

## タンパク質内エネルギー散逸のラマン時空間マッピング

(阪大院・理) ○水谷 泰久

## Raman Temporal Mapping of Energy Flow in Proteins

(Graduate School of Science, Osaka University) ○Yasuhisa Mizutani

巨視的には、エネルギーの散逸はフーリエの熱伝導の法則で記述される。では、系の空間スケールを原子の大きさまで小さくするとエネルギー散逸はどのようにみえるのだろうか。そんな素朴な疑問からわれわれの研究はスタートした。本講演では、その研究成果を紹介したい。

原子の空間スケールでエネルギー散逸過程を観測するためには、熱源となる分子（以後、ヒーター分子とよぶ）を用意し、周囲の溶媒分子へのエネルギー移動を実時間観測すればよい。しかし、実際にそれを行うには二つの難しさがある。ひとつは同種の溶媒分子を区別して個々に観測することは極めて困難であるということである。そこで、溶媒分子ではなく、熱エネルギーの伝導を観測するための分子（以後、プローブ分子とよぶ）を用意し、それへのエネルギー移動を観測する。もうひとつの問題は、液相中においては拡散によってヒーター分子とプローブ分子の相対位置が時々刻々変化してしまうということである。そのため、ヒーター分子とプローブ分子との距離を制御することが必要である。したがって、実験のデザインとしては、一分子だけに過剰なエネルギーをもたせた状態をどのように生成するか、分子単位で過渡的なエネルギーをどのように計測するか、そして、ヒーター分子とプローブ分子との距離をどのように制御するかが鍵となる。そのためにわれわれは、水中で三次元構造を安定に保持しているヘムタンパク質を利用した。

ヘムタンパク質は、ヘム（鉄ポルフィリン錯体の一種）を補欠分子族としてもつタンパク質の総称である。ヘムは可視領域に強い吸収帯をもち、速い無輻射遷移を起こすために、光励起後ピコ秒以内に吸収した光子エネルギーは振動エネルギーに変換される<sup>1-2</sup>。すなわち、ヘムは非常に効率的なヒーター分子として働く。一方、プローブ分子にはトリプトファン (Trp) 残基を利用した。Trp 残基がもつ過渡的なエネルギーを計測するために、そのアンチストークスバンド強度を利用した。220-230 nm の紫外光を用いると Trp 残基の共鳴ラマンバンドが共鳴増大する<sup>3-4</sup>。タンパク質は水中で安定な立体構造を保持するので、Trp 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で、ヒーター分子（ヘム）とプローブ分子 (Trp 残基) の相対位置を規定してエネルギー散逸過程を観測することができる。また、人工変異体を用いることによって、タンパク質中で望みの位置に Trp 残基を導入することができる。これらはタンパク質を用いることの大きなアドバンテージである。このようにしてわれわれは、共鳴効果によってタンパク質の局所的な情報が選択的に得られる、およびアンチストークスラマンバンド強度からエネルギー分布に関する情報が得られる、というラマン分光法の特徴を最大限に活かして、タンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピングに挑んだ。

まずわれわれは、考案した手法によってアミノ酸残基の振動励起状態が観測できるかのテスト測定として、ヘムタンパク質のひとつであるチトクロム *c* を用いた実験を行った。チトクロム *c* を選んだ理由は、Trp 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ためである。酸化形チトクロム *c* 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では、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ヘムから Trp 残基への振動エネルギーの流入に、バンド強度の減少は Trp 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。このようにわれわれは、エネルギーが

タンパク質分子内を散逸する様子を、位置を指定して観測することに初めて成功し、本手法の有用性を実証した<sup>5</sup>。

そこで次に、上述の実験の発展形として、Trp 残基の位置が異なる変異体の比較から、エネルギー散逸の距離依存性を調べた。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の変異体を用いた。ヘムから同じ方向で、かつ距離の異なった位置に Trp を導入した変異体 3 種を作製し、ヘムからのエネルギー散逸について、距離依存性を調べた<sup>6</sup>。これらの変異体では大腸菌中での発現量が大きく落ちたため、当初変異体試料の作成には苦労したものの、プラスミド、精製法を改良することで収量を大幅に改善し、測定に必要なタンパク質試料を得ることができた。760 cm<sup>-1</sup>にみられる W18 バンド強度の時間変化を調べたところ、バンド強度の増加と減少の時定数は、ヘム-Trp 距離が 6.8 Å の変異体では 3.0 ps と 9.6 ps、ヘム-Trp 距離が 12.4 Å の変異体では 4.0 ps と 19.2 ps と求められた。また、アンチストークス強度はヘム-Trp 距離が長くなるにつれて弱くなることがわかった。これらの結果は、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、および余剰エネルギー量が低下するという熱拡散の考え方と矛盾しない。しかし、熱拡散方程式より求められた温度分布をもとにアンチストークス強度を計算すると、3 種類の変異体の実測バンド強度は同一のパラメーターでは表現できなかった。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搬を考える際、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。

ミオグロビンは、安定性が高い、考察するうえで基礎データがそろっているなど、エネルギー散逸を研究するうえで有利な点をもっている。しかし、主鎖の構造が複雑で、Trp 残基の位置を系統的に変えることが難しい。そこで、4 本の  $\alpha$  ヘリックスからなるシンプルな主鎖構造 (4 ヘリックスバンドル) をもつチトクロム  $b_{562}$  を用いて、エネルギー散逸の距離依存性を調べた。この主鎖構造を利用すると、 $\alpha$  ヘリックスに沿って Trp 残基の位置を 1 ターンずつずらすことによって、ヘム-Trp 距離を系統的に変えることができる。そこで、そのような 3 種の変異体について、アンチストークススペクトルを測定したところ、ヘム-Trp 距離が長くなるにつれてアンチストークス強度は弱くなり、強度の立ち上がりが遅くなることがわかった。ミオグロビンと比較するとチトクロム  $b_{562}$  の距離依存性は緩やかで、これは Trp 残基の位置を  $\alpha$  ヘリックスに沿って等間隔で変化させているためであると考えられる。

ラマン分光法の特徴を活かすことによって、タンパク質分子内のエネルギーの流れを残基サイズの空間分解能で研究する道を切り開くことができた。タンパク質内のエネルギー散逸は、タンパク質における化学反応を考えるうえでも基礎的で重要な過程である。ここで述べた手法を、異なる構造モチーフをもつタンパク質に系統的に適用していくことによって、原子の空間スケールでのエネルギー散逸機構を明らかにしたいと考えている。

謝辞 ここて述べた研究成果は、大学院生の藤井直樹君、宮本光紘君、水野操博士、石川春人博士との共同研究の成果である。

#### 参考文献

- (1) J. R. Andrews and R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 3110-3114.
- (2) P. M. Champion and R. Lange, *J. Chem. Phys.* **1980**, 73, 5947-5957.
- (3) I. Harada and H. Takeuchi, Raman and Ultraviolet Resonance Raman Spectra of Proteins and Related Compounds. In *Spectroscopy of Biological Systems*, Clark, R. J. H., Hester, R. E., Eds. John Wiley & Sons: Chichester, **1986**, pp 113-175.
- (4) T. Kitagawa and S. Hirota, Raman Spectroscopy of Proteins. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Chalmers, J. M., Griffiths, P. R., Eds. John Wiley & Sons: Chichester, **2002**, Vol. 5, pp 3426-3446.
- (5) N. Fujii, M. Mizuno and Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 13057-13064.
- (6) N. Fujii, M. Mizuno, H. Ishikawa and Y. Mizutani, submitted for publication.