1P257

PYPにおけるプロトン移動反応の理論的研究

○神谷 基司、斉藤 真司、大峰 巖 (名大院・理・化学)

Photoactive Yellow Protein(PYP) は紅色光合成細菌 *Ectothiorhodospira Halophila* の持つ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構造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知られている。本研究ではその光サイクルにおいて、光異性化の次のステップである Glu46 から発色団へのプロトン移動反応について Q(Quantum Mechanical)/MM(Molecular Mechanical)法やアンブレラ法を用いて経路、自由エネルギー変化について解析を行った。まず、光異性化前後(pG, pR)の状態において QM/MM 法を用いてプロトン移動反応による自由エネルギー変化を計算した。その結果、両状態においてプロトン移動はエネルギー的に不利であることがわかった。このことより、プロトン移動反応が進行するためには、光異性化に伴って何らかの構造変化が誘起されることが重要になると考えられる。そこで、我々は発色団の周囲の残基や溶媒として存在する水分子に注目し、プロトン移動を促進するような構造、経路を探索した。その結果、溶媒である水分子が関与するエネルギー障壁が小さな経路を見出すことができた。現在、そのエネルギー変化や構造、経路について詳細な解析を進めている。

M. Kamiya, S. Saito, I. Ohmine : Proton transfer in Photoactive Yellow Protein(PYP)

1P259

イエロープロテインの光反応サイクルの pH 依存性

○今元 泰、針貝 美樹、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

光合成細菌の光センサー蛋白質であるイエロープロテイン (PYP) の発色団・p-クマル酸は、暗状態ではトランス型であるが、光を吸収するとシス型に異性化する。その後、吸収スペクトルの異なる反応中間体 (L、M、M') を経てもとの暗状態に戻る。最近の研究から、これらの中間体、および M' 中間体の脱プロトン化状態 M^{alkali} は、互いに pH 平衡にあることがわかってきた。そこで、さまざまな pH で励起後の過渡スペクトルを測定し、各中間体の吸収スペクトルに分割することで、各平衡の pK_a を求めた。その結果、L と M、M と M'、M' と M^{alkali} の平衡の pK_a は、それぞれ 7.4、6.4、10.2 であった。変性状態にある発色団の pK_a は 8.6 であるので、M' は pK_a を 1.6 上昇させるような強い発色団/蛋白質相互作用を持っていると考えられた。また、暗状態 PYP の回復速度の pH 依存性を、各中間体の割合と比較したところ、M' の割合とよく一致し、中間体の中で M' のみが暗状態 PYP に回復すると考えられた。暗状態 PYP の回復で律速となるのは、発色団の異性化と考えられているので、M' では、熱異性化を効率よく行わせる発色団/蛋白質相互作用が存在すると考えられる。

Y. Imamoto, M. Harigai and M. Kataoka : pH-dependence of the photocycle of photoactive yellow protein

1P258

暗状態 Photoactive Yellow Protein ラマンスペクトルの帰属

○海野 雅司¹、熊内 雅人²、徳永 史生²、山内 清語¹ (¹東北大・多元研、²阪大・院理)

【序論】Photoactive Yellow Protein (PYP) は紅色光合成細菌中に含まれ、この細菌が示す負の走光性の光受容タンパク質だと考えられている。発色団はシステイン残基にチオールエステル結合を介して結合した4-ヒドロキシ桂皮酸である。この暗状態 PYP に可視光を照射すると複数の反応中間体を経る一連の光反応サイクルを示し、我々は共鳴ラマン分光法を用いて各中間体における活性部位の構造解析などを行ってきた [1-5]。本研究では暗状態 PYP について、そのラマンスペクトルの帰属を行ったので報告する。

【実験と解析】暗状態 PYP のラマンスペクトルは Kr レーザーの 406.7、413.1、または 647.1nm 光で測定した。振動解析には脱プロトン化したトランス型の4-ヒドロキシ桂皮酸メチルチオールエステルを用いた。

【結果と考察】発色団の一部を ¹³C に同位体ラベルした試料や重水中で交換性プロトンを重水素化した試料の共鳴ラマンスペクトルを測定した。また密度汎関数法に基づいた基準振動解析を行うことでラマンスペクトルの帰属を行った。その結果、400-1700cm⁻¹ 領域に観測されるほぼ全てのラマンバンドの帰属を行うことができた。当日は既に報告されている PYP の赤外吸収スペクトルについても議論する。

[1] Unno et al. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, 4233. [2] Unno et al. (2002) *Biochemistry* 41, 5668. [3] Unno et al. (2003) *J. Phys. Chem. B* 107, 2837. [4] El-Mashtoly et al. (2004) *Biochemistry* 43, 2279. [5] Unno et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 23855.

M. Unno, M. Kumauchi, F. Tokunaga, and S. Yamauchi : Assignment of Raman Spectra of Dark State Photoactive Yellow Protein

1P260

紅色光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* 由来 PYP の光反応の解析と生理条件下における反応の考察

○山崎 洋一、上久保 裕生、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

Photoactive Yellow Protein(PYP) は p-クマル酸を発色団にもつ PAS ドメイン様タンパク質で、光合成細菌において単離されている水溶性タンパク質である。PYP 様タンパク質は現在までに8種類報告されており、その特徴から3種に分類される。このうち好塩性光合成細菌に由来する3個の PYP は *Ectothiorhodospira halophila* の PYP (Eh-PYP) に代表されるもので数百ミリ秒の光反応サイクルを持つ。一方、紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter capsulatus* に由来する PYP (Rc-PYP) は Eh-PYP と異なり吸収スペクトルに 375nm、438nm の二つの極大を持ち、数ミリ秒の速い光反応を示す。Eh-PYP は菌体の光走性、Rc-PYP は菌体の浮力の制御などに関与すると予測されているが、その情報伝達経路は不明である。本年度では Rc-PYP の光反応について解析し、そこから生理条件下での反応を考察した。

Rc-PYP は Eh-PYP に対して特長的な二つの吸収極大を持つが、375nm に吸収極大を持つ短波長成分は光反応によって 440nm 付近に極大を持つ成分を形成する。この成分はその後 375nm の成分へと戻る。この反応は pH7.5、20℃ で特定数 20 時間程度の非常に遅い反応であり、且つ光反応によっても戻ることから発色団のトランス-シス反応であると推定できた。赤外吸収の変化ではトランス-シスに対応した 1046cm⁻¹ と 1005cm⁻¹ のバンドが確認された。このことから 375nm の成分はトランス型の発色団をもつと考えられる。長波長成分の光反応が数ミリ秒の反応であり生体内での相互作用が考えづらいのに対して、短波長側の光反応は充分遅いことから、この光反応成分が活性種である可能性が考えられる。

Y. Yamazaki, H. Kamikubo, Y. Imamoto and M. Kataoka : Characterization of photoreaction of Rc-PYP and discussion of its interaction.