

1B01

孤立気相分光による尿酸 - メラミン錯体の微細構造決定

(横浜市大院・生命ナノ) 浅見祐也, 浦島周平, 三枝洋之

Structural identification of uric acid-melamine complex isolated in the gas phase

(Yokohama City Univ.) Hiroya Asami, Shu-hei Urashima, Hiroyuki Saigusa

[序] 尿酸[UA, 図 1(a)]は核酸塩基の最終代謝物として知られ、その構造や物性には古くから興味を持たれている。昨年の本討論会にて我々は、UA 水和クラスターの微細構造を解明することにより、この分子の疎水的な性質を孤立気相レベルで明らかにした。[1,2] しか

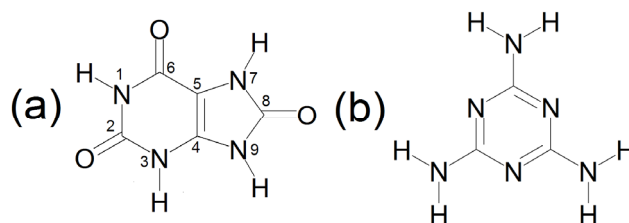


図 1. (a)尿酸(UA)と(b)メラミン(MEL)の構造。

しながら近年、過剰なメラミン[MEL, 図 1(b)]が含まれるドッグフードや乳幼児食を摂取すると、腎結石による腎不全や腎臓がんの発生率が飛躍的に高まることが報告された。[3] この MEL の毒性は、体内で UA と MEL が安定な核クラスターを形成し、腎結石の成長を促進することにあると認識されている。そこで我々は、この核となる UA - MEL 錯体をレーザー脱離法により生成することを試みた。その結果、特異的な立体構造を有する 1:1 錯体が存在することを、紫外および赤外レーザー分光により見出した。

[手法] UA と MEL をグラファイトマトリクスと混合させた試料ペレットを作成し、レーザー脱離 - 超音速ジェット冷却法により、クラスターを生成した。これらを二光子共鳴イオン化(R2PI)した後、TOF 法により質量選別した。さらに、それぞれのクラスターの赤外振動スペクトルを赤外 - 紫外二重共鳴分光法により測定した。一方、理論計算により、様々な異性体の安定構造と振動数を計算した。M06-2X/6-311++G(d,p)レベルで構造最適化を行い、相対エネルギー10kJ/mol 以内の安定構造を抽出した。これらの構造について、CCSD/6-311++G(d,p)レベルで一点計算を行い、また B3LYP/6-311++G(d,p)レベルで調和振動計算を行った。

[結果] UA-MEL 錯体の安定生成 : 図 2 に

UA と MEL の混合物の TOF-mass スペクトルを示す。この測定では UA-MEL 錯体 $(UA)_m(MEL)_n$ のピークが強く観測され、UA 多量体 $(UA)_m(m \geq 2)$ は殆どみられない。このことは、MEL が存在することで UA クラスターの生成が促進しているものと考えられ、MEL の持つ毒性とよく対応する。特に 1:1 錯体の信号強度が強いことから、この錯体には特異的に安定な構造が存在すると推測される。

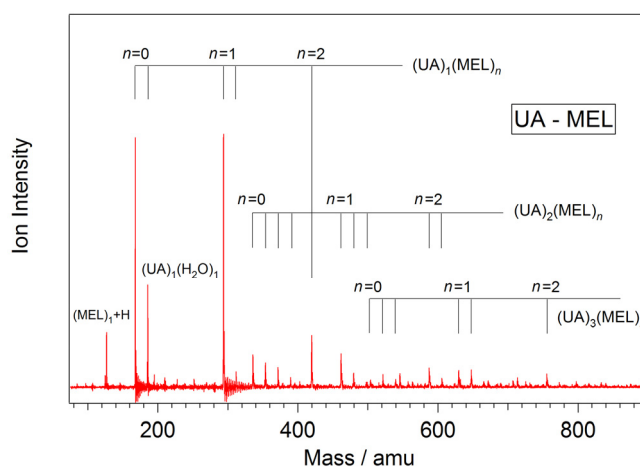


図2. UA-MEL クラスターの R2PI 質量スペクトル. それぞれの水和物も観測されている。

UA-MEL 1:1 錯体の安定構造 : 構造計算に

より得られた UA-MEL 1:1 錯体の安定構造 (相対エネルギー10kJ/mol 以内のもの) を図 3 に示す。これらの構造は MP2 レベルで得られた安定構造[4]とよく対応している。特に平面的な水素結合構

造を持つ UA678 [図 3(c)]の構造は、X線結晶回折の解析により、巨大な結石を形成する核になると推測されてきた。[3,4] しかしながら今回 CCSD レベルで計算を行った結果、UA678 の構造はこれ以外の歪んだ水素結合を持つ UA239 や UA389 [図 3(a)(b)]に比べて、不安定であることが明らかとなった。この結果は、UA-MEL 錯体の分子間水素結合を正確に評価するためには、高次の電子相関が必要であることを示唆している。

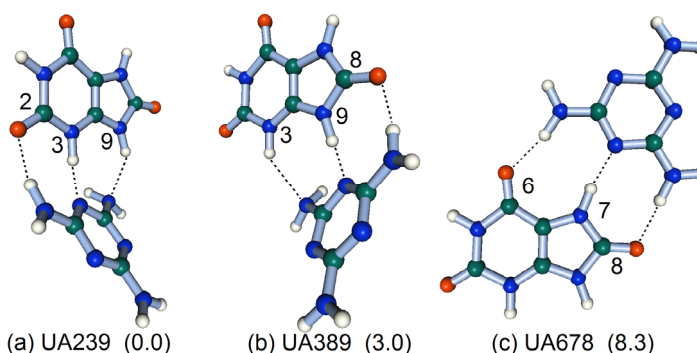


図 3. UA-MEL 1:1 錯体の安定構造. (a) UA239, (b)UA389, (c) UA678. それぞれ水素結合した UA のサイトを表している. 括弧内は CCSD/6-311++G(d,p) レベルの相対エネルギー(kJ/mol).

UA-MEL 1:1 錯体の赤外振動ス

ペクトル：図 4 に UA(a)と UA-MEL 1:1 錯体(b)の赤外振動スペクトルを比較した。UA-MEL 1:1 錯体の 3449 と 3524 cm^{-1} のピークは、UAの N1H と N7H 伸縮振動とよく対応することから、UA678 構造の可能性は除外される。一方、N3H と N9H 伸縮の振動数は錯形成によりシフトしているため、MEL がこれらの NH 結合に水素結合した UA239 か UA389 の構造が示唆される。そこで調和振動計算との比較を行った[図 4(c)-(e)]。UA239(c)と UA389(d)の計算結果は実測のスペクトルをほぼ再現していることがわかる。しかし MEL のアミノ基の反対称伸縮振動[aNH₂(bound2)]の振動数に着目すると、UA239 構造の方が実験値(3498 cm^{-1})とよく対応することから、この構造と帰属した。この結果は、結石形成の核となる錯体は UA678 構造 [3]ではなく、UA239 構造の可能性が高いことを示唆している。

このように、孤立気相クラスターを用いることで、尿酸結石が形成される初期過程を解明できると考えられる。今後、その形成阻害や分解方法についての知見が得られるものと期待される。

このように、孤立気相クラスターを用いることで、尿酸結石が形成される初期過程を解明できると考えられる。今後、その形成阻害や分解方法についての知見が得られるものと期待される。

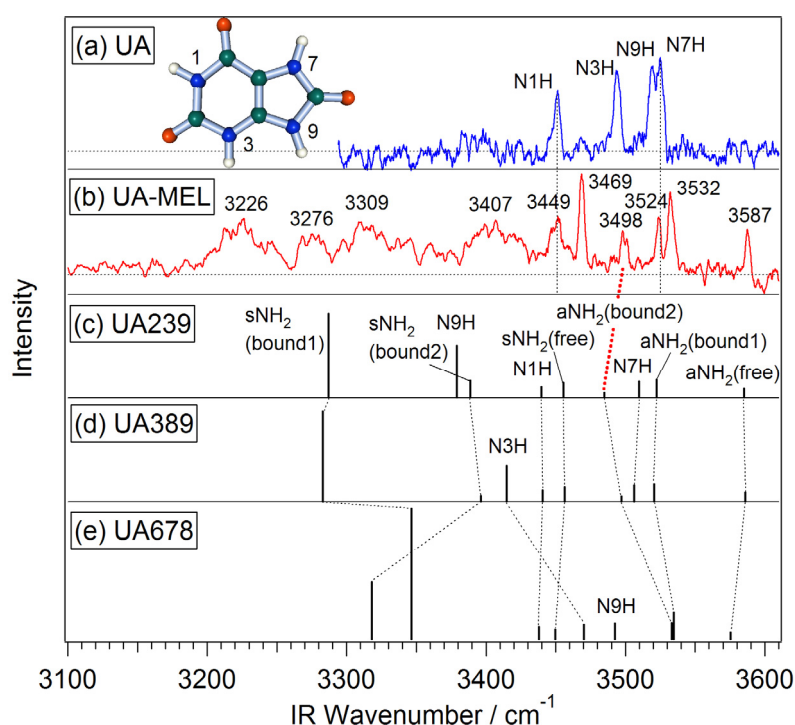


図 4. (a)UA および(b)UA-MEL の赤外振動スペクトル. UA の構造は、図中に示した all-keto 構造と帰属された. (c)-(e): 図 3(a)-(c)に示した最安定構造についての調和振動計算の結果(Scaling factor: 0.955). UA239 のアミノ基の逆対称伸縮振動(aNH₂)と実験値の対応を赤の破線で示した.

[文献] [1] 浦島, 浅見, 三枝, 分子科学討論会 2011, 2A09. [2] H. Asami, S. Urashima, H. Saigusa, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, 13, 20476. [3] C. G. Skinner, J. D. Thomas, J. D. Osterloh, *J. Med. Toxicol.*, 2010, 6, 50. [4] K. M. Anderson, G. M. Day, M. J. Paterson, P. Byrne, N. Clarke, J. W. Steed, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 1058.

分光学・理論計算を用いたキラルなサリドマイド代謝 における分子構造と挙動の解析

(早大先進理工¹, 産総研², 名工大院工³) 荻野禎之¹, 田中真人², 乙川光平¹,
柴田哲男³, 逢坂哲彌¹, 朝日透¹

Spectroscopic and theoretical analysis of chiral molecular structure and behavior in thalidomide metabolism

(Waseda University¹, AIST², Nagoya Institute of Technology³) Yoshiyuki Ogino¹,
Masahito Tanaka², Kohei Otagawa¹, Norio Shibata³, Tetsuya Osaka¹, Toru Asahi¹

【序】

分子の三次元構造において、その鏡像が元の構造と互いに重なり合わさらない性質をキラリティと呼ぶ。キラリティを持つ分子は、その立体異性によって高い選択性を持つ機能を発現する場合が多く、食品や医薬品など多くの分野で使用されている[1]。

近年、多発性骨髄腫の治療薬として再承認を受けたサリドマイドは、20世紀中頃に鎮静剤・睡眠剤として開発された。しかし、サリドマイドを服用した妊婦から生まれた幼児に重篤な催奇形性が見られ、販売が中止された。Blaschkeらの報告によれば、催奇形性を生み出すのは(S)体のサリドマイドのみである[2]。しかし、サリドマイドはヒトの体内において約9時間でラセミ化するため、片方のエナンチオマーのみが催奇形性に寄与するという当初の報告は疑問視されている[3]。さらにサリドマイドは2つの環構造を持つことから加水分解に対して不安定であり、水の存在下で容易に複数の加水分解産物へと変化する[4]。キララル反転と加水分解が同時に起こる複雑な代謝経路の存在が、サリドマイドの詳細な薬理メカニズムの解明を困難にしている(図1)。

本研究において我々は、様々なサリドマイドの薬理活性を可能にしていると考えられる代謝産物の中でも、ヒト体内に多く存在するキラルな加水分解産物に着目した。加水分解産物の安定性及びそのキラリティの動態の解明は、サリドマイドのより効果的で安全な使用法の開発につながる。我々は、分光学的実験と量子化学計算、および代謝モデルの数値シミュレーションを用いて、サリドマイドのキララル反転及び加水分解反応における関連分子の挙動を解析した。

【実験及び計算方法】

pHを調製した水溶液中でサリドマイドと数種の加水分解産物をキララル反転及び加水分解させ、円二色性分散計を用いて吸収スペクトルと円二色性スペクトルを計測した。サリドマイドの環構造及びキラリティに起因するピーク強度の経時変化から反応速度定数を求めた。

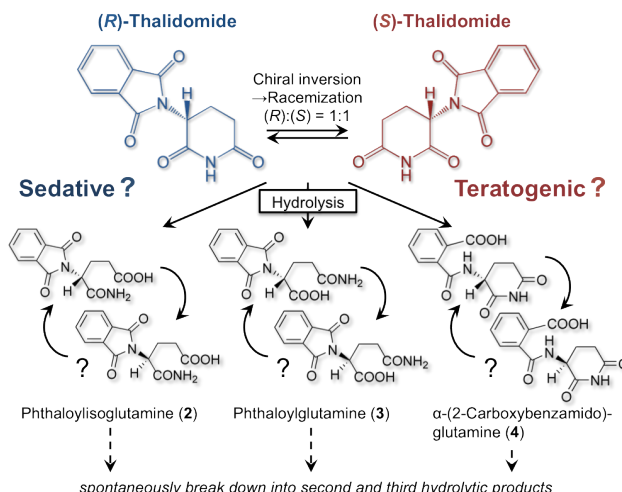


図1. キラルなサリドマイドの代謝経路

温度を 7°C から 47°C まで変化させて反応を行い、Eyring プロットを作成して熱力学量を算出した。加水分解産物とそのエノール体の分子構造を密度汎関数法(B3LYP/6-31G(d,p))により最適化し、キラル反転反応におけるエノール体の生成熱を計算した。キラル反転と加水分解を含むサリドマイドの代謝経路モデルを構築し、各物質の収支とキラリティの反転から連立微分方程式を立て Euler 法による数値解析を行った。

【結果と考察】

サリドマイドの第一世代加水分解産物をさらに加水分解させて吸収スペクトルの経時変化を計測したところ、

phthaloylisoglutamine (2) ではサリドマイド(1)の場合と似た吸収スペクトルの大きな変化が見られたが、phthaloylglutamine (3) と

α -(2-carboxybenzamido)glutamine (4) では変化がほとんど見られなかった (図 1,2)。特に加水分解産物 2 と 3 は構造が類似しているが、反応における活性化エンタルピー ΔH^\ddagger と活性化エントロピー ΔS^\ddagger を算出したところ、2,3,4 の加水分解に対する安定性は主に活性化エントロピーに支配されて決まることが示唆された。

サリドマイドでは keto-enol 互変異性が生じ、keto 体と enol 体の変換の過程でキラル反転が進行すると考えられている。そこでサリドマイドと加水分解産物において keto 体と enol 体の構造から振動数解析を行い、enol 体の生成熱を求めたところ、加水分解産物ではサリドマイドに比べておよそ 35 kJmol⁻¹ 大きな値が得られた (図 3)。この結果から加水分解産物におけるキラル反転速度定数を概算すると、サリドマイドと比べて 6 桁以上小さな値となった。したがって、サリドマイドは一旦加水分解を受け始めると、その途中でキラリティの反転はほとんど起こらず、元来のキラリティの情報が保存されたまま分布すると考えられる。

実験及び理論計算より求められた加水分解産物のキラル反転と加水分解に対する安定性から適切にパラメータを設定し、サリドマイド及び全ての加水分解産物とそのキラリティの存在量の経時変化をシミュレーションしたところ、加水分解に対して安定な加水分解産物ではエナンチオ過剰率の低下が早い段階で平衡に達し、高いエナンチオ過剰率が長時間保持されることが定性的に示された。本講演では、これらの詳細について議論する。

【参考文献】

[1] V. Farina et al., *Chem. Rev.* **106**, 2734-2793 (2006), [2] G. Blaschke et al., *Arzneim. Forsch.* **29**, 1640-1642 (1979), [3] K. Nishimura et al., *Chem. Pharmaceut. Bullet.* **42**, 1157-1159 (1994), [4] H. Schumacher et al., *Bril. J. Pharmacol.* **25**, 324-337 (1965).

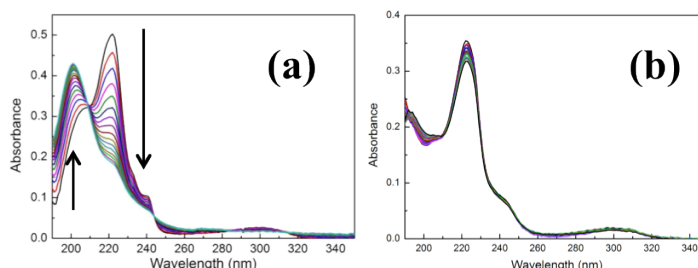


図 2. 加水分解時における 1 (a) と 3 (b) の吸収スペクトルの経時変化

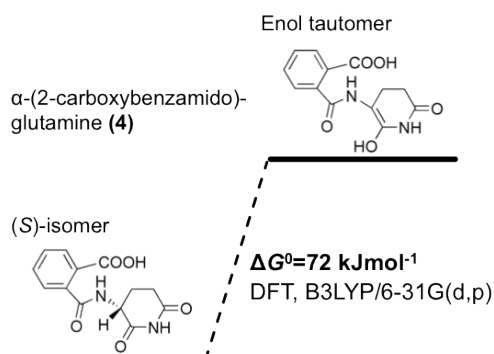


図 3. 加水分解産物のエノール化におけるエネルギーダイアグラムの一例

細胞内酸素濃度計測を目指したレシオ型酸素プローブ分子の開発

(群馬大院・工¹, 秋田県立大², 群馬大学³) 吉原利忠¹・山口祐司¹・穂坂正博²・竹内利行³・飛田成史¹

Development of Ratiometric Molecular Probe for Monitoring Oxygen Levels in Living Cells

(Gunma Univ.¹, Akita Prefectural Univ.²) Toshitada Yoshihara¹, Yuji Yamaguchi¹, Masahiro Hosaka², Toshiyuki Takeuchi¹, and Seiji Tobita¹

【序】好気性生物の生命活動において、酸素は必要不可欠な物質であり、細胞内において酸素は、呼吸鎖における電子伝達系の最終電子受容物質である。一方、組織内における酸素濃度低下は、がん・脳卒中・心筋梗塞などで診られる共通した病態である。このため、細胞、組織などの微小領域内における酸素濃度計測法の開発は、細胞生物学だけでなく臨床医学においても重要である。組織内の酸素濃度計測法として微小電極を用いる方法がある。この方法は、測定中電極周辺の酸素消費を伴うだけでなく、組織に直接電極を挿入するため侵襲的である。また、細胞など μm スケールの微小領域測定は困難である。一方、発光法は高感度および低侵襲的測定が可能な方法として、近年、研究・開発が進められている。本研究では、発光法を用いて微小領域内における酸素濃度を計測するための発光プローブ分子を設計・開発し、それらの溶液、脂質二分子膜、生細胞内における発光特性を明らかにした[1]。

【結果・考察】本研究で設計したレシオ型酸素プローブ分子は、酸素濃度に発光強度が依存しない蛍光性分子と、酸素濃度に発光強度が著しく依存するりん光性分子をリンカーで結合した分子構造を有する。酸素濃度の定量は、蛍光強度を内標準としてりん光強度を測定し、それらの強度比（レシオ比）を用いて行う。これにより、細胞内など不均一系においても、プローブ分子濃度や励起光強度に依存することなく定量化が可能となる。図1に酸素プローブ分子（C343-Ster-BTP）の構造式を示す。蛍光団として青色蛍光を示すアミノクマリン誘導体（C343）、りん光団として室温で赤色りん光を示すイリジウム錯体（BTP）、リンカーとして剛直構造を有するステロイド誘導体を用いた。アセトニトリル（MeCN）中、アルゴン置換下においてC343-Ster-BTPの発光スペクトルを測定したところ、480nm付近にC343に由来する蛍光、615nmにBTPに由来するりん光が観測された。空気飽和下において同様に測定したところ、C343の蛍光強度は一定であったのに対して、BTPのりん光は著しく減少した。次に、りん脂質二分子膜存在下において発光スペクトル測定を行ったところ、BTPのりん光強度に対する酸素濃度依存性が小

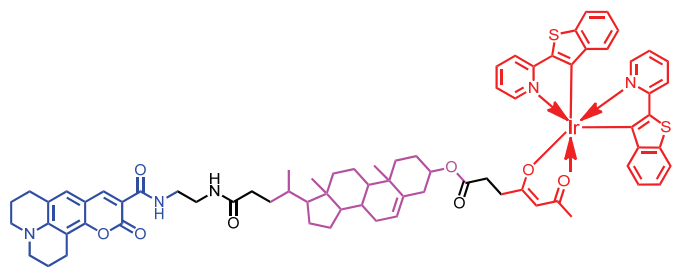


図1 C343-Ster-BTPの構造式

さい結果となった。この原因を明らかにするために、C343-Ster-BTP のりん光寿命 (τ_p) 測定を行った。得られた τ_p 値は $0.14\mu\text{s}$ であり、BTP の膜中の τ_p 値 $5.2\mu\text{s}$ と比較して著しく小さな値であった。これは C343-Ster-BTP のステロイドスペーサーが膜中で凝集し、BTP のりん光が自己消光したためと推察される。以上の結果から、C343-Ster-BTP は MeCN 中において、レシオ型酸素プローブ分子として機能するが、膜中においては使用が困難であり、スペーサーの改良が必要であることが明らかとなった。

図 2 に、スペーサーをステロイド誘導体からテトラプロリンに変えた C343-Pro₄-BTP の構造式を示す。テトラプロリンはアミド水素を有していないため、分子間凝集（例えば β シート構造）が起こりにくいと考えられる。

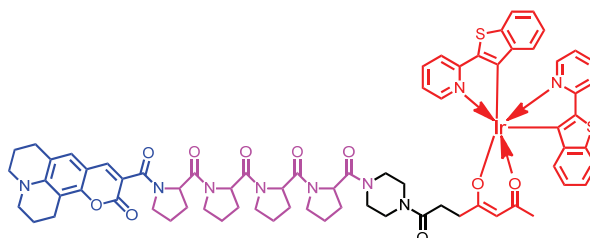


図2 C343-Pro₄-BTPの構造式

C343-Pro₄-BTP の発光スペクトルをりん脂質二分子膜存在下において測定したところ、プローブ濃度が $1\mu\text{M}$ において MeCN 中と同様に、蛍光とりん光が観測され、酸素濃度が増加するにつれて、BTP のりん光強度が顕著に減少した（図 3）。定量的な解析を行うために、酸素濃度に対してレシオ比（りん光強度 / 蛍光強度）をプロットし、Stern-Volmer 式より Stern-Volmer 定数 (K_{SV}) の決定を行った。MeCN 中および DMPC 膜中において、 K_{SV} 値はそれぞれ 0.11 mmHg^{-1} , 0.064 mmHg^{-1} であった。この値は、BTP のりん光寿命を測定して得られた K_{SV} 値と一致したことから、C343-Pro₄-BTP の発光のレシオ比から膜中においても酸素濃度を決定できることが明らかとなった。

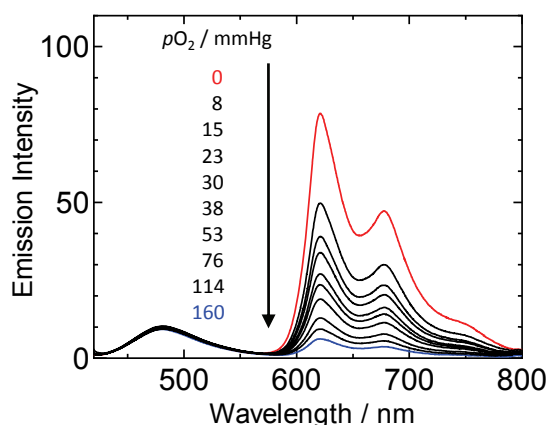


図3 りん脂質二分子膜中におけるC343-Pro₄-BTP の発光スペクトルの酸素濃度依存性

C343-Pro₄-BTP が生細胞内においても酸素プローブ分子として機能するか明らかにするために、異なる酸素濃度で培養した HeLa 細胞の培養液に C343-Pro₄-BTP 溶液を最終濃度 $2\mu\text{M}$ になるように添加した。2 時間後、りん酸緩衝液で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察を行った。20% 培養条件下において C343 に由来する蛍光が観測されたのに対して、BTP に由来するりん光はほとんど観測されなかった。これに対して、2.5%培養条件下では、C343 の蛍光と BTP のりん光が観測された。これより、C343-Pro₄-BTP は、生細胞中においても酸素プローブ分子として機能することが明らかとなった。しかしながら、プローブ分子の細胞内への取り込み量が低いため、定量的な解析は困難であり、今後、細胞移行性を高めたレシオ型酸素プローブ分子をさらに設計・開発する必要がある。

1B04

ジャイアントベシクル型人工細胞の継代的増殖を目指した基質補給条件の最適化
(東大院総合文化¹, お茶大院人間², 神奈川大学理学部³, 東大複雑系生命システム研究セ⁴)
栗原顕輔¹・菅悠美²・大倉優作¹・鈴木健太郎^{3,4}・豊田太郎^{1,4}・菅原正^{3,4}

Optimization of substrates-replenishment for recursive amplification of giant vesicle-based protocell
(Univ. of Tokyo¹, Ochanomizu Univ.², Kanagawa Univ.³, Research Center for Complex System Biology⁴)
Kensuke Kurihara¹, Yumi Kan², Yusaku Okura¹, Kentaro Suzuki^{3,4}, Taro Toyota^{1,4}, Tadashi Sugawara^{3,4}

【序】

生命の起源である原始細胞には、境界・触媒・情報の三要素が必須である[1]。脂質分子が水中で形成する中空状の分子集合体であるベシクル、水素結合認識能をもつ高分子、および基本的な有機分子を用い、それらの間に分子間力や基質選択的の化学反応性を導入することで、原始細胞モデルといえる超・分子システムを構築することは、分子科学としても挑戦的課題と思われる。我々は境界の複製系として、自己生産するジャイアントベシクル(GV, 直径 1 μm 以上)を構築した[2]。一方、情報分子の複製系としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による GV 内部での DNA 増幅系を実現している[3]。次いで 2011 年には「GV の自己生産」と「内部情報分子の複製系」という二つの要素を組みこんだ原始細胞モデルを報告した[4]。この報告では、自己生産する GV に鋳型となる DNA を封入し、DNA に対してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことで、ベシクル内部で DNA を増幅させた後、ベシクルを構成する膜分子の前駆体分子 (図 1) を外部より添加すると、増幅した DNA を含むベシクルが急速的にかつ連続的に自己生産することを示した。

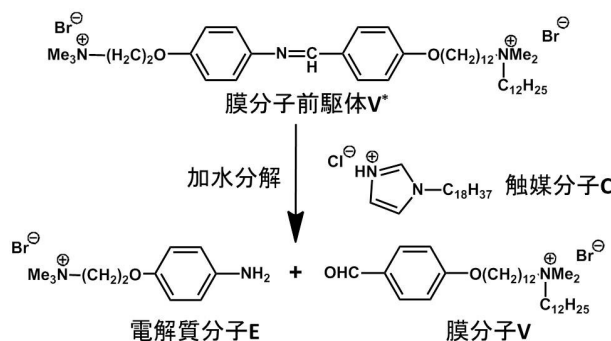


図 1. 前駆体分子 V* の加水分解反応による膜分子 V の生成

完全なる原始細胞モデルとしては、さらに継代的に増殖する原始細胞モデルが進化することが求められる。我々が構築した原始細胞モデルは一世代の増殖系であり、GV を継代するには「内部情報物質の原料補給」と「自己生産によって変化した脂質膜組成の回復」が必須である。本研究の目的は、pH 調整によって融合した GV[5]の内部で PCR により情報分子を増幅できる基質補給系の構築にある。

【実験方法と結果】

1) PCR 原料を含む GV 融合系の構築

分散液の pH に応じて極性基の電荷が異なる二種のリン脂質、ホスファチジルコリン(PC)とホス

ファチジルグリセロール(PG)、自己生産する GV の膜分子 **V**、および **V*** を加水分解する触媒 **C** を含む GV を次のように 2 種類作製した。POPC を主成分とするコンベイヤー GV として、膜組成比が POPC : **V** : **C** : コレステロール = **65 : 20 : 10 : 5** (モル比) の混合脂質を用いて GV を調製した。自己生産後の GV を仮想した POPG を主成分とするターゲット GV には、組成比が POPC : POPG : **V** : **C** : コレステロール = **15 : 60 : 10 : 10 : 5** (モル比) の混合脂質を用いた。コンベイヤーGV には PCR に必要な基質であるデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を、ターゲット GV には鋳型 DNA や dNTP 以外の PCR 原料を凍結乾燥法にて封入した。両者を混合後、1 M の塩酸を加え分散液の pH を 3 に低下させて、24 時間 23°C で静置して GV を融合させた。GV 融合後に 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えることで分散液の pH を 8 へ戻した。

2) PCR によるベシクル内 DNA の増幅

融合後のベシクルについて 94 °C(15 秒)–68°C(90 秒)のサイクルを 20 回繰り返す PCR を行った。2 本鎖 DNA を検出するために、GV 内部に予め SYBR Green I (SG)を内包しておくことで、GV 内での DNA 増幅が微分干渉/蛍光顕微鏡観測で明らかになった。図 2 は、PCR 処理前のベシクルでは、SYBR Green I (SG)に基づく蛍光は観測されなかったが、鋳型 DNA を内包したベシクルに対して PCR を行くと、GV 内で増幅した二本鎖 DNA と SG の複合体が発する蛍光を観測できたことを示している。

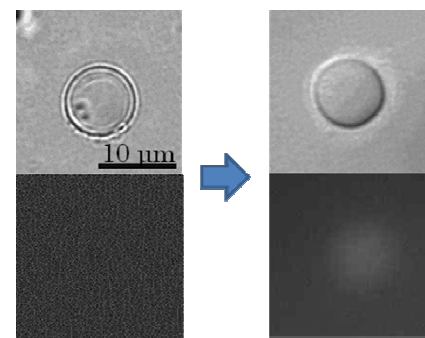


図 2 PCR 前後の写真

左 : PCR 前 右: PCR 後

3) 増幅した DNA を持つジャイアントベシクルの自己生産ダイナミクス

上記の PCR を 20 サイクル行って DNA を増幅させた GV に、前駆体 **V*** を添加して微分干渉顕微鏡で観察した連続写真を図 3 に示した。添加して 1.5 分後に肥大と分裂が起こり、最終的に 3 個へ分裂したことがわかる。さらに蛍光顕微鏡で観察したところ、分裂後の GV にも蛍光が観測されたことより、分裂した GV にも増幅した DNA が分配されていることが明らかになった。融合後の GV 内で DNA を増殖し、自己生産ダイナミクスを引き起こすことに成功したといえる。

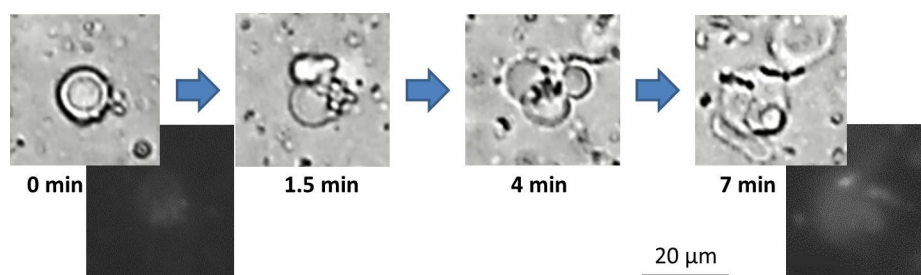


図 3. 自己生産ダイナミクス写真

【引用文献】

1. J. W. Szostak et al, *Nature* **409**, 387-390 (2001).
2. K. Takakura et al, *Langmuir* **20**, 3832-3834 (2004).
3. K. Shohda et al, *Soft Matter* **7**, 3750-3753 (2011).
4. K. Kurihara et al, *Nature Chem.* **3**, 775-581 (2011).
5. K. Suzuki et al, *Chem. Lett.* **41**, 789-791 (2012).

二次元蛍光相関分光によるシトクロム c 折れ畳み
ダイナミクスの定量的解析

(理研、田原分子分光) 乙須 拓洋、石井 邦彦、田原 太平

Quantitative analysis of folding dynamics of cytochrome c by two-dimensional
fluorescence correlation spectroscopy

(Mol. Spectrosc. Lab., RIKEN) Takuhiro Otsu, Kunihiko Ishii, and Tahei Tahara

【序】20種類のアミノ酸の組み合わせからなるポリペプチド鎖が、いかにして特有の高次構造を獲得し機能を発現するかは蛋白質科学の重要命題である。この折れ畳み機構の解明に向けて、近年では一分子計測による自発揺らぎ解析からのアプローチが盛んに行われている。一分子計測の利点は構造変化の実時間追跡が可能な点にあるが、従来の手法は十分な時間分解能、もしくは定量的解析法の欠如により、マイクロ秒から秒のオーダーで起こる複雑な蛋白質折れ畳み機構の研究には不十分であった。この点に関して最近我々が独自に開発を行った蛍光寿命相関解析法は、単一光子相関解析による高い時間分解能(〜100ns)と定量性を兼ね備えた手法であり、蛋白質折れ畳み研究に最適である^{1,2}。昨年の討論会では、本手法の蛋白質研究への初めての応用としてシトクロム c (cyt c) の酸性変性条件下での構造転移ダイナミクスの研究を行った結果について報告し、本手法の有用性と cyt c 構造揺らぎに関して得られた新たな知見について議論を行った³。本研究では昨年得られた結果をより定量的に解析すべく、二次元蛍光相関解析により検出された各蛍光寿命成分について、自己相関関数、ならびに成分間の相互相関関数を抽出する方法を考案したので、その結果について報告する。

【実験】 cyt c の C 端領域のシステイン残基(C102)に蛍光ドナーとなる Alexa546 を付与し、Alexa546-ヘム間の FRET による Alexa546 の蛍光強度、寿命の揺らぎを解析することで、cyt c の構造揺らぎを評価した。測定は自作の蛍光相関分光装置で行い、各蛍光光子の絶対到着時間 T と励起パルスからの相対遅延時間 t を記録した。蛍光相関分光法において解析される相関関数 ($G(\Delta T)$) と二次元蛍光相関解析において得られる蛍光寿命の二次元相関マップ $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ の関係は以下のように示される³。

$$G(\Delta T) = \frac{\langle I(T)I(T+\Delta T) \rangle}{\langle I(T) \rangle^2} = \frac{\iiint \tilde{M}_{cor}(\Delta T; \tau', \tau'') \exp(-t'/\tau') \exp(-t''/\tau'') d\tau' d\tau'' dt' dt''}{\iiint \tilde{M}_{uncor}(\Delta T; \tau', \tau'') \exp(-t'/\tau') \exp(-t''/\tau'') d\tau' d\tau'' dt' dt''} + 1 \quad (1)$$

同様に二次元蛍光相関解析により抽出される各蛍光寿命成分の自己相関、ならびに相互相関関数は以下のように表せる。

$$G_{ij}(\Delta T) = \frac{\langle I_i(T)I_j(T+\Delta T) \rangle}{\langle I_i(T) \rangle \langle I_j(T) \rangle} = \frac{\tilde{M}_{cor}(\Delta T; \tau_i, \tau_j)}{\tilde{M}_{uncor}(\tau_i, \tau_j)} + 1 \quad (2)$$

$i=j$: 自己相関
 $i \neq j$: 相互相関

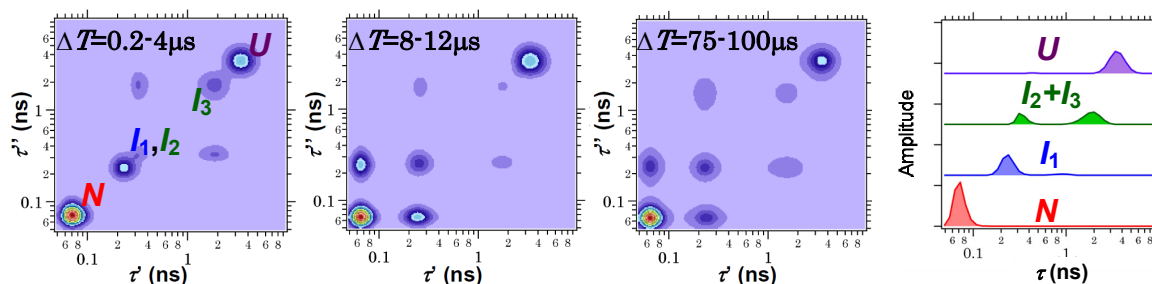


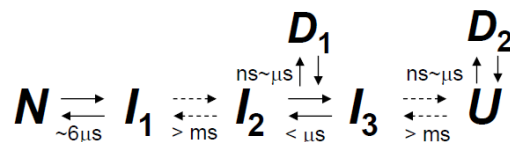
図1 異なる ΔT での $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ と $\Delta T = 0.2-4\mu\text{s}$ で検出された4つの独立蛍光寿命成分

各蛍光寿命成分の $\tilde{M}(\Delta T, \tau_i, \tau_j)$ は $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ 上の各ピークの積分値に対応する。解析においては異なる ΔT において二次元蛍光相関解析を行い、得られた $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ より各成分のピーク強度を算出、式 2 より各成分の自己相関、相互相関関数を抽出した。

【結果と考察】二次元蛍光相関解析の結果、解析を行った最も短い ΔT において 4 つの独立蛍光寿命成分が検出され、そのうちシトクロム c の天然構造状態に対応する N と変性中間体の一つに対応する I_1 は数 μs で揺らいでいることを昨年 の 討 論 会 で 報 告 し て い る (図 1)。今回はこれら 4 つの独立蛍光寿命成分の自己相関関数と数 μs での揺らぎが検出された N と I_1 間の相互相関関数を抽出、解析を行った。

図 2 には抽出した各独立成分の自己および相互相関関数と理論式によるフィッティング結果を示している。 N と I_1 については二次元蛍光相関解析でみられた数 μs での平衡過程を考慮に入れた理論式により良好にフィットすることができた(図 2a)。一方で I_2+I_3 、および U については、二次元蛍光相関解析の結果観測時間内 ($\mu\text{s} \sim \text{ms}$) での他成分との平衡過程が確認されなかったにもかかわらず、その自己相関関数は拡散項のみを含む理論式では説明できず、反応項を含む理論式によってのみ説明が可能との結果を得た(図 2b,c)。この一見矛盾する結果については、過去の研究報告を参考にした考察より、色素と芳香族アミノ酸の ground state complex による蛍光消光⁴の関与によるものと結論した。これまでに ground state complex 形成により色素の蛍光寿命は本測定装置の検出限界よりも短い寿命となることがわかっており、そのような短寿命成分は $\tilde{M}(\Delta T, \tau', \tau'')$ でピークとして検出することはできない。つまり I_2+I_3 、および U の自己相関関数における反応項は、色素—芳香族アミノ酸間の ground state complex を形成するような変性中間体(D_1 and D_2)と I_2+I_3 、および U 間での構造転移に起因する相関を表していると結論した。

以上、各独立蛍光寿命成分の自己相関、相互相関解析の結果、最終的に以下のような cyt c folding scheme が得られた。



得られた folding scheme ならびに短蛍光寿命種(D_1 and D_2) について、異なる pH 条件での実験結果を含めその妥当性について当日議論を行う。

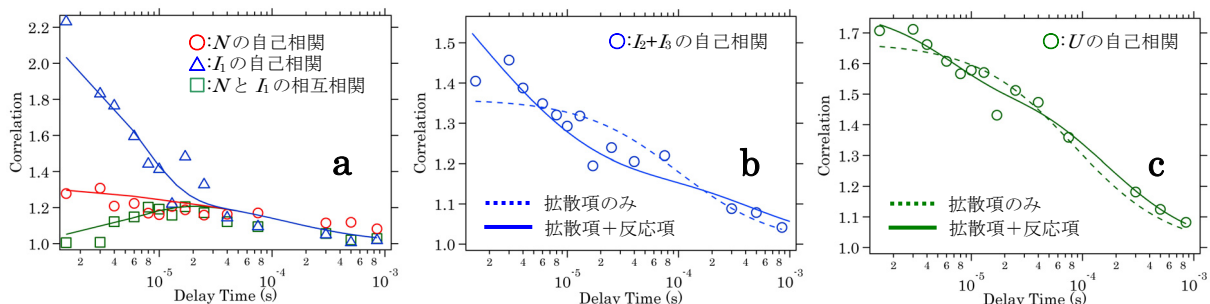


図 2 各独立蛍光寿命成分の自己および相互相関関数、ならびにフィッティング結果

【参考文献】

1. K. Ishii and T. Tahara *J. Phys. Chem. B* (2010) **114**, 12383-12391
2. K. Ishii and T. Tahara *Chem. Phys. Lett* (2012) **519-20**, 130-133
3. T. Otsu, K. Ishii and T. Tahara 第 5 回分子科学討論会 2011 札幌 1B10
4. N. Marmé et al. *Bioconjugate Chem* (2003) **14**, 1133-1139

1B06

イエロープロテイン励起状態におけるフェムト秒構造ダイナミクスの実時間追跡

(東工大院・理工¹, 理研・田原分子分光², 奈良先端大・物質創成³)

倉持光^{1,2}, 竹内佐年², 上久保裕生³, 片岡幹雄³, 田原太平²

Femtosecond Structural Dynamics of Photoactive Yellow Protein in the Excited State

(Tokyo Institute of Technology¹, RIKEN², Nara Institute of Science and Technology³)

Hikaru Kuramochi^{1,2}, Satoshi Takeuchi², Hironari Kamikubo³, Mikio Kataoka³, and Tahei Tahara²

イエロープロテイン(Photoactive Yellow Protein: PYP)は紅色光合成細菌(*Halorhodospira halophila*)の負の走行性を担う光受容タンパク質と考えられており、Cys69残基に繋がれた発色団分子p-クマル酸 (pCA:図1) のフェムト秒〜ピコ秒スケールで進行するtrans-cis光異性化がその機能を誘起するとされている[1]。すなわち、この光異性化は、その後の多くの過渡種を伴ったミリ秒に渡る光サイクルを引き起こす重要な光反応初期過程であり、PYPの機能発現機構を分子レベルで理解するために様々な側面から興味を持たれてきた。しかし実験上の困難により、これまでこの超高速初期過程における構造変化の知見は得られておらず、その包括的な理解は未だに得られていない。

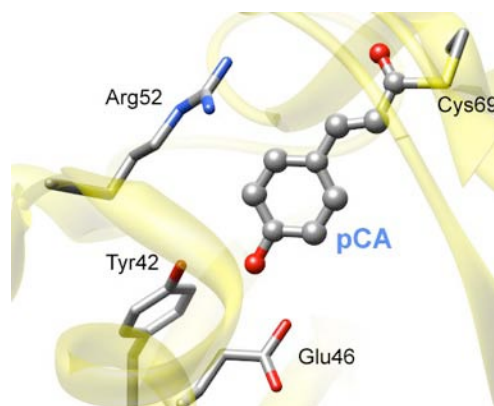


図1. PYP中におけるpCAおよび周辺アミノ酸残基の構造。

このような状況のもと、最近我々は新たにフェムト秒スケールで紫外共鳴ラマンスペクトルを得ることができる紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光法 (UV-FSRS) を開発した[2]。このUV-FSRSを用いて水溶液中におけるpCAの励起状態構造ダイナミクスを研究し、フェムト秒時間領域での過渡ラマンスペクトル形状の変化を観測することに初めて成功した[3]。そのスペクトル変化から、水溶液中ではpCAの励起状態における構造変化はC_{et}=C_e結合のねじれではなく主に分子平面内の変形である、と結論した。この結果は、pCAが励起状態でC_{et}=C_e結合まわりにねじれるという、PYPについてこれまで予想されてきた描像と大きく異なるため、実際のタンパク質環境中におけるpCAの振舞いの解明が一層興味深い課題となっていた。そこで、今回我々はUV-FSRSを用いてPYPの励起状態におけるフェムト秒構造ダイナミクスの実時間観測を行ったので、その結果について報告する。

UV-FSRSは3つの光パルスを用いて行う。まず光反応を開始させるための励起光 (Ex) により電子励起状態を生成させる。任意の遅延時間の後、励起状態の吸収に共鳴する紫外狭帯域ラマンポンプ光 (Rp) とフェムト秒白色光 (Pr) を同時に照射し、励起状態の振動をラマン利得信号として検出する。実験では光源としてチタンサファイア再生増幅器の出力(800 nm, 80 fs, 1 kHz)を用い、OPAの第3高調波 (450 nm) をEx光として、またCaF₂中で発生させたフェムト秒白色光をPr光として用いた。また紫外Rp光には狭帯域OPAの出力の第2高調波 (330 nm) を用いた。この時間分解スペクトル測定における波数分解能と遅延時間精度はそれぞれRp光の帯域幅、Ex光とPr光の相互相関幅で決まり、それぞれ約15 cm⁻¹, 100 fsであった。

図2にPYPの吸収、蛍光スペクトルと450 nmで光励起した場合に得られるフェムト秒過渡吸収スペクトルを示す。まず光励起直後には375 nmをピークとして320 nm から400 nmに幅広い励起状態吸収帯が現れる。加えて基底状態吸収のブリーチ信号、及び誘導放出信号がそれぞれ450, 500 nmを中心として

観測された。これらの信号は約0.8, 2.5, 13 psの3つの時定数で表される減衰を示した。励起後20 ps以降のスペクトルには500 nm付近にpCAがcis体である基底状態の中間体 (I_0 状態[4]) に帰属される長寿命の過渡バンドも確認できた。観測されたPYP励起状態の構造ダイナミクスを調べるために我々は、Rp光の波長が励起状態吸収のみに共鳴する条件でUV-FSRS測定を行った。励起状態吸収帯に共鳴する330 nmのRp光を用いた場合に観測されるUV-FSRSスペクトルを図3に示す。このデータから分かるように、400 cm^{-1} から1700 cm^{-1} にかけて複数の過渡ラマンバンドが観測された。これらのバンドは励起状態の消失に伴って減衰するが、その間に大きなスペクトル形状の変化は見られない。また高波数領域(1400 cm^{-1} から1700 cm^{-1})において多くのバンドが観測されており、異性化反応追跡のマーカーとなる $C_{et}=C_{et}$ 伸縮振動バンドもこの領域に含まれていることが示唆される。これらの結果は、pCAの $C_{et}=C_{et}$ 結合が励起状態においても依然として二重結合性を有しており、大きくねじれてはいないことを示している。講演では、これらのフェムト秒ラマン分光データの結果にもとづいてPYP励起状態における構造ダイナミクスについて詳細に議論する。

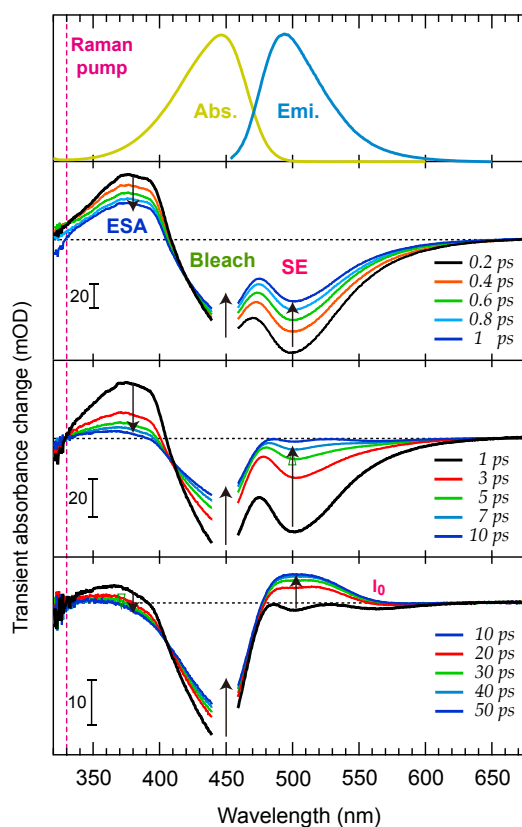


図2. PYPの定常状態吸収、蛍光スペクトル及びフェムト秒過渡吸収スペクトル。

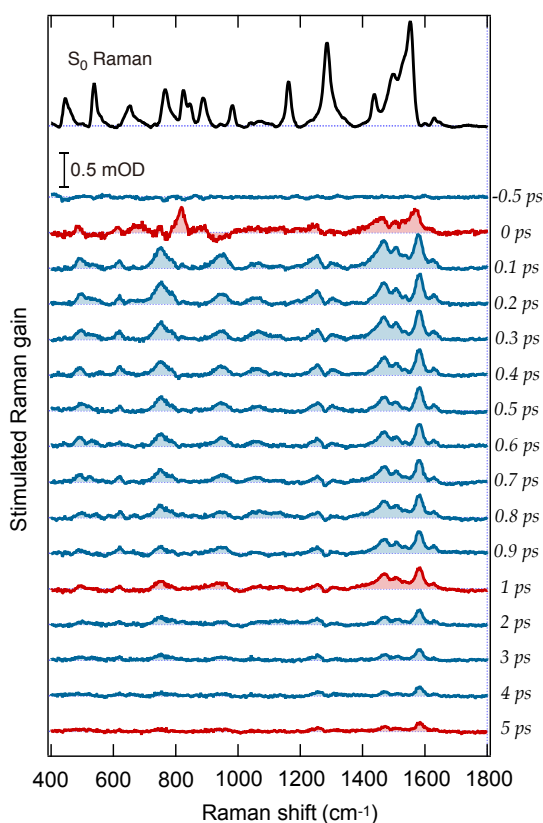


図3. UV-FSRSスペクトル($R_p=330$ nm)と基底状態のラマンスペクトル。観測はストークス側で行っている。

【参考文献】

- [1] Hellingwerf, K. J.; Hendriks, J.; Gensch, T. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 1082. [2] 竹内佐年・倉持光・田原 太平, 第5回分子科学討論会, 2011, 2P023 [3] Kuramochi, H.; Takeuchi, S.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 2025. [4] Ujj, L.; Devanathan, S.; Meyer, T. E.; Cusanovich, M. A.; Tollin, G.; Atkinson, G. H. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 406.

1B07

ガスセンサータンパク質 CooA の一酸化炭素脱離に伴う構造ダイナミクスの観測

(阪大院理¹, 岡崎総合バイオ²) 大友章裕¹, 石川春人¹, 水野操¹, 青野重利², 水谷泰久¹

Protein Dynamics of CooA upon Carbon Monoxide Dissociation

(Osaka Univ.¹, Okazaki Institute²) Akihiro Otomo¹, Haruto Ishikawa¹, Misao Mizuno¹, Shigetoshi Aono², Yasuhisa Mizutani¹

【序】CooAは光合成細菌に含まれるガスセンサータンパク質であり、一酸化炭素(CO)を感知し、COの代謝に関与する酵素群の転写を制御している。図1にCooAの、不活性形である還元形の結晶構造(a)と、反応スキーム(b)を示す。CooAは2つのサブユニットから成るホモダイマーである。各サブユニットはヘムを含み、COを感知するセンサードメインと、DNA結合ドメインで構成されている。ヘムに結合したCOが近傍のPro残基と置換することで、CooA全体の構造変化が誘起され、DNAとの親和性が変化すると考えられている。しかし、その構造変化の機構は明らかになっていない。本研究では、時間分解共鳴ラマン分光法によって、ヘム-近位ヒスチジン(His77)部位と、Cヘリックスに存在するTrp残基(Trp110)の構造変化の関連を調べた。

【実験】CooAは大腸菌中で発現し、陰イオン交換カラムを用いて精製した。この試料に還元剤としてヒドロサルファイトナトリウムを加え、CO雰囲気下にする事で、CO結合形CooA(CO-CooA)を得た。試料のバッファーには、pH 8.0の50 mM Tris-HClを用いた。紫外共鳴ラマンスペクトルの測定試料には、内部強度標準として、硫酸イオンを180 mM加えた。時間分解共鳴ラマンスペクトルの測定は、ポンププローブ法によって行った。COの光解離を引き起こすポンプ光には、波長532 nmのパルス光(パルス幅20 ns)を用いた。ヘムに由来するスペクトルの観測には波長436 nmのプローブ光(パルス幅30 ns)を用い、Trp残基のスペクトルの観測には波長233 nmのプローブ光(パルス幅20 ns)を用いた。

【結果】図2にCO-CooAの時間分解可視共鳴ラマンスペクトルを示す。図1(b)に示すように、CO-CooAの光解離後、ヘムにはCOの再結合もしくはPro残基の配位が生じる。そのため、各遅延時間におけるスペクトルは、それら再結合およびPro残基が配位した成分の寄与を引いた、差スペクトルとして示している。215 cm⁻¹に5配位のヘム由来の振動バンドである、鉄-ヒスチジン伸縮振動[v(Fe-His)]バンドが観測されたため、時間分解スペクトルは解離形CooAの寄与を示していることがわかる。この測定から、CO脱離後10 nsから1 μsの間に、v(Fe-His)バンドは波数シフトや強度変化をほとんど示さないことがわかった。過去の研究で、

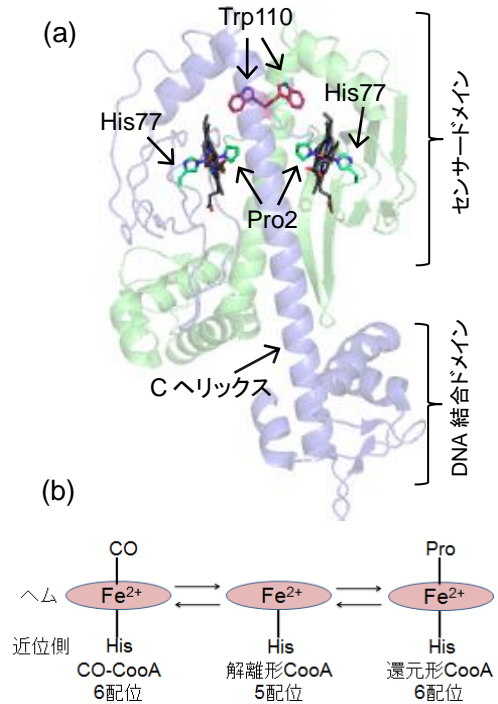


図 1. (a) 還元形 CooA の結晶構造。(b) CooA の CO 脱離に伴うヘムと軸配位子の変化。

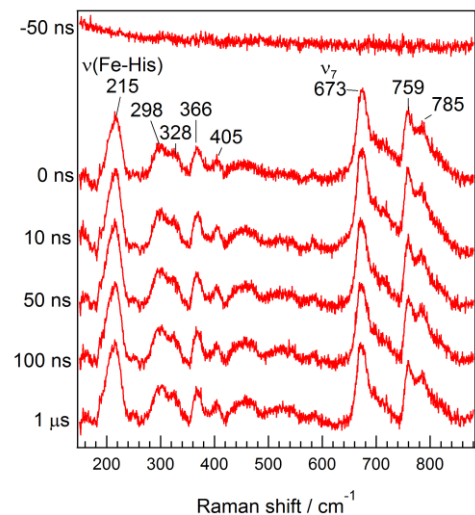


図 2. CO-CooA の時間分解可視共鳴ラマンスペクトル。解離形 CooA のスペクトルは、CO の再結合および Pro 残基の配位による寄与を差し引くことで算出した。

ピコ秒領域の時間分解共鳴ラマンスペクトルは報告されているが、COの光解離後、数百ピコ秒以内に約90%が再結合してしまうため、ナノ秒以降の解離形の構造は不明であった¹。10 nsでの $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数はピコ秒領域で観測された振動数と一致することから、CO脱離後、 $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数は1 μs に至るまで変化していないことが明らかになった。

図3に芳香族アミノ酸水溶液、CO-CooAおよび還元形CooAの紫外共鳴ラマンスペクトルを示す。(a)、(b)のスペクトルと(c)、(d)のスペクトルとの比較からわかるように、CO-CooAと還元形CooAには、Trp残基やTyr残基由来のラマンバンドが観測された。また、(e)はCO-CooAと還元形CooAの差スペクトルである。W3, W16, W18に強度増大が、Y8aバンド強度減少がみられ、CO-CooAと還元形CooAとの間では、Trp残基およびTyr残基の環境が異なることがわかる。そこで、CO-CooAと解離形CooAとの間で、Trp残基がどの時間帯で変化するのかを調べるために時間分解測定を行った。その結果を図4に示す。時間分解スペクトルでは、100 nsから100 μs の間で、Trp残基のスペクトル変化はみられず、Trp110の環境変化はこの時間領域では起きていないことがわかった。

【考察】過去の研究と合わせて、 $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数はピコ秒領域から1 μs まで変化していないことがわかった。 $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数は、ヘム周辺の構造変化を敏感に反映することが知られている。したがって、ヘム-His77部位の構造変化は、ピコ秒領域で完了し、その後1 μs に至るまで構造変化は起きないことが明らかになった。

CooAの各サブユニットにはTrp残基は1つ存在し、センサードメインとDNA結合ドメイン間のCヘリックスに位置する。過去の研究から、還元形CooAとCO-CooAでは、Trp残基のラマンバンドに変化があることがわかっており²、プローブ波長が異なる本実験でも同様の変化が再現された。したがって、CO脱離後、還元形に至る過程のどこかの段階でTrp残基周辺の構造が変化すると考えられる。この変化は、Trp110の位置から、CO脱離後ヘム周辺に起きる構造変化が、DNA結合部位まで伝播する中間状態の変化であると推測される。今回の時間分解測定において、100 μs までにTrpのバンドがみられなかったことから、Trp110近傍の構造変化は、ヘム構造がCO-CooAから解離形に変わったことによって起きているのではなく、解離形から還元形に変わったことによって起きる可能性が高いと考えられる。

【参考文献】1. Uchida, T., Ishikawa, H., Ishimori, K., Morishima, I., Nakajima, H., Aono, S., Mizutani, Y., and Kitagawa, T. (2000) *Biochemistry* **39**, 12747-12752
2. Kubo, M., Inagaki, S., Yoshioka, S., Uchida, T., Mizutani, Y., Aono, S., and Kitagawa, T. (2006) *J. Biol. Chem* **281**, 11271-11278

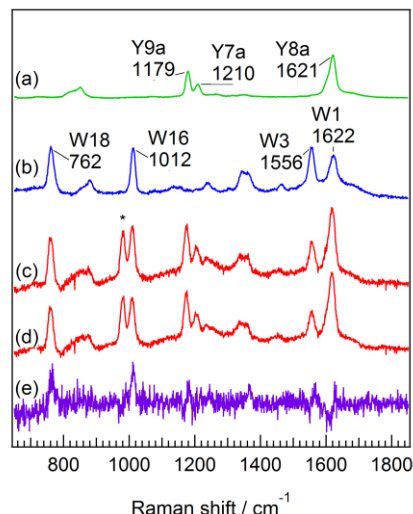


図3. 芳香族アミノ酸水溶液およびCooAの紫外共鳴ラマンスペクトル。(プローブ光233 nm, *は内部強度標準の硫酸イオンによるバンド)
(a) Tyr水溶液 (b) Trp水溶液 (c) CO-CooA (d) 還元形CooA (e) [(c)-(d)] × 5

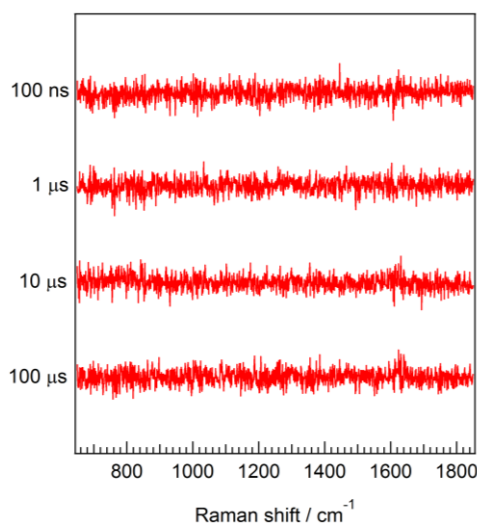


図4. CO-CooAの時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。CO-CooAと解離形CooAとの間の構造変化の寄与を示した差スペクトルである。

全長の青色光センサータンパク質 YtvA の光化学反応ダイナミクス

(京都大学¹, アムステルダム大学²) 崔 錫宇¹, 中曾根 祐介¹, Hellingwerf KJ², 寺嶋 正秀¹

The photochemical reaction dynamics of full-length of blue light sensor protein YtvA

(Kyoto Univ.¹, Amsterdam Univ.²) Seokwoo Choi¹, Yusuke Nakasone¹, Hellingwerf KJ², Masahide Terazima¹

【序】 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来の青色光センサータンパク質である YtvA (261 残基) は転写因子である σ^B の活性調節を介して環境ストレス (光、熱、塩濃度など) に対する応答を制御する [1]。その構造は光受容を担う LOV (Light-Oxygen-Voltage) ドメイン、活性部位である STAS (Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist) ドメイン、そしてこれらをつなぐ linker ドメインからなっている。これまで YtvA の機能に関する報告は多数あるものの、YtvA の光励起によるシグナル伝達過程に関してはほとんど明らかにされていない。そこで我々は分子レベルでの YtvA の光反応ダイナミクスを調べるため、主に過渡回折格子 (Transient Grating, TG) 法を用いて研究を行ってきた。我々は全長の YtvA の光反応ダイナミクスを考察する前に、機能やシグナル伝達過程において重要なドメイン単位で切り取ったサンプル YLOV (LOV ドメインのみからなるサンプル) と YLOV-linker (LOV ドメインにヘリックスである linker ドメインが付随しているサンプル) それぞれの光反応ダイナミクスを明らかにした。YLOV の場合、基底状態でテトラマーとダイマーの平衡が存在し、光励起によりテトラマーは解離反応を起こし、ダイマーは会合反応を起こすことが分かった。また、YLOV-linker では、基底状態で多量体とダイマーの平衡が存在し、光励起により多量体は吸収スペクトル変化のみを起こし、ダイマーは吸収変化に加え体積変化を伴う構造変化を起こすことが分かっている。今回の発表では、STAS ドメインまで含む全長 YtvA の光反応ダイナミクスについての結果を報告し、これまでに報告した YLOV と YLOV-linker の結果と比較・検討する。

そこで我々は分子レベルでの YtvA の光反応ダイナミクスを調べるため、主に過渡回折格子 (Transient Grating, TG) 法を用いて研究を行ってきた。

我々は全長の YtvA の光反応ダイナミクスを考察する前に、機能やシグナル伝達過程において重要なドメイン単位で切り取ったサンプル YLOV (LOV ドメインのみからなるサンプル) と YLOV-linker (LOV ドメインにヘリックスである linker ドメインが付随しているサンプル) それぞれの光反応ダイナミクスを明らかにした。YLOV の場合、基底状態でテトラマーとダイマーの平衡が存在し、光励起によりテトラマーは解離反応を起こし、ダイマーは会合反応を起こすことが分かった。また、YLOV-linker では、基底状態で多量体とダイマーの平衡が存在し、光励起により多量体は吸収スペクトル変化のみを起こし、ダイマーは吸収変化に加え体積変化を伴う構造変化を起こすことが分かっている。今回の発表では、STAS ドメインまで含む全長 YtvA の光反応ダイナミクスについての結果を報告し、これまでに報告した YLOV と YLOV-linker の結果と比較・検討する。

【実験】 YtvA の光反応ダイナミクスを調べる上で、主に TG 法を用いて測定を行った。図 2 のように、TG 法では 2 本の励起光を交差させることでサンプル溶液中に干渉縞を作り、光強度の強い領域で空間特異的にタンパク質分子を励起する。その結果、励起分子の反応に伴い溶液の屈折率が変化し、過渡的な回折格子が形成される。そして probe 光を Bragg 条件を満たすように入射することで回折光が得られ、その時間変化を解析することにより、励起分子の反応過程、拡散過程、始状態からのエンタルピー変化 (ΔH) や体積変化 (ΔV) などを評価することができる。

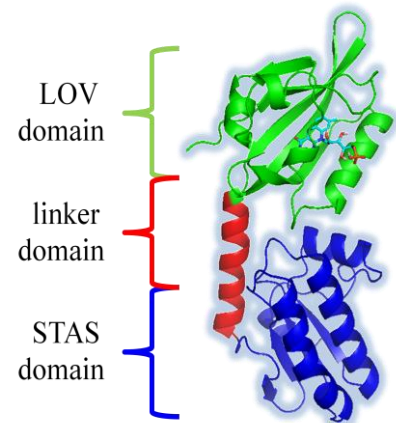


図 1 YtvA の立体構造

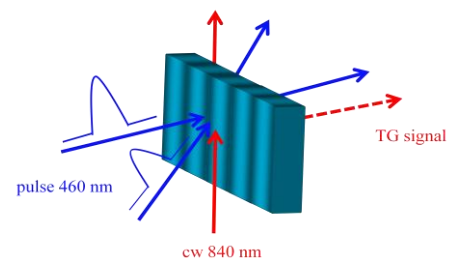


図 2 TG 法の原理

その結果、励起分子の反応に伴い溶液の屈折率が変化し、過渡的な回折格子が形成される。そして probe 光を Bragg 条件を満たすように入射することで回折光が得られ、その時間変化を解析することにより、励起分子の反応過程、拡散過程、始状態からのエンタルピー変化 (ΔH) や体積変化 (ΔV) などを評価することができる。

【結果と考察】 図3に YtvA の TG 信号(700 μM , 20 $^{\circ}\text{C}$)を示す。早い時間スケールから順に発色団近傍の構造変化(発色団と Cys 残基の共有結合形成)、熱拡散信号、そして分子拡散由来の信号が観測された。分子拡散信号は立ち上がり成分と減衰成分からなり、屈折率変化の符号から立ち上がりが反応物の拡散、減衰が生成物の拡散によるものであることがわかった。詳しい解析により、反応物・生成物の拡散係数の値はそれぞれ $D_{\text{Reactant}} = 6.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ と $D_{\text{Product}} = 5.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ であると見積もられた。拡散係数と分子のサイズには相関があり、反応物の拡散係数の値から YtvA は基底状態でダイマーとして存在することが示唆され、これは NMR を用いた先行研究の結果とも一致する[2]。また、拡散係数変化の度合いから、光励起により YtvA の会合状態は変わっていないことが予想され、観測された拡散係数変化は YtvA 分子の構造変化に起因すると考えられる。X線小角散乱測定によると、照射により LOVドメインと STASドメイン間の相対的な角度が回転する様子が報告されているため[3]、本研究で捉えた拡散係数変化はこの反応に由来するものであると解釈している。YLOV-linker ではより大きな拡散係数変化 ($D_{\text{Reactant}} = 7.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ と $D_{\text{Product}} = 6.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) が観測されており、これは linker 部分の構造変化に帰属しているが、STASドメインが存在することにより linker 領域の自由度が減少し、その構造変化も抑えられたのではないかと考えている。

YtvA の会合状態については別の手法としてゲルろ過クロマトグラフィーを用いて検証を行った(図4)。その結果、基底状態で YtvA はダイマーとして存在し、さらに光を照射しても分子量の変化は観測されなかった。したがって YtvA は暗状態・明状態に関わらずダイマーとして存在することを確認した。この会合状態に関する結果は、YLOV や YLOV-linker で得られた結果とは異なる。つまり YLOV や YLOV-linker では会合状態の変化が顕著であったが、全長 YtvA では比較的安定にダイマーとして存在しており STASドメインの存在が分子間相互作用にも影響を与えていることが分かる。これらの結果からもドメイン間の相互作用がタンパク質の性質を決める上で重要な役割を持ち、linkerドメインを介して起こる LOVドメインと STASドメインの相対的な動きが信号伝達に重要であろうと推察される。現在、YLOV や YLOV-linker で観測された塩濃度依存性や温度依存性についても全長タンパク質を用いて検証を行っており、様々な環境ストレスに対する応答を分子レベルで明らかにしつつある。本討論会ではこれまで得られた結果をまとめて YtvA がストレス情報をどのように受け取り伝達しているのかについて議論する予定である。

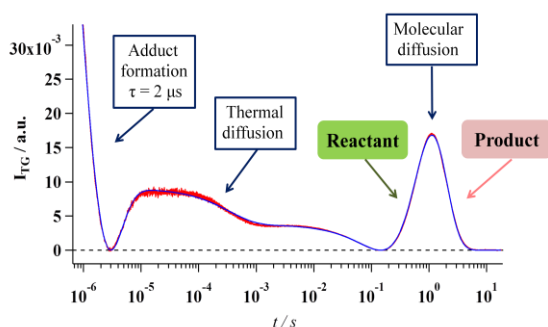


図3 YtvA の TG 信号(700 μM , 20 $^{\circ}\text{C}$)

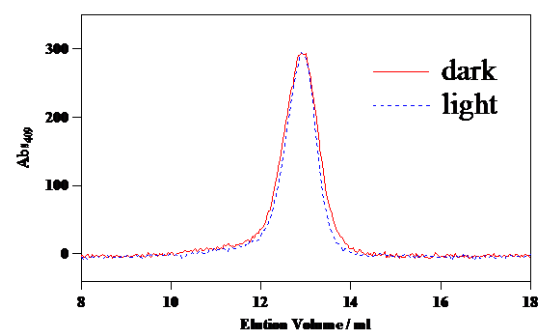


図4 YtvA のゲルろ過クロマトグラフィー

- Reference [1] Samina Akbar et al. *J. BACTERIOL.*, 2001, 183, 1329-1338
 [2] Marcel Jurk et al. *J. Mol. Biol.*, 2010, 403, 78-87
 [3] Marcel Jurk et al. *Biochemistry*, 2011, 50, 8163-8171

1B09

BLUF タンパク質 TePixD と SyPixD における中間体揺らぎと光反応の関係

(京大院理¹、東大院²、大阪府立大院³) 黒井邦巧¹、田中啓介¹、木村佳文¹

岡島公司^{2,3}、池内昌彦²、徳富哲³、寺嶋正秀¹

Correlation between the intermediate fluctuation and the photoreaction of BLUF proteins TePixD and SyPixD

(Kyoto Univ.¹, Tokyo Univ.², Osaka Prefecture Univ.³) Kunisato Kuroi¹, Keisuke Tanaka¹, Yoshifumi Kimura¹,

Koji Okajima^{2,3}, Masahiko Ikeuchi², Satoru Tokutomi³, Masahide Terazima¹

【序】近年、生体反応におけるタンパク質の構造揺らぎの重要性が指摘されているが、検出手法がなかったために、過渡的中間体が持つ揺らぎに関してはほとんど何も知られていない。我々は高圧下での時間分解過渡回折格子法 (TG法) を用いて、反応体積変化を種々の圧力で測定し、体積揺らぎと直接関係する圧縮率を時間分解で測定することにより、中間体の揺らぎを検出しようと試みている。

本研究では、まず TePixD と呼ばれる青色光センサータンパク質の構造揺らぎを時間分解で調べ、揺らぎが機能に直接関係することを見出したので報告する。

TePixD の反応はTG法を用いた先行研究により詳しく調べられている[1]。このタンパク質は暗状態では 10 量体と 5 量体の平衡にあり、10 量体のみが光励起によって大きな構造変化を起こすことが知られている。図 1 は現在提案されている TePixD の反応スキームを示したものである。10 量体の光励起によって中間体 I₁ と I₂ を経由して大きな拡散係数変化を示す反応が進行する。以前に、これらの中間体が持つ体積変化の大きさを高圧下で測定することで、基底状態からの差として揺らぎの大きさを検出することに我々は成功している。(図 2)

更に興味深いことに、この 10 量体が起こす構造変化には励起光強度依存性があり、光強度が弱く 10 量体のうちのモノマーユニット 1 つが励起されると構造変化を引き起こすが、励起光強度が強くとモノマー 2 つが励起されるような条件では構造変化が抑制されることが分かっている[2]。このように光強度によって反応を起こしたり起こさなかったりする事実を用いれば、反応に直結する中間体の揺らぎをより明確に示すことができると考えられる。本研究では励起光強度が中間体の体積揺らぎに及ぼす影響を調べ、中間体揺らぎと生体機能の関連を示唆する結果を初めて得ることができた。

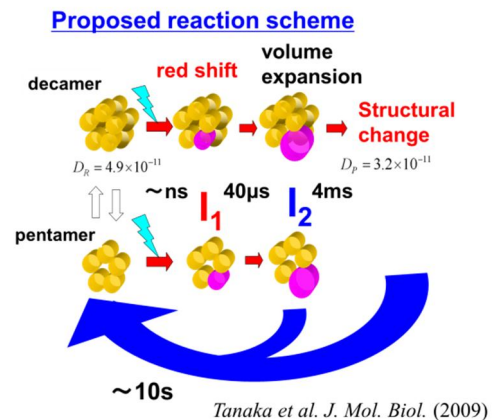


図 1 TePixD の光反応スキーム

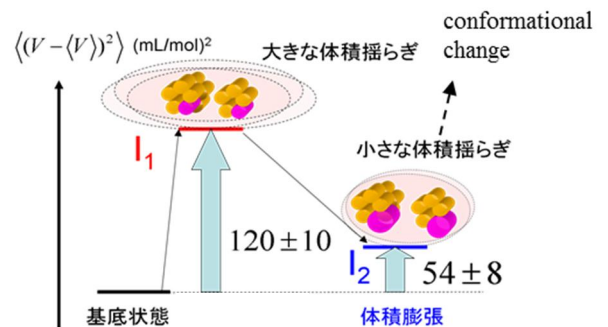


図 2 2つの中間体 I₁、I₂ が持つ体積揺らぎの大きさ (基底状態からの差として計算)

【実験】 試料溶液を耐圧光学セル内で圧力を0.1 MPaから200 MPaまで変えながらTG信号を測定した。信号強度から反応体積を求め、その圧力依存性より圧縮率を求め、体積揺らぎを計算した。今回はNDフィルターを用いて光強度を調節し、さまざまな光強度条件下で中間体の体積揺らぎを検出した。TG信号の測定は試料の励起パルス光に波長450 nmの色素レーザーを用い、連続プローブ光として波長840 nmのダイオードレーザーを用いた。

【結果と考察】

図3は励起光強度が 9.5 mJ/cm^2 のときにおけるTePixDのTG信号を種々の圧力下で測定した結果を示している。この時間領域におけるTG信号は反応スキーム内の中間体 I_1 から I_2 へ変化する過程を示しており、この信号強度の圧力依存性から中間体 I_1 と I_2 の体積揺らぎを得ることができる。このような測定をいくつかの励起光強度において行い、各励起光強度における体積揺らぎを計算して図4のような結果を得た。ここで中間体の体積揺らぎは図2と同様に基底状態からの差として示してある。中間体 I_1 、 I_2 双方において観測される体積揺らぎは、明らかに励起光強度とともに減少することが分かった。各励起光強度における2個励起された種と1個励起された種の比率はTG信号のうちの分子拡散信号部分から求めることができるので、図4の結果からさらに1つ励起された分子と2つ励起された分子で I_1 中間体と I_2 中間体が持つ体積揺らぎを計算することができる。その結果、モノマー2つが励起されたものと1つが励起されたものを比較すると、2つ励起された種では体積揺らぎが大きく減少することが両方の中間体において分かった。モノマー2つが励起された種では構造変化が抑制されることを考えれば、この結果は中間体の揺らぎが反応の駆動力として重要であることを示唆している。本研究から得られた結果は、中間体の構造揺らぎとタンパク質反応の密接な関係を示している。

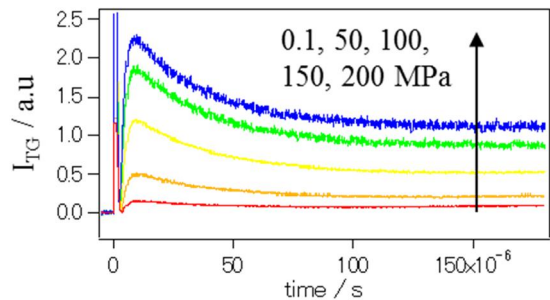


図3 各圧力におけるTePixDの体積変化過程のTG信号 (励起光強度 9.5 mJ/cm^2)

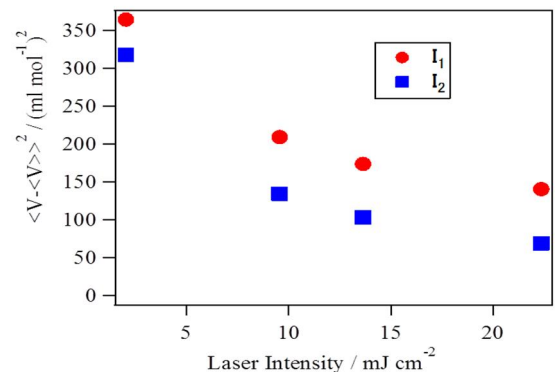


図4 TG信号より求まる各励起光強度における I_1 と I_2 が持つ見かけの体積揺らぎの値。観測される値は1個励起された種と2個励起された種の寄与が混在している。

シアノバクテリアにはTePixDの相同タンパク質としてSyPixDが存在することが知られている。我々は現在TePixDにおいて見出された結果をさらに確かめるべく相同タンパク質であるSyPixDに対しても同様の研究を行っている。SyPixDもTePixDと同様に特有の10量体構造を形成することが知られているが、TePixDの場合とは励起光強度に対する挙動が異なる。SyPixDはTePixDの場合とは逆にモノマー2つが励起されるような強い励起光条件でのみ光解離反応を起こすことが知られている[3]。したがってこのような系で、中間体揺らぎの大きさと光強度の関係がTePixDにおいて観測されたそれと逆の挙動であることを示せば中間体揺らぎの重要性の提起につながると期待できる。本討論会ではこれら相同タンパク質の中間体揺らぎを比較することでPixDの光反応と揺らぎの関係を議論する。

【引用文献】

1,2,3. Tanaka et al (2009, 2011, 2011)