

## タンパク質における振動エネルギーの移動経路

阪大院理

○山下聡, 水野操, 近藤正人, 水谷泰久

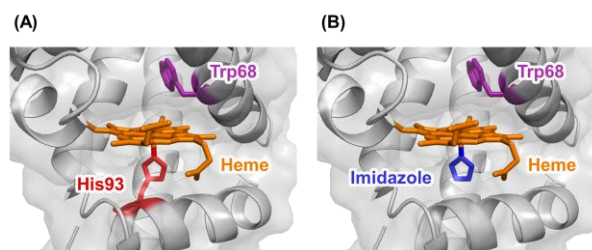
### Pathway of vibrational energy transfer in proteins

○Satoshi Yamashita, Misao Mizuno, Masato Kondoh, and Yasuhisa Mizutani

Graduate School of Science, Osaka University, Japan

**【Abstract】** Mechanism of vibrational energy transfer in proteins is important for understanding protein functions. We have investigated the energy transfer in hemeproteins by observing changes in anti-Stokes Raman intensities of a tryptophan residue in the vicinity of heme. Recently, it was found that atomic contacts in proteins are important pathway for the energy transfer. In this study, we investigated the effect of a covalent bond on energy transfer in proteins. First, we prepared two myoglobin samples; one is a mutant (V68W) in which a tryptophan residue is introduced into a heme binding pocket to probe the energy transfer from heme in the protein, and the other is a double mutant (V68W/H93G, added imidazole) in which the covalent bond between heme and a polypeptide chain is removed. We measured picosecond anti-Stokes UV resonance Raman spectra of these two myoglobin samples. Temporal changes in anti-Stokes Raman intensities of the tryptophan bands showed no significant difference between the two proteins, indicating that vibrational energy is transferred mainly through atomic contacts.

**【序】** タンパク質内の振動エネルギー移動の理解は、タンパク質機能を理解するために重要である。そして、エネルギー移動機構の解明にはその直接的な観測が不可欠である。これまで我々は、ヘムタンパク質を用いて、ヒーターとなるヘムの光励起で発生した余剰エネルギーが移動する過程を、ピコ秒時間分解紫外共鳴アンチストークスラマン分光法によって研究してきた[1-3]。紫外光を用いると、プローブとなるタンパク質内の芳香族アミノ酸残基に対して選択的に共鳴ラマンスペクトルが得られる。アンチストークスラマン散乱光の強度は振動励起状態の分子の分布数に比例するため、その強度から余剰エネルギーの大きさを見積もることができる。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で、特定の残基へのエネルギーの流入・流出を観測することができる。我々の先行研究において、タンパク質内のエネルギー移動では、ファンデルワールス接触を通してエネルギーが移動することが示唆された[3]。そこで本研究では、タンパク質内エネルギー移動における共有結合の効果を実験的に調べるために、プローブ分子であるトリプトファン残基を導入し、ヒーター分子であるヘムとポリペプチド鎖の間の共有結合を切断した変異体を作製した。通常ミオグロビンでは、ヘムとポリペプチド鎖がヒスチジン残基によって共有結合している。このヒスチジンをヘムと共有結合しないグリシンに変異させることで、ヘムとポリペ



**Fig.1.** Schematic views for Mb mutants of V68W and V68W/H93G imidazole complex. Polypeptide chains are shown as gray. Heme, Trp68 (W68), His93 (H93), and imidazole are orange, purple, red, and blue sticks, respectively.

プチド鎖間の共有結合をなくした。さらに、共有結合をなくしたミオグロビンに対して、ヒスチジンと類似の構造をもつイミダゾールを1分子配位させた (Fig.1)。そして、共有結合の有無に対するヘム近傍のトリプトファン残基へのエネルギー移動の影響を明らかにした。

**【実験】** 可視共鳴ラマンスペクトルは、波長 405 nm の連続光をプローブ光に用いて測定した。時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルの測定では、プローブ光として 230 nm、ポンプ光として 405 nm の光を用いた。遅延時間は -5 ps から 30 ps まで変化させた。ヘムとポリペプチド鎖間に共有結合を持つタンパク質試料 (V68W) と共有結合をなくしたタンパク質試料 (V68W/H93G (Im)) それぞれに対して、ヘム近傍に変異導入したトリプトファン残基の振動エネルギーの変化を時間分解アンチストークスラマンスペクトルによって観測した。

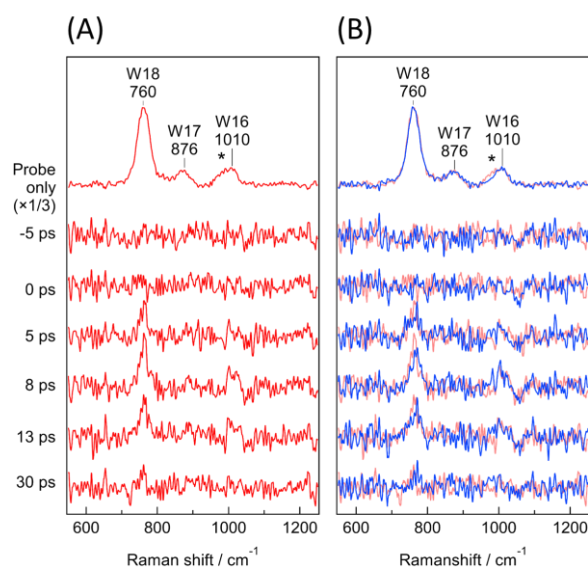
**【結果・考察】** V68W/H93G (Im)変異体の吸収スペクトルおよび可視共鳴ラマンスペクトルは、V68W 変異体のスペクトルと類似していた。このことから、ヘム周辺の構造は、共有結合を切断しても保たれていることを確認した。

V68W 変異体と V68W/H93G (Im)変異体の時間分解スペクトルを Fig.2 に示す。ヘムの光励起に伴って、アンチストークスバンド強度の増大および減少がみられた。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を、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を示している。得られた時間分解スペクトルには、ヘムとポリペプチド鎖との共有結合の有無による有意な差は見られなかった。このことは、ヘムとポリペプチド鎖との共有結合を介した経路は、トリプトファン残基へのエネルギー移動においてその寄与が小さいことを意味している。

これまで、ヘムに接触する位置にトリプトファン残基を導入したミオグロビン変異体について、エネルギー移動が調べられている[3]。これらの変異体間では、ヘムとトリプトワンの物理的距離はほぼ同じであるが、プロペプチド鎖に沿った距離は大きく異なっている。変異体の間では、トリプトファン残基へのエネルギーの流入速度の違いが見られなかったことから、タンパク質内のエネルギー移動において、ヘムとポリペプチド鎖との共有結合を介した経路よりも、原子同士の直接接触がより主要な経路であるということが示唆された。

本研究では、ヘムとポリペプチド鎖との共有結合の効果を直接的に検証し、タンパク質内振動エネルギー移動における主要な経路は原子間接触であることを明らかにした。

**【参考文献】** [1] N. Fujii *et al. J. Phys. Chem. B* 115, 13057 (2011). [2] N. Fujii *et al. J. Phys. Chem. Lett.* 5, 3269 (2014). [3] M. Kondoh *et al. J. Phys. Chem. Lett.* 7, 1950 (2016).



**Fig.2.** Time-resolved anti-Stokes UVRR spectra of the two proteins probed at 230nm after photoexcitation of heme at 405nm. (A) V68W, (B) V68W/H93G (Im) as shown as blue traces. The spectra of V68W mutant are superimposed as light red traces for comparison. The asterisks represent the band due to sulfate ion at 983  $\text{cm}^{-1}$ . The top traces are probe only spectra. The other traces represent difference spectra obtained by subtracting the probe only spectrum.