

## 2P156 シトクロム c 熱変性過程の共鳴ラマン分光

(岡崎統合バイオ) 長野 恭朋, 顧 玉宗, 北川 禎三

【序】ウマ心臓シトクロム c は、分子量 12.4 kD、104 アミノ酸残基から成る比較的小さな水溶性電子伝達タンパク質であり、真核生物に普遍的に存在する<sup>1,2</sup>。ヘム c 補欠分子族はタンパク質と共有結合を形成しており、変性条件下においてもヘム c が外れることが無いため、標準的なタンパク質の一つとして、フォールディング等幅広く研究が行われてきた。<sup>3</sup> 我々のグループでは、既に重水素ガスの誘導ラマン散乱を用いて、Nd:YAG レーザーの基本波 1.064  $\mu\text{m}$  から水の吸収波長 1.56  $\mu\text{m}$  のパルス光を得ることに成功し、10 ナノ秒間に 10~30 の温度上昇を得た。<sup>4</sup> そこで本研究では、この温度ジャンプ装置を用いてシトクロム c 熱変性初期過程の観測を目指した。まずは装置の性能を確かめるため、様々な定常状態において共鳴ラマン測定を行った。

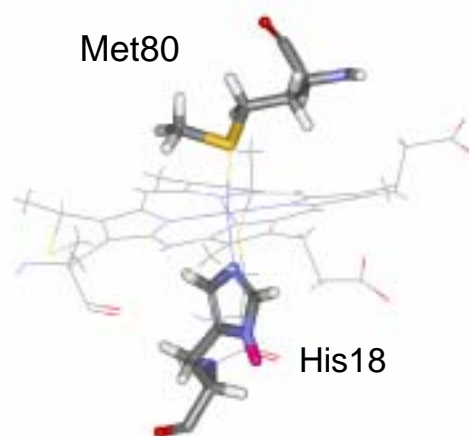


図 1: 酸化型ウマ心臓シトクロム c (1AKK) のヘム近傍の構造<sup>2</sup>。

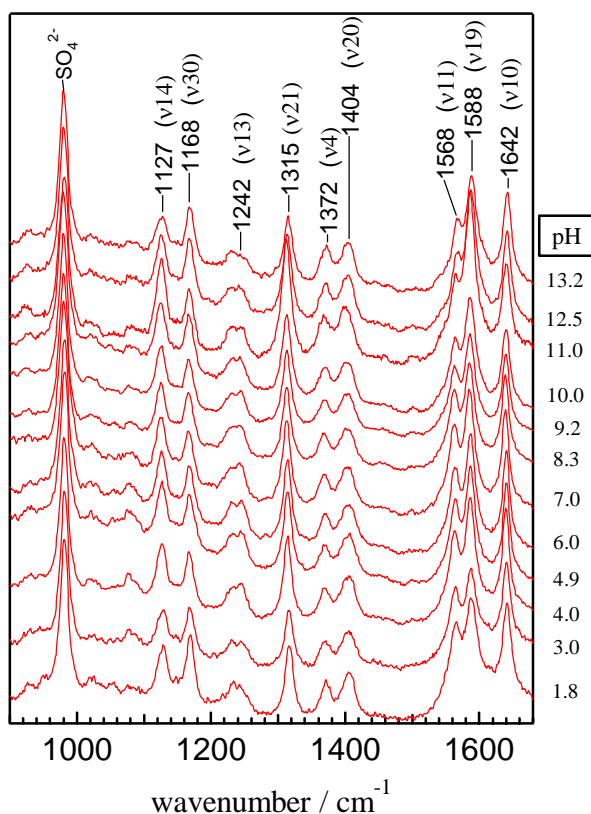


図 2 20、532 nm 励起により観測された様々な pH 条件下でのシトクロム c 共鳴ラマンスペクトル。

【実験】ウマ心臓シトクロム c は、市販品をそのまま用いた。Nd-YAG レーザーの第二高調波(532 nm)をラマン励起光源に用い、近赤外レーザー(1.56  $\mu\text{m}$ )と同期させて時間分解測定を行った。

### 【結果と考察】

#### 1. pH 依存性

様々な pH 条件下において観測された共鳴ラマンスペクトルを図 2 に示す。観測されたラマンバンドは、既報に従い帰属した<sup>5</sup>。pH 増加と共に、ほとんどのラマンバンドは高波数シフトを示し、特に $\nu_{11}$ については約  $5 \text{ cm}^{-1}$  と顕著であった(図 3)。これまでの報告から、このような高波数シフトはアルカリ転移と呼ばれる第 6 配位子(Met80)の交換に起因すると考えられる<sup>6</sup>。

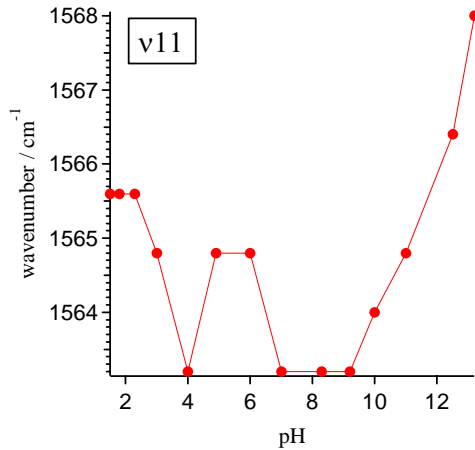


図3 20 における $\nu_{11}$  ラマン周波数の pH 依存性。

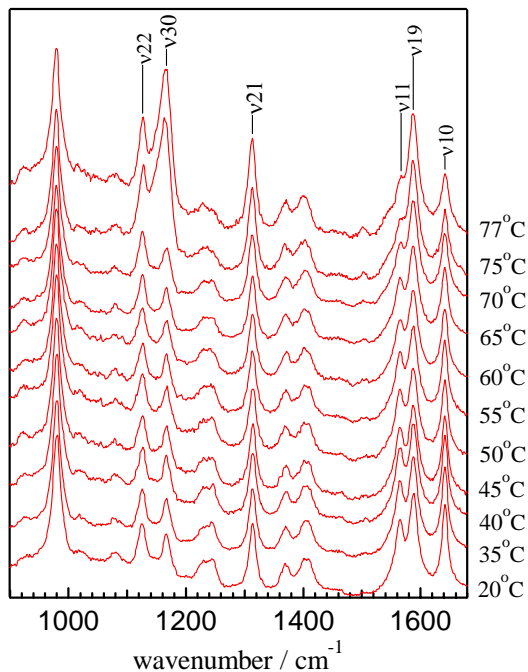


図4 pH 7 における共鳴ラマンスペクトルの温度依存性。

## 2. 温度依存性

様々な pH 条件下において定常的に温度を変化させ、温度依存性を調べた(図4)。それぞれの pH において、60 から 77 の高温域で非可逆的な凝集が起こり、凝集体の生じた温度は、これまでに報告された熱変性温度とほぼ一致した<sup>7</sup>。熱変性温度より低温においても、pH 7 水溶液中においては温度上昇と共に $\nu_{30}$  のバンド強度増大が観測され、この強度変化は可逆的であった。よって $\nu_{30}$  バンド強度は、熱変性初期過程のプロブとなり得ると思われる。本発表では、近赤外レーザー(1.56  $\mu\text{m}$ )と同期させた温度ジャンプ時間分解測定の結果についても議論する。

### 【参考文献】

- [1] R. A. Scott, A. G. Mauk *Cytochrome c* (University Science Books, Sausalito, 1996). [2] L. Banci, *et al.*, *Biochemistry* **36**, 9867-9877 (1997). [3] J. R. Winkler *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 169-174 (2004). [4] K. Yamamoto *et al.*, *Appl. Spectrosc.* **54**, 1591-1604 (2000). [5] B. Cartling, in: T. G. Spiro (Ed.) *Biological Applications of Raman Spectroscopy vol. 3, chap. 5*, (John Wiley & Sons, New York, 1988). [6] T. Kitagawa, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **494**, 100-114 (1977). [7] Y. Hagihara, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **237**, 336-348 (1994).