

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657103

研究課題名(和文) 遷移状態に着目した蛋白質の折り畳み・構造変化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of protein folding and conformational change based on the characterization of the transition state

研究代表者

今元 泰 (Imamoto, Yasushi)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80263200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： Photoactive yellow protein (PYP) は光刺激をうけると、構造が変化して光信号を細胞に伝え、その後、元の状態に戻る(光反応サイクル)。光を吸収したPYPは、L M1 M2 PYPと変化するが、生理活性中間体であると考えられているM2では、部分的に蛋白質構造が変性していると考えられており、蛋白質の変性状態のモデルとして研究されてきた。本研究は光反応サイクル中の各中間体間の構造変化の遷移状態に着目し、構造変化メカニズムに関する知見を得た。

研究成果の概要(英文)： Photoactivation of photoactive yellow protein yields the physiologically active state called PYP. In PYP, the structure is partially unfolded, and photocycle of PYP is a good model to study the protein folding. Here we analyzed the photocycle of PYP based on the characterization of the transition state between the intermediates.

研究分野：生物物理学

キーワード：光生物学 構造変化 異性化 折りたたみ 中間体 吸収スペクトル 光センサー

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は、数 10~数 100 個のアミノ酸が遺伝子の情報にしたがって直鎖状につながった高分子である。ポリペプチドはアミノ酸間の相互作用によって一定の立体構造にフォールドされ、受容体、酵素、足場などの生理的な機能を獲得する。変性状態にあるポリペプチド鎖は自由度が非常に大きいため、ランダムに揺らぎながらから天然状態へとフォールドされると考えると、フォールディングには非常に長い時間がかかることになる(レヴィンソールのパラドックス)。しかし、実際の蛋白質フォールディングは非常に速いため、道筋を決めている遷移状態の情報を得ることが、蛋白質の折りたたみメカニズムを理解する上で本質であると考えられてきた。

フォールディングは変性状態から天然構造への構造変化であるといえるが、天然構造にある蛋白質でも、活性構造と不活性構造を切り替えることで、生理活性を調節している。このような生理的に重要な構造変化も、目的とする構造に速やかに切り替える道筋を明らかにするためには、遷移状態の解析が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

多くの蛋白質では、リガンドの結合やリン酸化などによって構造が変化し、生理活性を発揮する。また、必要がなくなれば元の不活性状態に戻る。蛋白質のフォールディング研究で明らかになった遷移状態の知見を、このような蛋白質の構造変化にも応用できるかどうかを検討するため、蛋白質の構造変化における各構造間の遷移状態に着目した。

モデル蛋白質として光を吸収すると構造変化を起こす Photoactive yellow protein (PYP) を用いた。PYP は光合成細菌の光走性のための受容体であると考えられている水溶性の蛋白質で、光刺激をうけるといくつかの光反応中間体が現れる光反応サイクルをもっている(図 1)。光反応中間体の中で、生理活性中間体であると考えられている PYP_{M2} では、部分的に蛋白質構造が変性するほど大きな構造変化が起こっていると考えられており、蛋白質の変性状態のモデルとして研究されてきた。本研究では、光吸収のあと PYP_{M2} が生成するまでの構造変化、あるいは PYP_{M2} から不活性構造へ戻る構造変化の遷移状態に着目した。

フォールディングの際の遷移状態は、変性状態にごくわずかに含まれるか、あるいは過渡的に存在するものなので、遷移状態を直接的にとらえることは困難である。そのため、フォールディング過程を熱力学的に解析することで、遷移状態に関する情報を得る。そこで本研究でも同様に、光反応サイクル中の各状態間の遷移を熱力学的に解析し、活性化エントロピー (ΔS^\ddagger)、活性化エンタルピー (ΔH^\ddagger)、熱容量変化 (ΔC_p^\ddagger) などの熱力学的パラメータを解析することで、蛋白質の構

造変化に関する遷移状態について検討した。

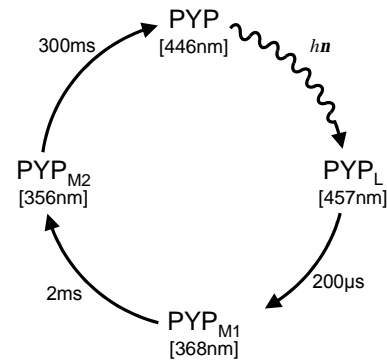


図 1: PYP の光反応サイクル

3. 研究の方法

PYP 試料は大腸菌に発現させたアポ蛋白質に p-クマル酸無水物を反応させることで調製した。

PYP を光刺激して構造変化を誘導するため、Nd:YAG レーザーの 3 倍波 (355 nm) をポンプレーザーとした波長可変の OPO レーザーを用いた。波長は、440 nm、強度は 1 mJ/cm² とした。吸光度の測定には Ocean Optics 社製の小型マルチチャンネル分光器 USB2000+を用いた。USB2000+の露光時間は最短でも 1 ms なので、マイクロ秒の時間分解能をもたせるため、パルス幅 1.5 μs のキセノンフラッシュランプを測定光源とし、励起レーザーと測定光のタイミングを BNC565 型ディレイパルスジェネレータで制御することでストロボ測定した。ペルチェ素子を組みこんだセルホルダーを用いることで試料の温度を 5°C ~ 50°C に保持した。

得られた過渡吸収スペクトルは数列化し、行列 **A** に格納した。行列 **A** を特異値分解法 (SVD) で処理することにより、スペクトル成分 (U スペクトル)、時間成分 (V スペクトル)、特異値 (S) に分解した。

$$\mathbf{A} = \mathbf{U} \times \mathbf{S} \times \mathbf{V}^T \dots$$

マイクロ秒~秒の反応は図 2 のとおりであるが、 k_2 と k_3 は約 100 倍違うこと、および解析の煩雑さを避けるため、PYP_L ~ PYP_{M2} までの反応 (a) と PYP_{M2} ~ PYP の反応 (b) を別個に解析した。

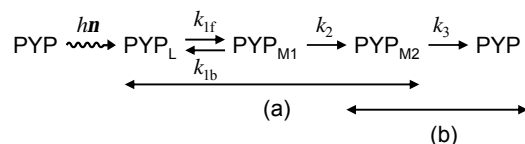


図 2: PYP が光を吸収した後の構造変化。PYP_L ~ PYP_{M2} までの反応 (1 μs ~ 10 ms) と PYP_{M2} ~ PYP の反応 (10 ms ~ 2 s) を別個に解析した。

(a) の反応を仮定した場合、V スペクトルは 2 つの指数関数の和であらわされ、得られる

速度定数 (K_1 , K_2) と素反応定数 (k_{1f} , k_{1b} , k_2) には以下の関係がある。

$$K_1, K_2 = \frac{k_{1f} + k_{1b} + k_2}{2} \pm \frac{\sqrt{(k_{1f} + k_{1b} + k_2)^2 - 4k_{1f} \times k_2}}{2} \dots$$

また、B スペクトルと PYP_L 、 PYP_{M1} 、 PYP_{M2} のスペクトル、および速度定数には以下の関係がある。

$$B1 = \frac{k_{1f} - K_2}{K_1 - K_2} \times PYP_L - \frac{k_{1f}}{K_1 - K_2} \times PYP_{M1} + \frac{K_2}{K_1 - K_2} \times PYP_{M2} \dots$$

$$B2 = \frac{K_1 - k_{1f}}{K_1 - K_2} \times PYP_L + \frac{k_{1f}}{K_1 - K_2} \times PYP_{M1} - \frac{K_1}{K_1 - K_2} \times PYP_{M2} \dots$$

式より、B2 スペクトルを既知の PYP_L 、 PYP_{M1} 、 PYP_{M2} のスペクトルに分解することで、 K_1 、 K_2 、 k_{1f} の関係を求めることができる。これと式を用いて k_{1f} 、 k_{1b} 、 k_2 を算出した。一方、(b) の反応では、V スペクトルの 10 ms 以降の部分を実数関数でフィッティングすることで、 k_3 を求めた。

これらの速度定数を温度に対してプロットし、Eyring の式 (式) でフィッティングすることで、各反応ステップの ΔS^\ddagger 、 ΔH^\ddagger 、 ΔC_p^\ddagger を求めた

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \times \frac{1}{T} - \frac{\Delta C_p^\ddagger}{R} \times \left(1 - \frac{T_0}{T}\right) - \frac{\Delta C_p^\ddagger}{R} \times \ln \frac{T_0}{T} \dots$$

ここで、 k は速度定数、 k_B はボルツマン定数、 R は気体定数、 T は温度、 T_0 は基準とする温度である。

4. 研究成果

OPO レーザーとキセノンフラッシュランプをディレイパルスジェネレータで制御することで、マイクロ秒の時間分解能を持つ過渡吸収スペクトルの測定システムを構築した。このシステムを用いて 1 μ s ~ 2 s まで、約 40 本のスペクトルを測定した。この一連のスペクトルを SVD 法で分解し、3 つずつの U スペクトルと V スペクトルを有意成分として抽出した。3 つの V スペクトルを 3 つの指数関数の和でグローバルフィットし、 K_1 、 K_2 、 k_3 を得た。また、各速度成分に対応する B スペクトルを計算した。式と式から、 k_{1f} 、 k_{1b} 、 k_2 を計算した。

同様の測定と解析を 5°C から 50°C まで、5°C 刻みで行った。得られた k_{1f} 、 k_{1b} 、 k_2 、 k_3

を測定温度に対してプロットし、式でフィッティングすることで ΔS^\ddagger 、 ΔH^\ddagger 、 ΔC_p^\ddagger を求めた (表 1)

これらのパラメータの中で、 PYP_{M2} から PYP に戻る際の ΔC_p^\ddagger が、大きな負の示すことがわかった。一般に、疎水部分が溶媒に露出すると、まわりの水分子がアイスバーグ構造をとるために熱容量が大きくなると解釈されている。これを PYP に当てはめると、負の ΔC_p^\ddagger は部分的に変性した PYP_{M2} で露出していた疎水部が、遷移状態では蛋白質内部に隠されることを示唆している。すなわち、 PYP_{M2} PYP の遷移状態はコンパクトな構造をもっており、この構造が発色団の構造変化を促進すると推測された。

以上のことは、アンサンブル平均として観測される PYP_{M2} の構造は、構造変化を引き起こす遷移状態の構造とは大きく異なっていることを示している。すなわち、従来のようなアンサンブル平均を求める構造解析だけでは構造変化メカニズムを明らかにすることは困難であると考えられる。今後は、遷移状態の解析から構造変化メカニズムを探ることが必要であろう。

表 1: PYP の中間体間の遷移状態における熱力学的パラメータ

	k_{1f}	k_{1b}	k_2	k_3
ΔS^\ddagger (J/M/K)	54.2 ± 5.0	-44 ± 12.8	49.8 ± 4.8	-89.7 ± 2.9
ΔH^\ddagger (kJ/M)	68.9 ± 1.5	40.8 ± 3.7	69.3 ± 1.4	42.4 ± 0.8
ΔC_p^\ddagger (kJ/M/K)	0.635 ± 0.205	-0.502 ± 0.523	0.396 ± 0.197	-2.94 ± 0.12

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

Yamazaki, Y., Nagata, T., Terakita, A., Kandori, H., Shichida, Y., and Imamoto, Y., Intramolecular interactions that induce helical rearrangement upon rhodopsin activation: Light-induced structural changes in metarhodopsin IIa probed by cysteine S-H stretching vibrations, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 289, No. 20, 2014, pp. 13792-13800.

DOI: 10.1074/jbc.M113.527606

Kojima, K., Imamoto, Y., Maeda, R., Yamashita, T., and Shichida, Y., Rod visual pigment optimizes active state to achieve efficient G protein activation as compared to cone visual pigments, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 289, No. 8, 2014, pp. 5061-5073.

DOI: 10.1074/jbc.M113.508507

Yamashita, T., Ono, K., Ohuchi, H., Yumoto, A., Gotoh, H., Tomonari, S., Sakai, K., Fujita, H., Imamoto, Y., Noji, S., Nakamura, K., and Shichida, Y., Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 289, No. 7, 2014, pp. 3991-4000.
DOI: 10.1074/jbc.M113.514075

Imamoto, Y., and Shichida, Y., Cone visual pigments, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有, Vol. 1837, No. 5, 2014, pp. 664-673
DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.08.009
<http://hdl.handle.net/2433/187363>

Maeda, R., Hiroshima, M., Yamashita, T., Wada, A., Nishimura, S., Sako, Y., Shichida, Y., and Imamoto, Y., Ligand-induced population shift leads to the activation of rhodopsin, a G-protein coupled receptor, *Biophys. J.*, 査読有, Vol. 106, No. 4, 2014, pp. 915-924.
DOI: 10.1016/j.bpj.2014.01.020
<http://hdl.handle.net/2433/185150>

Yamazaki, Y., Nagata, T., Terakita, A., Kandori, H., Shichida, Y., and Imamoto, Y., Mapping of the local environmental changes in proteins by cysteine scanning, *Biophysics*, 査読有, Vol. 10, 2014, pp. 1-7
DOI: 10.2142/biophysics.10.1
<http://hdl.handle.net/2433/185148>

Mendonça, L., Hache, F., Changenet-Barret, P., Plaza, P., Chosrowjan, H., Taniguchi, S., and Imamoto, Y., Ultrafast carbonyl motion of the photoactive yellow protein chromophore probed by femtosecond circular dichroism, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, Vol. 135, No. 39, 2013, pp. 14637-14643.
DOI: 10.1021/ja404503q

Imamoto, Y., Seki, I., Yamashita, T., and Shichida, Y., Efficiencies of activation of transducin by cone and rod visual pigments, *Biochemistry*, 査読有, Vol. 52, No. 17, 2013, pp. 3010-3018.
DOI: 10.1021/bi3015967

Liu, J., Yabushita, A., Taniguchi, S., Chosrowjan, H., Imamoto, Y., Sueda, K., Miyanaga, N., and Kobayashi, T., Ultrafast time-resolved pump-probe spectroscopy of PYP by a sub-8fs pulse laser at 400 nm, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, Vol. 117, No. 17, 2013, pp. 4818-4826.
DOI: 10.1021/jp4001016

Matsuyama, T., Yamashita, T., Imamoto, Y., and Shichida, Y., Photochemical properties of mammalian melanopsin, *Biochemistry*, 査読有, Vol. 51, No. 27, 2012, pp. 5454-5462.

DOI: 10.1021/bi3004999

Sato, K., Yamashita, T., Imamoto, Y., and Shichida, Y., Comparative studies on the late bleaching processes of four kinds of cone visual pigments and rod visual pigment, *Biochemistry*, 査読有, Vol. 51, No. 21, 2012, pp. 4300-4308.
DOI: 10.1021/bi3000885

〔学会発表〕(計9件)

Imamoto, Y., Single-molecule observation of the ligand-induced population shift of rhodopsin, a G-protein coupled receptor, 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama Royal Hotel, Nagahama, Japan, October 7, 2014.

今元 泰, 前田 亮, 廣島通夫, 佐甲靖志, 七田芳則, 構造ダイナミクスからみたロドプシンの活性化機構, 分子研研究会「ロドプシン研究の故きを温ねて新しきを知る」, 自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター大会議室, 2013年11月19日

Imamoto, Y., Kojima, K., Maeda, R., Oka, T., Yamashita, T., and Shichida, Y., Characterization of visual pigments in membrane environment using nanodiscs, The 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology, Novotel Sydney Central, Sydney, Australia, November 11, 2013.

Imamoto, Y., Yamazaki, Y., Nagata, T., Terakita, A., Kandori, H., and Shichida, Y., Light-induced structural changes of rhodopsin probed by cysteine S-H stretching vibrations, 15th International Conference on Retinal Proteins, Monte Verità, Ascona, Switzerland, October 1, 2012.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/shichida/home_jp.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今元 泰 (IMAMOTO, Yasushi)

研究者番号: 80263200