

タンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピング

Watching energy flow in proteins

(阪大院理) 水谷 泰久

振動エネルギー緩和は、凝縮相の化学反応を理解するうえで非常に重要である。この緩和機構の解明には、分子レベルの空間分解能とピコ秒の時間分解能でエネルギー分布を求める必要がある。

タンパク質についても、ヘムタンパク質を中心として、エネルギー緩和がよく研究されている。ヘムタンパク質は、補欠分子族として、鉄ポルフィリン錯体の一種であるヘムを含む。ヘムを光励起すると、サブピコ秒の内部転換を経て、多くのエネルギーが振動エネルギーとしてヘムに残される。このエネルギーは、ヘムから周囲のタンパク質部分を通り、溶媒へと散逸していく。これまでに、ヘム振動冷却過程および、溶媒の温度上昇は観測例があるが、タンパク質内のエネルギー移動を直接観測した例はない。これは、タンパク質内のエネルギー散逸過程を直接観測する手法がなかったためである。われわれは時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマン分光法を用いて、エネルギー散逸を直接観測することを試みた。220-250 nmの紫外光を用いると、タンパク質中に含まれる芳香族アミノ酸残基の共鳴ラマンスペクトルが選択的に得られる。また、アンチストークスラマン散乱光の発生は振動励起状態に特有の現象であるので、その強度から残基がもつ余剰エネルギーの大きさを求めることができる。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によって、特定の残基に関するエネルギーの流入・流出を実時間測定することができる。本研究では、このような共鳴ラマン分光法の長所を最大限に活かして、ヘムタンパク質について、タンパク質中のエネルギーの流れをアミノ酸残基単位でとらえることに初めて成功した¹。

試料には、立体構造が詳細に調べられているマッコウクジラ由来のミオグロビンを用いた。このミオグロビンにはトリプトファンが2残基含まれているため、まずこれらをラマン散乱強度の弱いチロシン、フェニルアラニンに置換した変異体(W7Y/W14F)を作製した。この変異体にトリプトファン残基を1残基導入し、トリプトファン残基の振動エネルギー励起/緩和を、その時間分解アンチストークス共鳴ラマンスペクトルによって観測した。ヘムから同じ方向で、かつ距離の異なった位置にトリプトファンを導入した変異体2種、W68 および W28 変異体、を作製し、ヘムからのエネルギー伝搬について、距離依存性を調べた(ヘムからトリプトファン残基までの距離は、それぞれ 6.2 および 11.8 Å である)。これらに加え、クジラ由来ミオグロビンの14番目のトリプトファンを残した変異体、W14 変異体についても振動エネルギー励起/緩和を調べた。この変異体において、ヘムからトリプトファン残基の距離は 15.2 Å である。

W68 変異体の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトルを図1に示す。ヘムの光励起に伴って、バンド強度の増大とそれに引き続いた減少が観測された。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に、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に対応している。図2は、760 cm⁻¹にみられるW18 バンド強度の時間変化を示している。縦軸の強度は、W68 変異体の5 ps

でのバンド強度で規格化したものである。図中の実線は、二つの指数関数の和と装置応答関数とをコンボリュートした関数でフィットした結果である。バンド強度の増加と減少の時定数は、W68 変異体では 3.0, 9.6 ps と、W28 変異体では 4.0, 19.2 ps と求められた。われわれは以前、リガンドの光解離後のヘムの振動冷却過程を調べ、その時定数を 1-2 ps と求めた²。また、水の赤外吸収スペクトル変化から求められたタンパク質から水へのエネルギー移動は、7.5 ps (60%) および約 20 ps (40%) の時定数で表される 2 つの成分からなることが報告されている³。トリプトファン残基へのエネルギー流入の時定数がヘム冷却の時定数よりも大きく、かつエネルギー流出の時定数がヘム冷却の時定数 (遅い成分) と同程度かそれよりも小さいことは、余剰エネルギーが、ヘム→タンパク質→水と伝搬するという描像と矛盾しない。W14 変異体では、アンチストークス W16 および W18 バンドは観測されたものの、その強度はきわめて弱かった。熱源からの距離が離れると、観測サイトでのエネルギーの伝達速度が遅くなるということ、および余剰エネルギー量が低下するということは、熱拡散の考え方と矛盾しない。しかし、3 種類の変異体の測定結果それぞれに、熱拡散方程式から得られた関数を当てはめると、同一のパラメーターでは表現できなかった。これはナノメートル前後のマイクロなスケールでのエネルギー伝達を考える際、熱拡散の考え方では、その挙動を適切に表現できないことを示している。

本研究は、タンパク質内でヒーターサイトと観測サイトの相対位置を制御し、エネルギーの移動を直接観測した最初の例である。この観測の成功によって、本研究の手法が、エネルギー緩和の解明に極めて有効であることを示すことができた。

謝辞 ここですべた研究成果は、藤井直樹氏、水野操氏、石川春人氏 (阪大院理) との共同研究による。

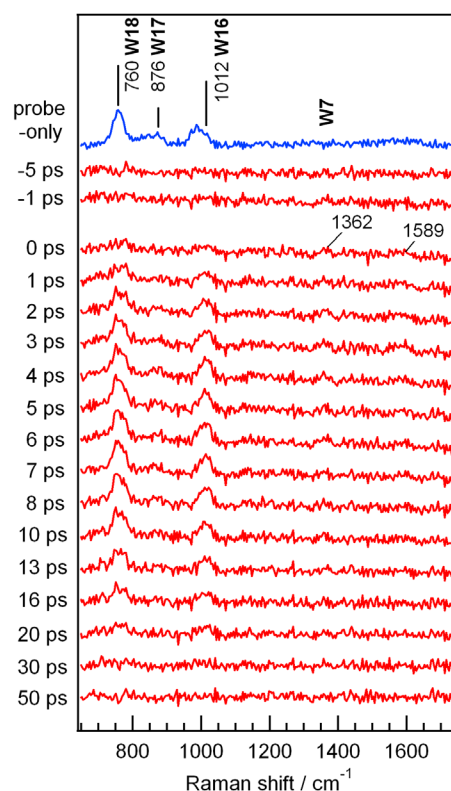


図1. V68W 変異体の時間分解アンチストークス紫外共鳴ラマンスペクトル。一番上のスペクトルは、プローブ光のみで測定したスペクトル、その他のスペクトルは、時間分解差スペクトルである。

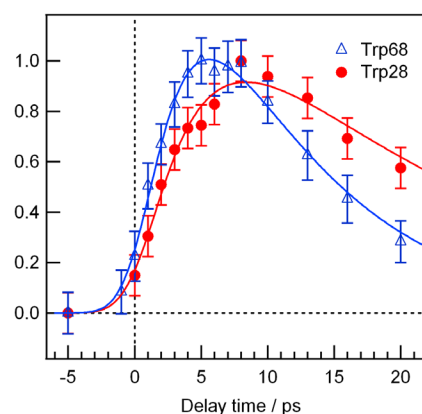


図2. Trp68 と Trp28 の W18 バンドの面積強度変化の比較。縦軸の強度は、それぞれの強度変化において、最も強い値で規格化した値である。

¹ Fujii, N.; Mizuno, M.; Mizutani, Y. *J. Phys. Chem. B* in press.

² Mizutani, Y.; Kitagawa, T. *Science* **1997**, 278, 443; Mizutani, Y.; Kitagawa, T. *Chemical Record* **2001**, 1, 258.

³ Lian, T.; Locke, B.; Kholodenko, Y.; Hochstrasser, R. M. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11648.