

2A07 ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光による Photoactive Yellow Protein のタンパク骨格構造変化の観測

(阪大院理¹、JST-CREST²、阪大VBL³) ○水野 操¹、濱田 格雄^{2,3}、徳永 史生¹、水谷 泰久¹

【序】 光センサータンパク質は、センサー部である発色団が受けた外部刺激により誘起される構造変化がタンパク骨格へ段階的に伝播し、それぞれ固有の生理機能を発現する。多くのタンパク質に共通の発色団が分布するように、共通の一次配列や立体構造もまた保持されている。これら共通の立体構造は、シグナル伝達に重要な役割を果たしていることが予想される。Photoactive Yellow Protein (PYP) は、PAS ドメインと呼ばれる共通立体構造をもつセンサータンパク質の原型であり、タンパク質のシグナル伝達過程を解明するためのよいモデルである。今回、ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光により、PYP の芳香族アミノ酸 (チロシン・トリプトファン) 残基の振動バンドのスペクトル変化を選択的に観測した。これをもとに、本報告では、PYP の光サイクル反応初期における構造変化の伝播過程について議論する。

【実験】 時間分解紫外共鳴ラマン測定は、再生増幅したチタンサファイヤレーザーを光源とするシステムを用いた[1]。レーザー出力の第2高調波 (395 nm) を二つに分割し、一方をメタンガスを封入したラマンシフトへ集光し、得られた1次ストークス光をポンプ光 (446 nm, 5 μ J) に使用した。もう一方を、水素ガスを封入したラマンシフトへ集光し、その1次ストークス光の第2高調波をプローブ光 (236 nm, 0.5 μ J) として使用した。ポンプ光とプローブ光の相互相関時間は2.8 psであった。試料溶液 (100 μ M, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.0)へ溶解) を液膜状にフローさせ、ここにパルス光を照射し測定を行った。

【結果と考察】 図1に、遅延時間10 psにおけるPYPの過渡紫外共鳴ラマン差スペクトル、およびPYPの暗状態、チロシン (Y)・トリプトファン (W) の紫外共鳴ラマンスペクトルを示す。差スペクトルに見られる負のバンドは、暗状態のスペクトルと比較してバンド強度が減少していることを表している。光サイクル反応初期のピコ秒時間領域において、PYP分子中の芳香族アミノ酸残基のラマンスペクトルに変化が見られることがわかった。これらのスペクトル変化は、発色団の構造変化に誘起された芳香族アミノ酸残基周辺環境 (水素結合の強さ、疎水性環境) の変化に由来して現れる[2]。チロシン残基については、Y8aおよびY7aバンドにおける強度減少、Y9aバンドにおける強度減少および高波数シフトを観測した。これらの変化は、チロシン残基が関与する水素結合が光反応により強化されたことを示している。トリプトファン残基については、W3およびW7バンドの強度減少を観測した。これらのバンドの強度減少は、タンパク質の構造変化によりトリプトファン残基周辺の疎水性環境が弱まったことを示している。

タンパク質のシグナル伝達過程を考察する上で、観測したスペクトル変化に寄与するアミノ酸残基の特定は重要である。PYP分子 (図2) 中にトリプトファン残基は、W119の1個のみが存在するため、トリプトファンのラマンスペクトル変化は、W119の構造変化に帰属される。一方、PYP分子中にチロシン残基は5個存在するが、発色団であるp-クマル酸は、Y42と直接水素結合しているた

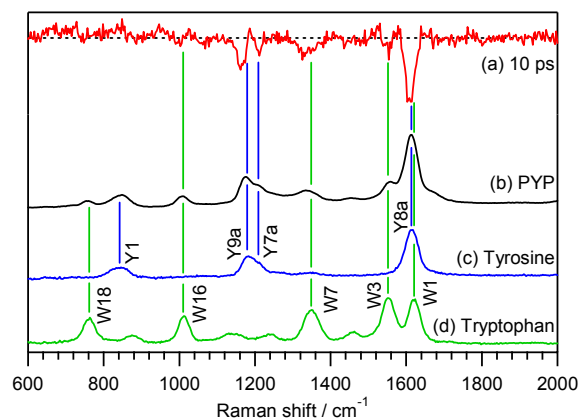


図1. (a) PYP の過渡紫外共鳴ラマン差スペクトル (遅延時間 10 ps). (b) PYP、(c) チロシン、(d) トリプトファンの紫外共鳴ラマンスペクトル。

め、今回観測したチロシンのラマンスペクトル変化は、Y42の構造変化に起因する可能性が最も高い。また、Y118は構造変化を示すW119の隣に存在するため、スペクトル変化へのY118の寄与も否定

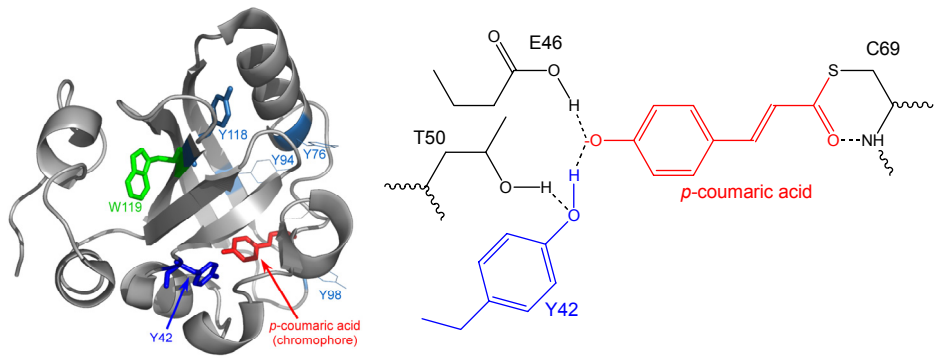


図2. PYPの分子構造(左)と発色団周辺の水素結合ネットワーク(右).

できない。残りの3つのチロシン残基 (Y76, Y94, Y98) はタンパク質表面に露出しているために、スペクトル変化への寄与は低いと考えられる。

構造変化のダイナミクスを追跡するために、強度変化が大きいY8aバンドについて、時間分解測定をおこなった(図3)。ポンプ光照射により、Y8aバンドは装置の時間応答内で強度が減少し、約8 psの時定数で強度の一部が回復することがわかった。しかし、その後1 nsまで強度が完全に回復することはなかった。光サイクル反応の初期段階において、PYPはpG*状態と呼ばれる電子励起状態へ励起され、段階的にI₀, I₀[‡], pR状態と呼ばれる種々の中間体へと変化する。pG*状態では、Y42とともに、発色団に水素結合しているグルタミン酸残基(E46)の水素結合強度が減少することが報告されている[3]。その後、発色団のtrans→cis異性化を伴い、~3 psの時定数でI₀状態が生成する[4]。これらのことから、pG*状態においてY42と発色団との距離が短くなり、水素結合強度が強くなると考えられる。その後、発色団のtrans→cis異性化によりY42との水素結合強度は弱まるが、暗状態における構造までI₀, I₀[‡], pR状態では完全に戻らず、シグナル伝達へ向けた構造変化が引き続き起きることが予想される。さらに、W119は中央に存在するβシートを隔てて発色団から10 Å以上離れて位置するにもかかわらず、10 psのスペクトルに構造変化を示す結果が得られている。このことから、発色団の構造変化に誘起されるタンパク質全体にわたる大きな構造変化が、反応初期の中間体においてすでに開始していることが示唆される。

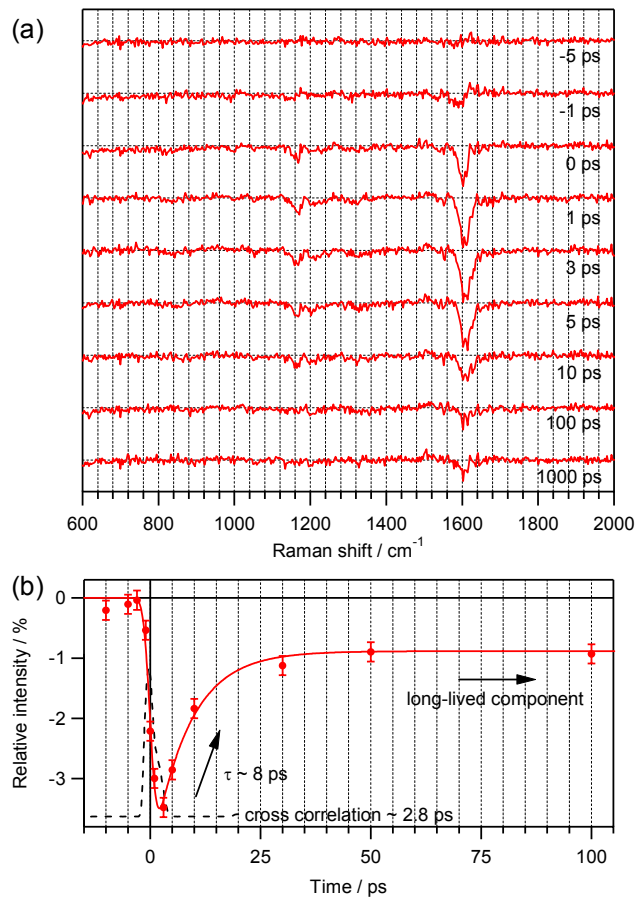


図3. (a) PYPのピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン差スペクトル. (b) Y8aバンド強度の時間変化(図中の破線はポンプ・プローブ光の相互相関波形).

[1] A. Sato and Y. Mizutani, *Biochemistry*, **44**, 14079 (2005). [2] Z. Chi and S. A. Asher, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 9595 (1998). [3] K. Heyne, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 18100 (2005). [4] L. Ujj, et al. *Biophys. J.*, **75**, 406 (1998).