

4D19

タンパク質内エネルギー散逸の時空間分解観測：ヒーター分子からの距離依存性

(阪大院理) 藤井 直樹, 水野 操, 石川 春人, ○水谷 泰久

はじめに 反応余剰エネルギーの緩和は、液相中での化学反応を理解するうえで非常に重要な過程である。この緩和機構の解明には、分子レベルの空間分解能とピコ秒の時間分解能でエネルギー分布を求める必要がある。本研究では、ヘムタンパク質のヘムを光励起し、そこで発生した余剰エネルギーがタンパク質内をどのように伝搬するかを、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて調べた。220-250 nm の紫外光を用いると、タンパク質中に含まれる芳香族アミノ酸残基の共鳴ラマンスペクトルが選択的に得られる。また、アンチストークスラマン散乱光の発生は振動励起状態に特有の現象であるので、その強度から残基がもつ余剰エネルギーの大きさを求めることができる。したがって、ヘムの光励起後、アミノ酸残基のアンチストークス共鳴ラマンスペクトルを時間分解測定することによって、特定の残基に関するエネルギーの流入・流出を実時間測定することができる。本研究では、このような共鳴ラマン分光法の長所を最大限に活かして、ミオグロビンのタンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピングを試みた。ミオグロビンを用いた理由は、ヘムの光励起に対して安定であること、変異体も含めタンパク質の立体構造が X 線結晶構造解析から詳細に調べられていること、大腸菌中の発現によって比較的大量にタンパク質試料が調製可能であるためである。

実験 モード同期チタンサファイアレーザーの出力を再生増幅器（繰り返し周波数 1 kHz）で増幅して得られたパルス光（波長 810 nm、パルス幅 2.6 ps）より、自作の波長変換システムを用いてプローブパルス（波長 230 nm）およびポンプパルス（波長 410 nm）を得た。ポンププローブ法（相互相関幅 3.7–3.8 ps）によって時間分解ラマンスペクトルを測定し、バンド面積強度の時間依存性から振動エネルギー励起／緩和の時定数を求めた。

試料には、立体構造が詳細に調べられているマッコウクジラ由来のミオグロビンを用いた。このミオグロビンにはトリプトファンが 2 残基含まれているため、まずこれらをラマン散乱強度の弱いチロシン、フェニルアラニンに置換した変異体(W7Y/W14F)を作製した。その際、大腸菌での発現量が著しく低下したため、ベクターの交換、培養条件の最適化を行った。これによって、収量を約 10 倍に改善することができた。この変異体にトリプトファン残基を 1 残基導入し、トリプトファン残基の振動エネルギー励起／緩和を、その時間分解アンチストークス共鳴ラマンスペクトルによって観測した。ヘムから同じ方向で、かつ距離の異なった位置にトリプトファンを導入した変異体 2 種、W68 および W28 変異体、を作製し、ヘムからのエネルギー伝搬について、距離依存性を調べた（ヘムからトリプトファン残基までの距離は、それぞれ 6.2 および 11.8 Å である）。これらに加え、クジラ由来ミオグロビンの 14 番目のトリプトファンを残した変異体、W14 変異体についても振動エネルギー励起／緩和を調べた。この変異体において、ヘムからトリプトファン残基の距離は 15.2 Å である。

結果・考察 W68 変異体の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトルを図 1 に示す。ヘムの光励起に伴って、バンド強度の増大とそれに引き続いた減少が観測された。バンド強度の増大はトリプトファン残基への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

らのエネルギーの流出に対応している。図2は、760 cm^{-1} にみられるW18 バンド強度の時間変化を示している。縦軸の強度は、W68 変異体の5 psでのバンド強度で規格化したものである。図中の実線は、関数 $A[\exp(-t/\tau_{\text{decay}}) - \exp(-t/\tau_{\text{rise}})]$ と、装置応答関数とをコンボリュートした関数でフィットした結果である。バンド強度の増加と減少の時定数は、W68 変異体では3.0, 9.6 psと、W28 変異体では4.0, 19.2 psと求められた。われわれは以前、リガンドの光解離後のヘムの振動冷却過程を調べ、その時定数を1-2 psと求めた¹。また、水の赤外吸収スペクトル変化から求められたタンパク質から水へのエネルギー移動は、7.5 ps (60%)および約20 ps (40%)の時定数で表される2つの成分からなることが報告されている²。トリプトファン残基へのエネルギー流入の時定数がヘム冷却の時定数よりも大きく、かつエネルギー流出の時定数がヘム冷却の時定数（遅い成分）と同程度かそれよりも小さいことは、余剰エネルギーが、ヘム→タンパク質→水と伝搬するという描像と矛盾しない。さらにアンチストークスバンド強度の比較から、28番目の位置には、68番目の位置の約1/3のエネルギーが到達していることがわかった。W14 変異体では、アンチストークスW16 およびW18 バンドは観測されたものの、その強度はきわめて弱かった。熱源からの距離が離れると、観測サイトでのエネルギーの伝達速度が遅くなるということ、および余剰エネルギー量が低下するということが、熱拡散の考え方と矛盾しない。しかし、3種類の変異体の測定結果それぞれに、熱拡散方程式から得られた関数を当てはめると、同一のパラメーターでは表現できなかつた。これはナノメートル前後のマイクロなスケールでのエネルギー伝達を考える際、通常の熱拡散の考え方では、その挙動を適切に表現できないことを示している。

本研究は、タンパク質内でヒーターサイトと観測サイトの相対位置を制御し、エネルギーの移動を直接観測した最初の例である。この観測の成功によって、本研究の手法が、エネルギー緩和の解明に極めて有効であることを示すことができた。

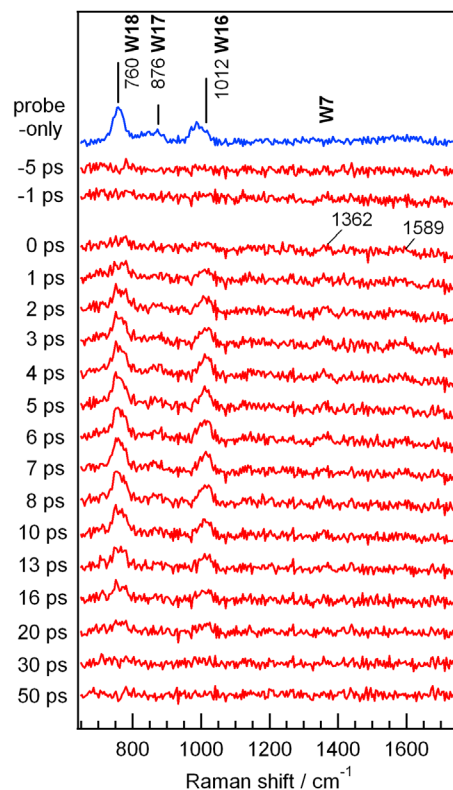


図1. V68W 変異体の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトル。一番上のスペクトルは、プローブ光のみで測定したスペクトル、その他のスペクトルは、時間分解差スペクトルである。

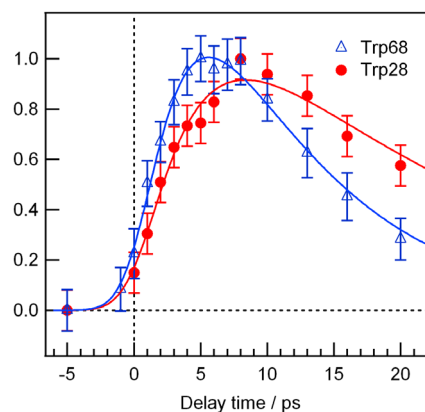


図2. Trp68 と Trp28 の W18 バンドの面積強度変化の比較。縦軸の強度は、それぞれの強度変化において、最も強い値で規格化した値である。

¹ Mizutani, Y.; Kitagawa, T. *Science* **1997**, 278, 443; Mizutani, Y.; Kitagawa, T. *Chemical Record* **2001**, 1, 258.

² Lian, T.; Locke, B.; Kholodenko, Y.; Hochstrasser, R. M. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11648.