1P261

イエロープロテインにおける発色団ループの役割

○笹山 裕晃、針貝 美樹、上久保 裕生、山崎 洋一、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

Photoactive Yellow Protein(PYP)は発色団に *p*-クマル酸を持つ光受容タンパク質である。PYPが活性中間体(M中間体)へ変化すると発色団ループ(Fhe63~Glu74)をはじめとする蛋白質全体にわたる構造変化が起こると報告されている。そこで今回は、発色団ループにあるアミノ酸残基についてAla置換変異体を作製し、光反応やM中間体の構造への影響を検討した。

まず、発色団ループとその両端のPhe(Phe62~Phe75)のうち、Cys69とAla67以外の12種類のアラニン置換変異体について、M中間体から暗状態に戻る際の崩壊速度を測定した。その結果、F62AとF75AのM中間体は、極端に長寿命化していた(それぞれ1000倍、80倍)。また、F62A_MはpHが上昇するにつれて発色団が脱プロトン化した(F62A_M⁴¹⁰)。F62A_MとF62A_M⁴¹⁰の見かけのpKaを求めた結果、野生型では10.2なのに対して8.5に低下していた。この値は変性したM中間体のpKa 8.6に近く、F62はM中間体のプロトン化した発色団を安定化していると考えられる。一方F75A_MはpHを変化させてもスペクトルのシフトはほとんど見られず、また野生型と異なるスペクトルを示したため、M中間体の発色団まわりの構造が異なっていることが示された。以上の結果から、発色団ループの両端のPheが、発色団まわりの疎水性クラスターと疎水的相互作用をしていることが、本来のM中間体の構造を保つのに必要であり、F62A、F75Aではその相互作用が失われ異なる構造をとるため、M中間体が長寿命化したと考えられた。

H.Sasayama, M.Harigai, H.Kamikubo, Y.Yamazaki, Y.Imamoto and M.Kataoka : Role of chromophore loop in PYP photocycle

1P263

PYPにおけるN末端部とC末端部との相互作用が光反応に与える影響

○針貝 美樹、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

Photoactive yellow protein(PYP)は、発色団に *p*-クマル酸をもつ約14kDの水溶性蛋白質であり、細菌の光走性のセンサーとしての機能を持つ。PYPの光反応サイクル中で活性状態にあると考えられているのはPYP_M(M中間体)であり、PYPの機能発現機構の解明には、これに関する知見が必要である。これまでにPYPのN末端部を6、15、23残基欠損させたときに生成するM中間体の崩壊速度は、野生型に比べ、欠損数の増加に伴い100倍~数1000倍遅くなることを報告した。そして、暗状態と光定常状態との差FTIRスペクトルや暗状態の結晶構造から、N末端部とC末端部との相互作用がM中間体の安定性に寄与していることが考えられた。そこで、N末端部の幾つかのアミノ酸残基についてアラニン置換体を作成し、それぞれから生成するM中間体の紫外可視吸収スペクトルや崩壊速度を比較したところ、F6AでN末端部を6残基欠損するのと同じ効果が見られた。さらにF6Y、F6H、F6D、F6Lを用いて調べた結果、無電荷でπ電子系をもつアミノ酸残基が本来の光反応に必要なことが示された。暗状態の結晶構造から、Phe6と相互作用するC末端部のアミノ酸残基はLys123が考えられたので、次にLys123の寄与について変異体を用いて調べた。K123Aは発色団の再構成ができなかった為、この位置には長い側鎖が必須であると考えられた。そこでC_γを持ち、無電荷(K123L)、或いは負電荷(K123E)に変異させたものを野生型と比べると、F6Aほどの効果は見られず、電荷の寄与は小さいと考えられた。以上の結果から、M中間体の安定性に関与するN末端部とC末端部との相互作用は、主にPhe6のπ電子系とLys123のアルキル鎖とのCH/π相互作用であると考えられた。

M. Harigai, Y. Imamoto, M. Kataoka : Effect of interactions between N-terminal and C-terminal part on photoreaction of photoactive yellow protein

1P262

赤外光照射による光受容蛋白質PYPの光構造変調

○市田 秀樹¹、松本 健吾²、濱田 格雄³、中村 亮介³、徳永 史生^{2,3}、兼松 泰男^{1,3} (¹阪大VBL、²阪大物理、³JST-CREST)

光受容蛋白質 Photoactive Yellow Protein (PYP)は水溶性であり、かつ低分子量(14kDa)であるため、生体内における光反応ダイナミクスを分子レベルで解明するモデル蛋白質として盛んに研究がなされている。我々は、この光受容蛋白質PYPにおいて、蛋白質と発色団の相互作用の観点から研究を行っている。PYPは、蛋白質中の疎水コア内に、発色団として *p*-クマル酸(*p*-coumaric acid)を有しており、この発色団の光異性化により蛋白質の構造変化が誘起され、いくつかの中間体を経た後、初期状態(Dark状態)に戻るという光反応サイクルを示す。本研究では、活性中間体であるM中間体に対して、光構造変調パルスとして、発色団やその周囲との結合に由来する振動モードを励起、または試料に対して熱的な効果を与えることのできる赤外パルス光の導入を行い、光反応サイクルへの影響を調べ、構造変調を行うことによって光反応サイクルを制御することを目指している。実験では、光受容蛋白質PYPにおける光反応サイクルのトリガー光として445 nmの光パルスを照射し、その後のDark状態の吸収強度の変化を測定し、その吸収戻り過程において構造変調光を導入する。光構造変調光としては、再生増幅Ti:Sapphireレーザーの出力をOptical Parametric Amplifier(OPA)を用いて波長変換を行った近赤外光(1.3~2 μm)、およびOPAのSignal光とIdler光の差周波発生を行うことによって得られた中赤外光(3~8 μm)を用いた。講演では、光反応サイクルに対する赤外光照射効果の詳細について議論する予定である。

H.Ichida, K.Matsumoto, N.Hamada, R.Nakamura, F.Tokunaga, and Y.Kanematsu : IR-light-induced structural modulation of Photoactive Yellow Protein

1P264

Heat capacity of the transient species during photo-reaction of PYP

○Javaid Shahbaz Khan¹、Yasushi Imamoto²、Mikio Kataoka²、Fumio Tokunaga³、Masahide Terazima¹ (¹Dept. Chem., Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ., ²Grad. Sch. Mat. Sci., NAIST、³Dept. Earth Space sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Photoactive Yellow Protein (PYP) becomes one of typical photosensor proteins. The conformational changes in the first and the second intermediate species have been targets in extensive studies so far. Although various physical properties were reported, thermodynamic properties, which are sensitive indicators of protein conformation, has not been well explored yet on these intermediate species. In this respect, we have been developing a technique to monitor the changes of the thermodynamical properties in time domain and applying to the photoreaction of PYP. Here, we report on the heat capacity change during the reaction. The heat capacity is an important and fundamental thermodynamical quantity, from which other quantities may be derived. The heat capacity has been served for a long time to characterize the state of non-covalent interaction of macromolecules including proteins. For example, positive change is regarded as characteristic signature of protein unfolding. The nature of unfolded proteins has been investigated from a view point of this quantity. For the first time, we successfully measured the heat capacity change during the reaction of PYP in time domain. We found that the heat capacity does not change so much upon pR formation, whereas it increases upon pB formation. The larger heat capacity is interpreted in terms of the conformational change of the pB species such as melted conformation and/or exposure of the non-polar residues to the aqueous phase. The details of the experiment will be discussed.

J.S.Khan, Y.Imamoto, M.Kataoka, F.Tokunaga and M.Terazima : Heat capacity of the transient species during photo-reaction of PYP