1P285

Photoactive Yellow ProteinのCys残基を含む発色団モデル化合物の合成と解析

○岡本 健太郎、山本 仁、角 俊明、岡村 高明、上山 憲一（阪大院・理・高分子）

Photoactive Yellow Protein (PYP) は、紅色光合成細菌中に存在し、Cys69 とチオエステル結合した *p*-クマル酸誘導体が、発色団として機能している。この発色団近傍では、水素結合ネットワークが形成されており、PYP の Photocycle 中において水素結合の組換えや、それに伴う蛋白全体の構造変化が起こることが知られている。当研究室では、発色団カルボニル基に対する Cys69 の NH 基からの水素結合に注目し、*p*-クマル酸をアミドやチオエステルで架橋し、共役カルボニル基に対し分子内 NH $\cdots$ O 水素結合形成可能な発色団モデル化合物を合成し、その性質について検討することで、Photocycle のメカニズムの解明を目指してきた。これらの発色団モデル化合物の各種測定から、発色団の phenolate anion 状態では、分子内 NH $\cdots$ O 水素結合によって、オレフィンの二重結合性が低下することを明らかにしている。今回は、より天然に近いモデルであるシステイン残基とチオエステル結合させた *p*-クマル酸誘導体の合成を行ない、その性質について検討を加えた。

p-クマル酸誘導体は、フェノール性水酸基を *tert*-Butyldimethylsilyl 基で保護した *trans*-*p*-クマル酸の酸クロライド誘導体と *N*-Cys-OMe とを反応させ、合成および単離した。Phenolate anion は、フェノール性水酸基の保護基を脱保護することにより合成した。得られた phenolate anion のクロロホルム中における UV-vis スペクトルを測定したところ、吸収極大が 450nm に観測された。この値は実際の蛋白にほぼ同じ値 (446nm) であり、これまで合成してきたモデル化合物の中では最も長波長側にシフトして得られた。本発表では、他の分光測定結果もあわせて、この誘導体の性質について詳しい議論を行う。

K.Okamoto, H.Yamamoto, T.Sumi, T.Okamura and N.Ueyama : Synthesis and characterization of PYP chromophore model compound containing a Cys residue

1P287

Photoactive Yellow Proteinの時間分解蛍光スペクトルの解析

○小池 香奈、川口 一朋、木村 明洋、倭 剛久（名大院・理・物理）

Photoactive Yellow Potein(PYP) は、紅色光合成細菌 *Ectothiorhodospira halophila* 中に存在し、負の走行性のための光センサーとして機能する光受容タンパク質である。PYP は発色団として *p*-coumaric acid(pCA) を持つ。pCA は青色光照射によって *trans* 型から *cis* 型へと光異性化する。

本研究では、単色パルス光の照射を受けた PYP の時間分解蛍光スペクトルの理論計算を実行し、超高速ダイナミクスを調べた。まず、時間分解蛍光スペクトルを分子動力学法によって評価するための理論式を導出した。この式では、時間分解蛍光スペクトルは、遷移双極子モーメントの時間相関関数のフーリエ変換で表現できる。PYP の電子状態を求め、基底状態と励起状態の間の遷移双極子モーメントを計算する。さらに遷移双極子モーメントの時間変化を調べることで、時間分解蛍光スペクトルを求める。そして、タンパク質が発色団の電子状態に与える影響を調べ、タンパク質と発色団の相互作用について検討する。

K.Koike,K.Kawaguchi,A.Kimura,T.Yamato : Analysis of time-resolved fluorescence spectrum of Photoactive Yellow Protein.

1P286

PYP の光サイクルにおけるダイナミクスの理論的研究

○神谷 基司、斉藤 真司、大峯 巖（名大院理）

【序】Photoactive Yellow Protein(PYP) は紅色光合成細菌に含まれる可溶性の小さなタンパク質であり、青色光を吸収して光サイクルを行う。発色団 (*p*-クマル酸) の異性化という局所的な変化により始まるこの光サイクルにおいて、タンパク質全体に渡る大域的な構造変化が起こることが予測されている。PYP で見られる「小さな変化を一意的に大きな変化に結びつけるためのメカニズム」は非常に興味深いものである。そこで本研究では分子動力学 (MD) 計算、量子化学計算を用いて、発色団の光異性化が周囲に与える影響、さらに発色団のプロトン化に与える影響についての考察を行った。

【結果と考察】まず、基底状態 と pR(L) 中間体で MD 計算を行い、その構造を比較した。その結果、実験的な観測と同様に、発色団と直接水素結合している残基については大きな構造変化はみられないものの、近傍にありながら、直接水素結合をしていない Arg52 側鎖や Val66 主鎖周辺に構造変化 (水素結合の切断) が見られた。これらの残基は pR(L) 中間体から pB(M) 中間体へ至る反応において、発色団とその周辺の構造変化に大きく関わる領域であり、観察された変化は光サイクルの進行となんらかの関わりがあると予想される。しかしながらこれらの構造変化は光サイクルの次の過程 (発色団のプロトン化) に関わる領域からは少し距離がある。この影響を評価するため、量子化学計算と MD 計算を組み合わせで発色団のプロトン化に伴う (自由) エネルギー変化についての計算を行った。また、発色団のプロトン化に伴う構造変化の様子についてマルチカノニカル MD 法を用いて考察を行った。これら二つの結果については当日に議論する予定である。

M.Kamiya, S.Saito and I.Ohmine : Theoretical study of photocycle of PYP; Analyses of structure and dynamics

1P288

タンパク質励起状態計算の手法

○川口 一朋、倭 剛久（名大院・理・物理）

今回、我々はタンパク質の励起状態を正確に計算するための新しい手法を考案して Photoactive Yellow Protein (PYP) に応用した。PYP は紅色光合成細菌から単離される水溶性の光受容タンパク質で、発色団にクマル酸を持っている。紅色光合成細菌の負の走光性はこのクマル酸の光異性化により機能を発現している。通常、クマル酸は溶液中では最大吸収波長はおおよそ 280nm 程度であるが、タンパク質環境下では 446nm にまで変化する。この吸収波長の大きな変化が周囲のタンパク質に起因していることは明らかである。そこで我々は理論計算により、タンパク質のどの部分がどの程度吸収波長の変化に影響を与えているかを調べた。吸収波長を知るためには基底状態と励起状態の各エネルギーを計算し、そのエネルギー差から吸収波長を計算すればよい。そのためには、各状態のエネルギーをできるだけ正確に計算しなければならない。しかし、現状ではタンパク質+溶媒という大きな系の状態を計算することは、特に励起状態では、非常に困難である。これを克服するために、sa-CASSCF 法と Fragment MO 法で交互に繰り返し計算をするという手法を用いた。これによりタンパク質と水の影響を考慮したクマル酸の励起状態の計算に成功した。この結果を解析することにより、タンパク質中のどの原子がどの程度吸収波長の変化に寄与しているかという詳細なデータを得ることができた。

K.Kawaguchi,T.Yamato : A nobel method to calculate the excited state of protein.