

2A14

Photoactive yellow protein の光サイクル反応への圧力効果

(京大院理¹・奈良先端大²・阪大院理³) 星原悠司¹・今元泰²・片岡幹雄²・
徳永史生³・木村佳文¹・寺嶋正秀¹

【序】 Photoactive yellow protein (PYP)は、紅色光合成細菌より単離された、水溶性の光受容蛋白質である。p-クマル酸を発色団に持ち、光吸収により、まず吸収帯が長波長シフトした中間体 pR₁、pR₂となり、続いてプロトン移動を伴いながら吸収帯が短波長シフトした pB を経て、最終的に中間体 pB は基底状態 pG へと戻る[1]。この光化学反応は光センサー蛋白質の典型として多くの興味を持たれ、これまで種々の分光法を用いて研究されてきた[2]。しかし、反応に伴う蛋白質構造の揺らぎという情報は反応を理解する上で非常に重要であるにもかかわらず、実験的な困難さからほとんど分かっていない。我々は、こうした困難を克服する1つの方法として、過渡回折格子(TG)法により熱力学量の圧力依存性を調べることで、揺らぎに関する情報を得る事を試みている。こうした蛋白質反応への圧力効果は、TG データを解析する上でも、また生体分子への圧力効果という意味でも興味深い。ここでは、PYP の光反応について高圧下における TG 測定と過渡吸収(TA)スペクトル測定を行い、中間体生成反応への圧力効果について検討した結果を報告する。

【方法】 二方に石英窓を備えた光学高圧内部セル(耐圧:450 MPa、光路長:2 mm)を用いることで高圧下における過渡回折格子法の測定を実現した。内部セルに試料溶液を封入し、水を媒体として加圧する方式を採用した。TG 法では、波長 465 nm のパルスレーザーを励起光、633 nm の連続光をプローブ光として信号を測定した。TA 法では、波長 465 nm で励起し、Xe ランプをプローブ光として用いた。

【結果と考察】 まず基底状態の吸収スペクトルへの圧力効果を図 1 に示す。これは圧力増加に伴って増加する密度の効果を補正したものである。圧力増加につれて吸収ピークがレッドシフトして、吸光度がわずかに減少しているが、それほど大きい圧力効果はない事がわかる。

次に、種々の圧力で得られた TG 信号を図 2 に示す。最初に熱拡散に由来する信号減衰が現れ、続いて反応と分子拡散を表す変化が見られる。この中で熱による信号は圧力とともに単調な強度増加を示しているが、pR₂ から pB への反応に起因する信号強度は一度減少し、再び増加するという挙動を示した。また、pG と pB の拡散に起因する信号は、速度変化を伴いながら強度が増加していく様子が観測された。

まず、pR₁ から pR₂ への体積変化について解析を行った。pR₁-pR₂ 過程では体積膨張を伴っており、このときの体積変化 ΔV は $5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ であることが報告されている[3]。TG 信号から、この ΔV の圧力依存性を見積もったところ、 ΔV は今回測定

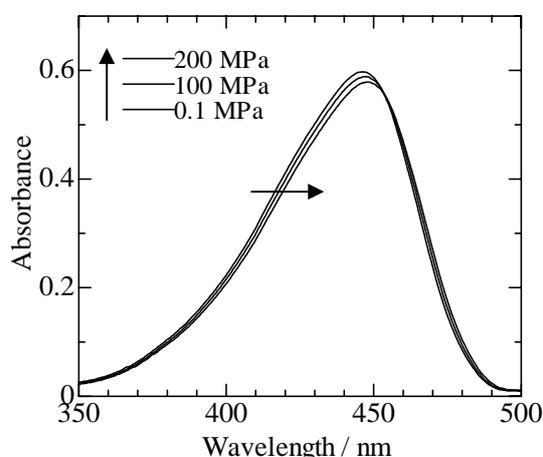


図 1. 吸収スペクトルの圧力依存性

した圧力範囲内ではほぼ変化しておらず、圧力による影響を受けないことが分かった。つまり、この過程においてタンパク質構造の硬さが変化していないことが示唆される。また、 pR_2 のエンタルピー変化についても同様に圧力効果を見積もったが、こちらも圧力による影響を受けないことが示され、 pR_2 状態においてエネルギーを蓄えている蛋白質構造(水素結合、結合の歪み角度など)が圧力によってそれほど変化していないことが分かった。

一方で、 pR_2 - pB 変化過程は、複雑な圧力変化を示していることが分かった。しかし、これに対応する TG 信号は体積変化と吸収帯変化の両方を含んでいるため、信号の解析が容易ではない。そこで、更に詳細な情報を得るため高圧下での TA 測定を試みた。高圧下において測定した過渡吸収スペクトル(密度増加による効果は補正済み)を図 3 に示す。図 3 (a)は $t = 5 \mu s$ におけるスペクトルであり、長波長帯に吸収をもつ中間体 pR_2 が生成している様子を表している。また図 3 (b)は $t = 2 ms$ におけるスペクトルであり、長波長側の吸収帯が消え、逆に短波長側の吸収帯の増加が見られ中間体 pB の生成が確認できる。圧力の増加に伴って、(a)では pR_2 のスペクトル強度の増加と pG に由来するブリーチ強度の増加が観測され、(b)ではブリーチ強度の増加と pB の吸収による寄与が観測された。現在のところ、この ΔOD の変化を、圧力による量子収率の増加によるものと考えている。また pR_2 から pB への変化速度が、高圧下では遅くなっていく様子が観測された。詳細な報告については発表で行う。

【参考文献】

- [1] K. Takeshita and M. Terazima et al, *Biophys. Journal* **2002**, 83, 1567.
- [2] Klaas J. Hellingwerf, J. Hendriks and T. Gensch, *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 1082.
- [3] K. Takeshita and M. Terazima et al, *Biochemistry* **2002**, 41, 3037.

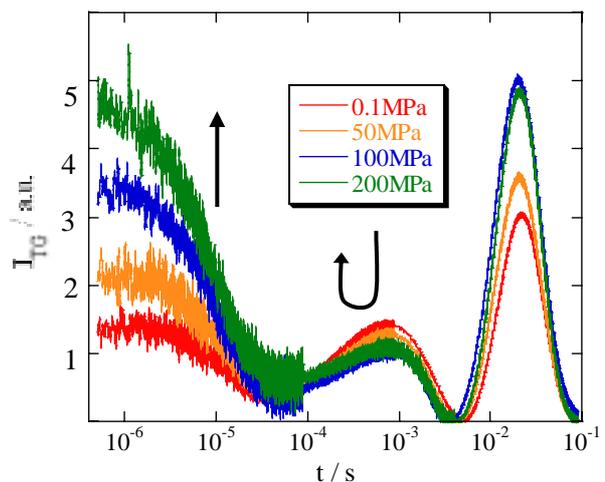


図 2. 観測された PYP の TG 信号 (20)

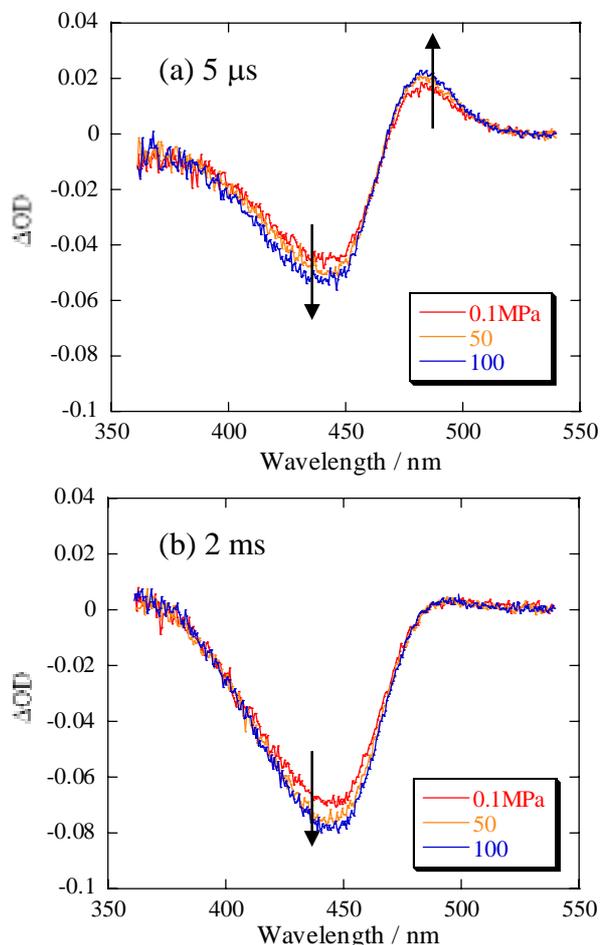


図 3. TA スペクトルの圧力依存性

(a) $5 \mu s$ and (b) $2 ms$