

## 時間分解熱力学：PYP 反応中間体の熱容量

(京大・院理<sup>1)</sup>, 奈良先端大・物質<sup>2)</sup>, 阪大・院理<sup>3)</sup>) Khan, Javaid Shahbaz<sup>1)</sup>, 今元 泰<sup>2)</sup>, 片岡 幹雄<sup>2)</sup>, 徳永 史生<sup>3)</sup>, 寺嶋 正秀<sup>1)</sup>

## &lt;序&gt;

たんぱく質の状態を特徴づけるためには、熱力学量は非常に有効な物理量である。これまで非常に長い研究の歴史を通して、例えば、蛋白質の安定性はどのような因子によって決まっているのか、蛋白質の変性とはどのような構造であるのか、変性に伴って何が変わってくるのかなど、多くの知見が得られてきた。もちろんこうした知見や分子論的解釈は最近の分子科学的分光法などを通して検証・改訂されているが、基本的描象はほぼ変わることなく続いている。一方で、化学反応ダイナミクスに対しては分光法が非常に大きい威力を発揮しており、定常的測定である熱力学研究と相補的な役割を果たしていると思われていた。しかし、真に相補的に化学反応について本質的な性質を知るためには、化学反応ダイナミクスの熱力学的研究が必要となる。こうした研究はこれまで不可能であったが、我々は最近、定常状態でしか扱ってこれなかった熱力学量を時間分解することで、特にたんぱく質反応ダイナミクスについて有用な知見を明らかにできることを示してきた。これまでに化学反応途中での時間分解測定に成功しているのは、エンタルピー変化、部分分子容変化、熱膨張係数変化である。ここでは初めて短寿命過渡種の熱容量変化を計測した例を、PYP の光反応について示す。熱容量は運動の自由度やその柔軟性を表す指標として熱力学量の中でも重要な位置を占めてきた。この量を中間体に対して測定することで、中間体の構造的情報を得ることができる。

## &lt;実験&gt;

用いた過渡回折格子 (TG) 法では、試料溶液中に 2 本の励起レーザー光によって光強度の干渉縞を作り、この光強度干渉縞によって励起分子と非励起分子との屈折率空間分布を形成する。この励起分子により熱が放出されると、いわゆる熱グレーティングが形成され、ここにプローブ光をブラッグ条件を満たすように入射することで、TG 信号が温度変化の程度に応じて観測される。また過渡レンズ法 (TrL) では、通常の熱レンズ法と同じ方法を用いた。これらの熱成分強度を定量することで、エンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) が求められる。熱容量変化は、このエンタルピー変化の温度依存性として観測した。

## &lt;結果と議論&gt;

PYP は水溶性の蛋白質であり、ある種のバクテリアが青色光から逃げるために使われる光受容体である。PYP は、光を検出するためにクマル酸を発色団に持ち、この分子の光励起によりトランス-シス異性化反応が起こり、まず pR と呼ばれる中間体が生成する。約  $200\mu\text{s}$  の時定数でこれが pB と呼ばれる第 2 の中間体に変化し、秒のオーダーで基底状態 pG に戻る (図 1)。まず PYP をパルス

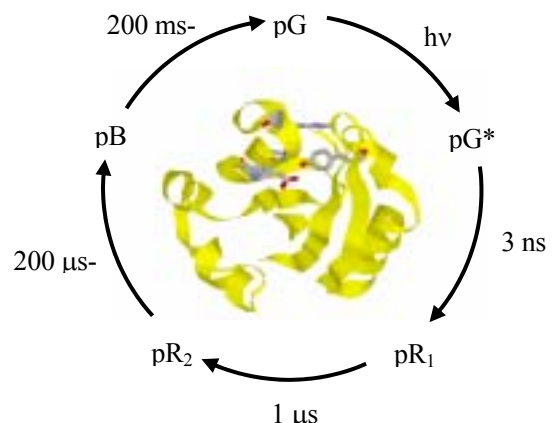


図 1 PYP の光サイクル反応

レーザーで光励起した後に観測される TG 信号の全体像を、図 2 に示す。初めの 1 マイクロ秒でのゆっくりとした立ち上がりは過渡吸収では観測されない成分であり、発色団から遠い部分での構造変化である。その後に見られる減衰は、熱グレーティング信号が熱拡散により減衰するためである。この信号強度は、励起状態を作るために与えられた光子エネルギーのうち、反応

にともなって蛋白質に蓄えられなかった部分のエネルギーを反映し、光子エネルギーからの差がエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) を表す。最後に pR pB の反応と分子拡散を示す信号が見られる。TG 条件での熱拡散の時間スケールでは、pR 中間体の生成に伴う熱発生を検出しているため、この信号強度と熱参照サンプルの信号強度の解析により (図 3) pR の  $\Delta H$  が求められる。今回、pR 中間体生成による熱容量の変化を測定するため、このエンタルピー変化の温度依存性を測定した。熱力学によるとエンタルピー変化は

$$\partial\Delta H/\partial T = \Delta C_p \quad (1)$$

で与えられ、 $\Delta H$  の温度変化部分が熱容量変化に対応する。TG 信号から求められる  $\Delta H$  は pR 中間体の生成によるので、pG から pR に伴う  $C_p$  変化が観測されることになる。 $\Delta H$  の温度依存性を観測したところ、ほぼ実験精度内で温度依存性が見られなかった。このことは pR 状態においては熱容量が基底状態とあまり変わらないことを意味する。

次に TrL 法を用いて、より長い時間スケールでの熱発生を測定した。この手法では、熱拡散が 100ms のオーダーで起こるので、この信号強度は pB の生成による熱発生を検出できることになる。図 4 に熱レンズ信号部分の信号強度から計算した  $\Delta H$  の温度依存性を示す。温度が低くなるに従い  $\Delta H$  が小さくなっていることがわかる。すなわち、式 (1) を考えると、pB 状態では  $\Delta C_p > 0$  であることがわかる。このように初めてマイクロ秒やミリ秒の寿命しか持たない中間体の熱容量変化を捉えることに成功した。

この熱容量変化は何を示しているのだろうか。蛋白質の構造と熱容量の関係は詳しく調べられており、疎水部分が水に露出すると正の熱容量変化が見られることが、小さい分子や蛋白質の変性を用いた研究により知られている。また、大きい熱容量は「ゆるい」構造への変化と捉えることもできるであろう。こうした描像を考えると、PYP は pR 状態では大きな構造変化はしてないが、pB では蛋白質部分の変性と考えられるほどの変化を起こしていると解釈できる。講演ではこうした反応過程についての議論を行う。

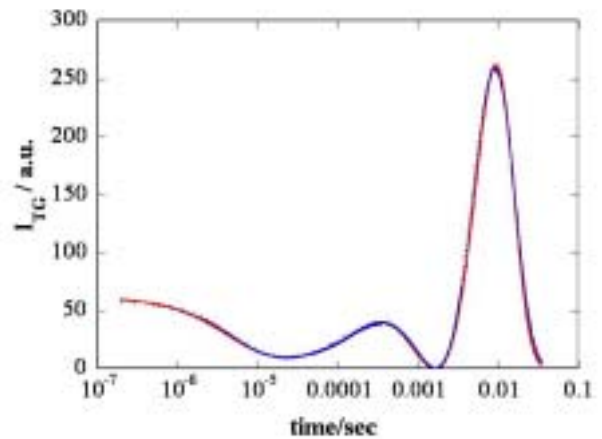


図 2 PYP の光励起後に観測される TG 信号。

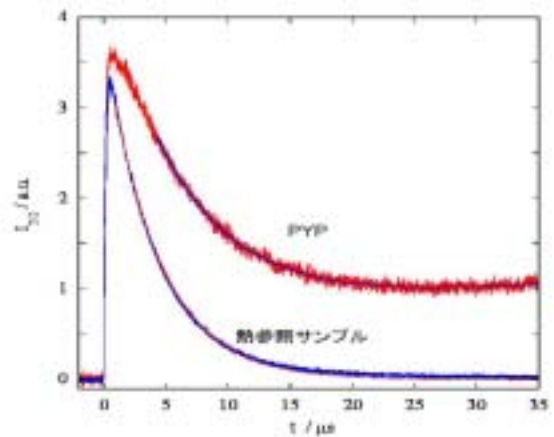


図 3 PYP と熱参照サンプルを励起したときの熱 TG 信号部分

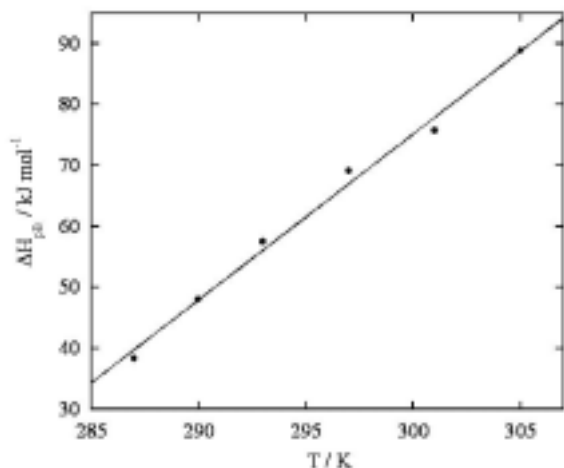


図 4 pB の  $\Delta H$  温度依存性