3D0900

Photoactive Yellow Proteinの発色団モデル化合物の合成と解析

○山本 仁¹、角 俊明¹、濱田 格雄²、徳永 史生²、岡村 高明¹、上山 憲一¹ (¹ 阪大院・理・高分子、² 阪大院・理・宇宙地球)

光受容性蛋白の一つである Photoactive Yellow Protein(PYP) は 125 残基からなる水溶性の蛋白質であり、光励起により発色団の trans-cis 異性化を含む光サイクルが進行する。発色団は 4-ヒドロキシ桂皮酸が Cys69 とチオールエステル結合を形成している。発色団近傍では 4-ヒドロキシ桂皮酸の p 位のフェノール性 OH 基に対して Tyr42、Glu46、Thr50、Arg52、Tyr98 などの残基間で水素結合ネットワークが形成されており、PYP の光サイクルにおいて、この水素結合ネットワークの組替えや、それに伴う蛋白全体の構造変化などが起こる。これら一連の化学的メカニズムを理解するには発色団のモデル化が不可欠である。そこで本研究では 4-ヒドロキシ桂皮酸のカルボニル基に対する Cys69 からの NH-O 水素結合に着目し、PYP 発色団モデル化合物を合成し、これらの性質を調べることに、PYP 発色団の異性化メカニズム解明を目指した。発色団モデル化合物として HOC6H4CH=CHCONHC6H4NHCO-t-Bu (1)、NMe4[OC6H4CH=CHCONHC6H4NHCO-t-Bu] (2)、HOC6H4CH=CHCONHC6H5 (3) を合成した。これらの化合物を、NMR,IR,UV-vis 等の分光測定及び X 線構造解析を行った結果、アニオン状態において 4-ヒドロキシ桂皮酸の二重結合の二重結合性が顕著に下がることを見出した。本発表では HOC6H4CH=CHCOOC6H4NHCO-t-Bu、HOC6H4CH=CHCOC6H4NHCO-t-Bu についても分子内 NH-O 水素結合の有無と電子状態に関して検討し、PYP 発色団の異性化メカニズムについて考察する。

H. Yamamoto, T. Sumi, N. Hamada, F. Tokunaga, T. Okamura and N. Ueyama : Synthesis and characterization of the chromophore model compounds of Photoactive Yellow Protein

3D0930

PYP におけるメチオニン 100 の役割

○吉富 寛¹、濱田 格雄²、熊内 雅人³、佐々木 純¹、徳永 史生¹ (¹ 阪大院・理・宇宙地球科学、² 阪大・VBL、³ ワシントン大)

Photoactive yellow protein (PYP) は、紅色光合成細菌から単離され負の走光性に関与するとされる分子量 14kDa の光受容蛋白質である。発色団である p-クマル酸が光により異性化し、これをトリガーとして蛋白質部分が構造変化して活性中間体と考えられている M 中間体となる。我々の研究グループでは、100 番目の Met を Ala,Lys,Glu,Leu に置換した変異体 (M100A,M100K,M100E,M100L) が野生型 (WT) に比べて M 中間体の崩壊速度が劇的に遅くなることを報告した (熊内ら 2000 年,2001 年生物物理年会)。その報告では M 中間体からの戻り過程に焦点を当て、戻り過程における Met100 の役割について述べた。さらに Met100 の役割について詳細に検討を行うために今回、暗状態における立体構造安定性を熱変性実験により検証した。Met100 は、結晶構造解析による立体構造によるとループを形成し発色団を囲む疎水コア近傍にある。このループ部分は、PYP の疎水コア部分の安定性に寄与すると考えられ、Met100 の変異が疎水コア部分と立体構造に及ぼす影響について調べるために、熱変性実験を紫外・可視吸光度測定と円偏光二色性 (CD) 測定で行った。その結果、WT では変性中点温度 T_m が 83.5℃となり、可視分光と CD のデータが一致した。一方、M100 変異体では CD による T_m が 83℃前後で変化がなかったのに対して、可視分光による T_m は M100A,K,E で夫々 64℃、63℃、71℃となり、WT より低くなっていることが分かった。この事実は、Met100 のループ部が発色団周りの疎水コア部分の安定性に重要な役割を担っていることを示している。これと熱量測定の結果を合わせて暗状態立体構造及びその活性において Met100 の果たす役割について議論したい。

H.Yoshitomi,N.Hamada,M.Kumanchi,J.Sasaki,F.Tokunaga : A role of Methionine 100 in PYP

3D0915

蛋白質が駆動する光異性化反応：非経験的 QM/MM 法によるイエロープロテインの研究

山田 篤志、石倉 孝一、○倭 剛久 (名大院・物質理学)

The photoisomerization reactions of photoreceptor proteins are important for photoenergy conversion and photosignal transduction in living organisms. Here we show the unexpectedly important role of the protein environment in the photoisomerization reaction of the photoactive yellow protein. We analyzed the gradient of the potential energy surface to examine the driving force of the reaction, for which the reaction coordinate is the twisting angle of the C7=C8 bond. The twisting force for this bond was divided into two components: the protein-chromophore interaction and the intrinsic term by the chromophore itself. As a result, we found that the magnitude of the twisting force due to the protein-chromophore interaction was unexpectedly greater than that coming from the chromophore itself. Furthermore, we observed that the twisting force was largest at the C7=C8 bond among all the backbone bonds of the chromophore. In other words, the photoisomerization reaction is driven by the chromophore-protein interaction during the initial stage. We analyzed the minimum energy pathways for the photoisomerization reaction of the chromophore in the protein and in vacuum. As a result, we recognized significant difference for the reaction dynamics between these two different environment.

A.Yamada,T.Ishikura and T.Yamato : Protein driven photoisomerization reaction: Ab initio QM/MM study of photoactive yellow protein

3D0945

Simulated Annealing 法による Photoactive Yellow Protein の M 中間体の解析

○塩沢 真理子¹、櫻井 実¹、井上 義夫¹、神谷 成敏²、肥後 順一³ (¹ 東工大院・生命理工、² 生物分子工学研・情報解析、³ 東薬大・生命科学)

Photoactive Yellow Protein(PYP)の光サイクルには、少なくとも 2 つの反応中間体 L、M が存在するが、特に M 中間体はシグナル伝達に直接関与すると言われている。PYP の機能を分子レベルで理解するためには、M 中間体の水溶液中の構造や動的性質を解明する必要がある。NMR、その他の実験によれば、この中間体は部分的に unfold された状態だといわれている。一方、われわれは、これまで分子動力学シミュレーションにより、この中間体は、基底状態や L 中間体にはない特有の運動モードをもつことを示してきたが、通常の MD 法の枠内では unfold された状態を捉えることはできなかった。そこで、本研究では、simulated annealing (SA) 計算を用いて、M 中間体の水溶液中での安定構造を探索することを試みた。SA 計算は、以前の 300 K における 10 ns シミュレーションの最終構造から開始した。一度 500 K まで温度を上昇させた後、この温度で一定時間保持し、再びこれを 300 K まで徐々に戻した。500 K での保持時間を変え数通りの SA 計算を行ったが、いずれの場合も、300 K に落とした後のトラジェクトリーに対し。主成分解析、露出表面積、水素結合数、慣性半径などの解析を行った。その結果、NMR 実験等から言われている通り、M 中間体は多くのサブ状態を持つらしいことが判明した。これらは 3 次構造的には、X 線構造から大きくは変化していないが、50、100 ループあるいは N 末端において二次構造の崩れが見出された。また、発色団のフェノール基、G46 の周辺は水に露出していることが判明した。これらの結果は、概ね分光学的実験と一致した。

M. Shiozawa, M. Sakurai, Y. Inoue, N. Kamiya, J. Higo : Simulated Annealing Study on the M Intermediate of Photoactive Yellow Protein