

## 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



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。

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

$$+ \frac{K_2}{K_1 - K_2} \times PYP_{M2}$$

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

$$- \frac{K_1}{K_1 - K_2} \times PYP_{M2}$$

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  $\Delta S^\ddagger$ 、 $\Delta H^\ddagger$ 、 $\Delta C_p^\ddagger$  を求めた

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \times \frac{1}{T} \dots$$

$$- \frac{\Delta C_p^\ddagger}{R} \times \left(1 - \frac{T_0}{T}\right) - \frac{\Delta C_p^\ddagger}{R} \times \ln \frac{T_0}{T}$$

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  $\mu$ 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  $\Delta S^\ddagger$ 、 $\Delta H^\ddagger$ 、 $\Delta C_p^\ddagger$  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  $\Delta C_p^\ddagger$  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  $\Delta C_p^\ddagger$  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

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

#### 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](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