

## 2P077

### 時間分解アンチストークス共鳴ラマン分光法によるタンパク質内振動エネルギー伝達の距離依存性の観測

(阪大院理)○宮本光紘, 水野操, 石川春人, 水谷泰久

### Observation of distance dependence of vibrational energy transfer in proteins by time-resolved anti-Stokes resonance Raman spectroscopy

(Osaka Univ.)○Mitsuhiro Miyamoto, Misao Mizuno, Haruto Ishikawa, Yasuhisa Mizutani

【序】分子間のエネルギー伝達は、化学の基礎的過程として重要である。その機構を解明するためには、エネルギー供与体と受容体の相対位置を規定してエネルギー伝達量や速度を観測する。しかし液相においては両者の相対位置を制御することは難しい。そこで我々はヘムタンパク質を利用して、エネルギー供与体と受容体の相互位置を制御した系をつくり、エネルギー伝達過程に関する研究を行ってきた[1, 2]。ヘムを光励起すると無輻射遷移によって余剰エネルギーが生じ、その後余剰エネルギーは周囲のタンパク質部分へ散逸する。その散逸過程は、紫外光を用いた芳香族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から調べることができる。アンチストークスラマン散乱光は振動励起状態からのみ発生し、その強度は分子が持つ余剰エネルギーの大きさを反映するからである。したがって、アミノ酸残基のアンチストークスラマンバンド強度の時間変化から、ヘムから特定の位置にある残基に伝わるエネルギー量や速度を求めることができる。我々はミオグロビンのエネルギー散逸過程の観測に成功し、この手法の有用性を示した[2]。

本研究では、チトクロム  $b_{562}$  (Cyt  $b_{562}$ , 図1) におけるエネルギー伝達を調べた。Cyt  $b_{562}$  は、ヘムが4本の $\alpha$ ヘリックスに囲まれた単純な立体構造をもつ。この構造を利用し、 $\alpha$ ヘリックスの1ターン単位で Trp 残基の位置をずらした三種類の変異体を作製し、エネルギー伝達の量や速度の距離依存性を系統的に調べた。また、野生型の Cyt  $b_{562}$  は Trp 残基を持たない。そのため、任意の位置に Trp 残基を導入することで、立体構造を大きく変えることなく Trp 一残基のみの変異体を作製できる利点を持つ。

【実験】ヘムから距離が異なる位置に Trp 残基を持つ三種類の変異体 (ヘムに近いものから R98W、L14W、および I17W) を作製した。ヘムの鉄原子から各残基の $\beta$ 炭素までの距離は、それぞれ5.2、10.9、および16.2 Åである。時間分解測定は、再生増幅したチタンサファイアレーザーにより得られたパルス光を用い、波長変換により、405 nm のポンプパルスと230 nm のプローブパルスを得ることで、ポンプ-プローブ法(相互相関時間3.8 ps)により行った。

【結果】図2に Cyt  $b_{562}$  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示す。左は R98W 変異体、右は L14W 変異体のスペクトルである。青色のスペクトルはプローブ光のみを照射して得られるスペクトルで、赤色のスペクトルは各遅延時間におけるポンプ光照射による強度増加分を表したスペクトルである。763  $\text{cm}^{-1}$  と1010  $\text{cm}^{-1}$  のバンドはそれぞれ Trp 残基由来の W18 バンド、W16 バンドである。これらはヘムの光励起に伴いバンド強度が増

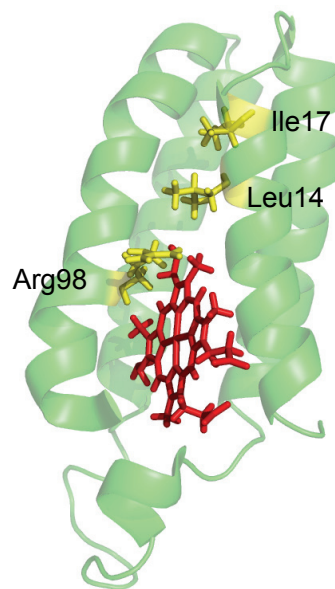


図1. Cyt  $b_{562}$  の立体構造。ヘムを赤色、Trp 残基を導入する前のアミノ酸残基(Arg98, Leu14, Ile17)をそれぞれ黄色で示している。(PDB, 1QPU)

大し、その後減衰した。バンド強度の増加は Trp 残基へのエネルギーの流入、バンド強度の減少は Trp 残基からのエネルギーの流出に対応している。バンド強度変化の大きさは、Trp の位置がへムに近い R98W 変異体の方が大きかった。図 3 に R98W および L14W 変異体の W18 バンドおよび W16 バンド強度の時間変化を比較したものを示す。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。W18 バンド強度の増加と減少の時定数は、R98W 変異体では 2.9, 4.7 ps と、L14W 変異体では 6.0, 6.3 ps と求められた。また W16 バンドの強度増減の時定数は、R98W 変異体では 4.0, 4.3 ps、L14W 変異体では 5.9, 6.4 ps であった。I17W 変異体のスペクトルでも、W18 および W16 バンドで強度変化は観測されたが、R98W や L14W のそれに比べて弱かった。

【考察】 アンチストークスバンド強度は、Trp 残基の位置がへムに近い R98W 変異体で最も大きく、L14W、I17W 変異体の順で小さくなった。これは、エネルギー源のへムに近いほど、残基あたりのエネルギー伝達量が大きいことを意味する。また、L14W 変異体のバンド強度の増加速度は、R98W 変異体のそれに比べ、W16、W18 バンドともに遅かった。これは、へムからの距離が離れていることによって、エネルギー伝達により長い時間がかかるためであると考えられる。今後、三種類の変異体についてデータの質を向上させることによって、エネルギー伝達機構についてより詳しい考察を行う予定である。また、ミオグロビンにおいては、バンド強度の増加と減少の時定数は、へムから 6.2 Å 離れた残基について 3.0, 9.6 ps、11.8 Å 離れた残基について 4.0, 19.2 ps と求められている[2]。距離が近いもの同士で、ミオグロビンと Cyt  $b_{562}$  の時定数を比較すると、増加の時定数は近いが、減少の時定数は Cyt  $b_{562}$  の方が半分程度に小さい。この違いはエネルギー流出が残基周囲の環境に依存することを反映し、興味深い。

【参考文献】

- [1] N. Fujii, M. Mizuno and Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. B.* **115**, 13057-13064 (2011);  
 [2] 藤井, 水野, 石川, 水谷 第 5 回分子科学討論会, 4D19 (2011).

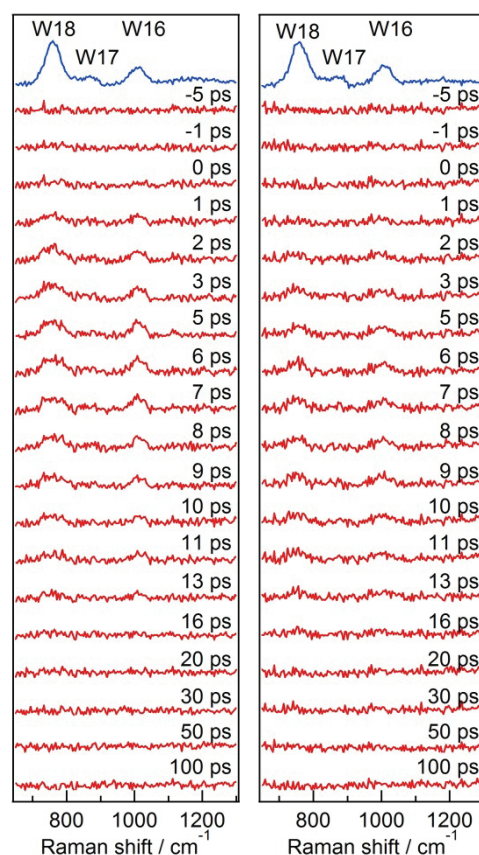


図 2. 変異体 Cyt  $b_{562}$  の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトル。

(左) R98W 変異体、(右) L14W 変異体。

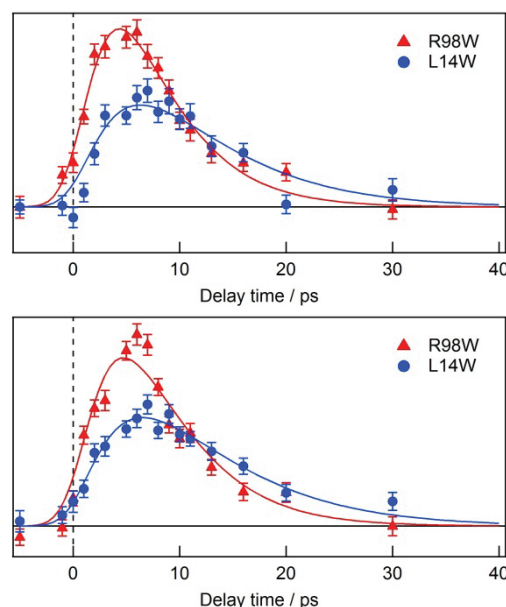


図 3. R98W および L14W 変異体のバンド強度変化の比較。

(上) W18 バンド、(下) W16 バンド。