っている。光センサータンパク質であるイエロープロテインでは、結晶構造解析から、発色団である *p*-クマル酸と隣接する二つのアミノ酸残基 (Tyr42 および Glu46 残基) との間に形成される水素結合について、結合距離が約 2.5 Å であることが知られている。これは通常の O-H $\cdots$ O 型の水素結合距離 (約 2.7 Å) と比較して短い短距離水素結合である。特に、発色団と Glu46 残基との間の水素結合は、暗状態において存在する低障壁水素結合として注目されている[1]。我々はこれまでに、時間分解紫外共鳴ラマン分光法をもちいて、ピコ秒領域においてイエロープロテイン中の Tyr 側鎖振動バンドのスペクトル変化を観測した[2]。これが発色団と Tyr42 残基の間の水素結合変化に起因することを変異体測定により帰属し、昨年の本討論会において報告した。Tyr 残基に由来する振動ラマンバンドの強度および振動数は、タンパク質中の水素結合状態の指標となる。イエロープロテインにおいて、Tyr42 および Glu46 残基を他のアミノ酸に置換することにより、発色団周辺の水素結合ネットワークが変化する。今回、このことに着目し、変異体イエロープロテインの紫外共鳴ラマンスペクトルを測定し、水素結合ネットワークの状態に応じて、Tyr42 残基のスペクトルがどのように変化するかを観測した。暗状態におけるスペクトルと時間分解測定により得られるスペクトルの変化をもとに、暗状態および励起状態における発色団周辺水素結合ネットワークの変化を議論する。

**【実験】** 暗状態の紫外共鳴ラマン測定には、チタンサファイアレーザーの 4 倍波 (236 nm) のナノ秒紫外光パルスを探光光にもちいた。時間分解ラマン測定では、チタンサファイアレーザーから出力されたピコ秒パルスを通線形光学効果により波長変換し、446 nm のポンプ光と、236 nm の探光光を発生させ、これを使用した。タンパク質からのラマン散乱光をプリズム型前置分光器により迷光除去した後、主分光器で分散し、CCD 検出器で検出した。試料には、野生型、および Y42F (Tyr42 を Phe に置換)、E46Q (Glu46 を Gln に置換) 変異体イエロープロテインを pH7.0 の緩衝液に溶かした溶液を使用した。

**【結果と考察】** 水素結合ネットワークの変化に伴う Tyr42 残基のスペクトル形状の変化を調べるために、暗状態における紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した (図 1)。上段のスペクトルには、タンパク質中にある Tyr および Trp 残基の振動ラマンバンドの寄与が含まれている。これらのスペクトルは、発色団から離れた位置に 1 個だけある Trp 残基のバンド強度で規格化している。これをもとに、野生型および E46Q 変異体における Tyr42 残基のスペクトルを求めた (図下段)。Y42F 変異体には Tyr42 残基がないため、野生型のスペクトルから Y42F 変異体のスペクトルをひくことで、野生型における Tyr42 残基の共鳴ラマンスペクトルを得た。同様にして、E46Q 変異体中の Tyr42 残基のスペクトルを得た。野生型の Tyr42 残基のスペクトルにおけるバンド強度は、E46Q 変異体のバンド強度よりも大きくなっている。野生型と E46Q 変異体における X 線結晶構造解析の結果は、46 番目のアミノ酸残基と発色団との水素結合が、野生型において短距離水素結合であるが、E46Q 変

異体において通常の水素結合へ変化することを示している。一方、野生型における Tyr42 残基と発色団との水素結合距離が、E46Q 変異体における結合距離とほぼ同じであることが報告されている[3]。このことから、図 1

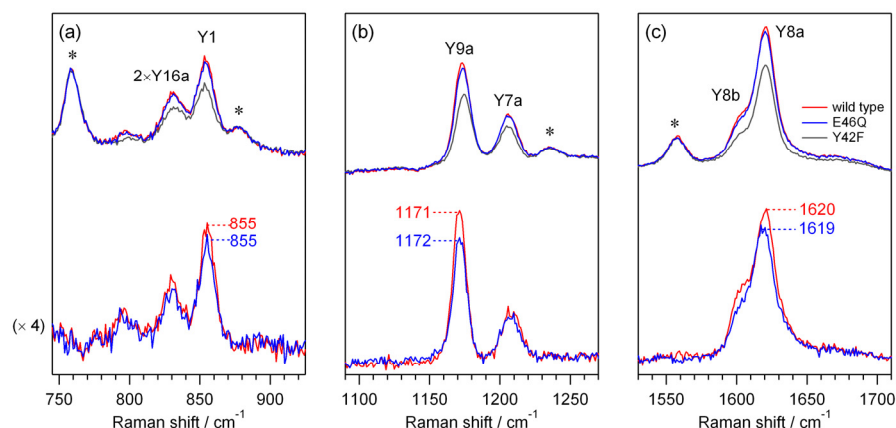


図 1. 野生型および変異体イエロープロテインの紫外共鳴ラマンスペクトル。(a) Y1, (b) Y9a および Y7a, (c) Y8a バンド領域。(上段) 各試料のスペクトル。\*は Trp 残基の振動バンドを表している。(下段) 測定結果をもとに得られた野生型 (赤) および E46Q 変異体 (青) における Tyr42 残基のスペクトル。

Tyr42 残基のラマンバンド強度の変化は、水素結合のドナー (D) -アクセプター (A) 間の結合距離の変化を単純に反映しているのではなく、結合角 ( $\angle O-H \cdots O$ ) などの因子にも依存すると考えられる。今後、野生型[1]だけではなく、E46Q 変異体についても、水素原子位置の同定が可能な中性子結晶構造解析の結果とあわせた検討が必要となる。

次に、野生型と E46Q 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 2 に示す。差スペクトルは、ポンプ光照射によるスペクトル変化を取り出したものである。光励起後 3 ps では、Tyr 残基の振動バンドの位置に負のバンドが現れた。これは、発色団の光励起に伴い、Tyr42 残基のバンド強度が減少したことを表している。これまでの研究において、チロシン溶液における水素結合強度の変化により、ラマン励起プロフィールのシフトが起こることが報告されている[4]。これにより我々は、

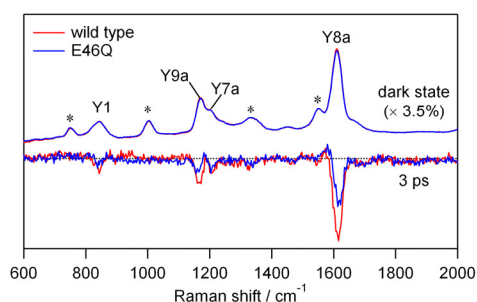


図 2. 野生型 (赤) および E46Q 変異体 (青) の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。Y で表示したバンドは Tyr 残基の振動バンドを、\*で表示したバンドは Trp 残基の振動バンドを示している。

観測された Tyr42 残基のバンド強度の減少が、水素結合強化による励起プロフィールのシフトに起因すると結論した。励起状態における発色団と Tyr42 残基との水素結合強度は、暗状態の場合と同様に、水素結合における D-A 間の結合距離だけではなく、結合角などの因子により変化すると考えられる。また、発色団が励起状態にあるときと暗状態にあるときの Tyr42 残基のバンド強度の差は、野生型よりも E46Q 変異体のほうが小さいことがわかった。実験はポンプ光の強度を強くして、スペクトル変化が飽和する条件で行った。この条件では、反応しうる全てのイエロープロテイン分子が励起状態にあると考えられる。得られた結果をもとに励起状態の野生型と E46Q 変異体における Tyr42 残基のスペクトルを算出したところ、暗状態で観測されるほどバンド強度に差が見られないことがわかった。

今回の研究により、Glu46 残基から Gln 残基への置換が、暗状態でも励起状態でも水素結合ネットワークを介して、Tyr42 残基の構造変化に影響を与えることがわかった。

#### 【参考文献】

[1] S. Yamaguchi, et al., *PNAS* **106**, 440 (2009). [2] M. Mizuno, et al., *JPCB* **111**, 6293 (2007). [3] M. Sugishima, et al., *Acta Crystallogr., D* **60**, 2305 (2004). [4] Z. Chi and S. A. Asher, *JPCB*, **102**, 9595 (1998).