



Title	Studies on vibrational energy transfer in proteins by utilizing the characteristic three-dimensional structures
Author(s)	山下, 聡
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87829
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (山下 聡)

論文題名

Studies on vibrational energy transfer in proteins by utilizing the characteristic three-dimensional structures
(特徴的な立体構造を活かしたタンパク質内振動エネルギー移動の研究)

タンパク質内の振動エネルギー移動の解明には、アミノ酸残基単位での直接観測することが不可欠である。これまで我々は、ヘムタンパク質であるミオグロビンを用いて、ヘムの光励起で発生した余剰エネルギーが移動する過程を、ピコ秒時間分解紫外共鳴アンチストークスラマン分光法によって直接観測してきた。先行研究で用いられていたミオグロビンは球状タンパク質であるため、フォールディング構造が複雑である(図1a)。そのため、ヘムとトリプトファン(Trp)残基間距離を等方向で変化させることや、等距離で方位を変えることはできず、タンパク質内エネルギー移動における距離依存性や方位依存性の系統的な観測はできなかった。

本研究では、エネルギー移動における距離依存性を調べるために、図1bに示す4本の平行な α ヘリックスからなるヘムタンパク質であるチトクロム b_{562} を用いた。チトクロム b_{562} では、Trp残基を α ヘリックスの1ターンずつ異なる位置に導入することで、ヘムから同じ方向へ等間隔にヘム-Trp残基間距離を等間隔に変化させることができる。この特徴を利用し、距離依存性を調べた。Trp残基が受け取るエネルギーの大きさは、ヘムからの距離が遠くなるほど小さくなった。また、Trp残基のエネルギーの立ち上がりは、ヘム-Trp間距離が大きくなるにつれ遅くなった。これは定性的に古典的な熱拡散の描像と一致していた。そこで、実験結果に対して二境界熱拡散モデルを用いて定量的な比較を行った。エネルギーの時空間分布は定量的にも古典的な熱拡散によってうまく再現できた。これはタンパク質の原子が密に詰まった構造によって、タンパク質内部を連続媒質として考えることができるためである。

エネルギー移動における方位依存性を調べるために、図1cに示す β バレル構造を持つヘムタンパク質であるニトロバインディンを用いた。ニトロバインディンの円筒形構造の内側にTrp残基を導入することで、距離を変えず、方位のみを変化させることができる。ヘムからの距離が同じTrp残基へのエネルギーの移動を観測すると、エネルギーの流入速度に違いがみられた。構造を比較するとTrp残基のヘムに対する配置の違いと流入速度の違いに相関がみられた。この相関は、Trpとヘムの原子間接触の度合いが異なることに起因する可能性が高い。つまり、原子間接触の度合いの違いから、エネルギー移動における異方性が生じていると考えられる。

これまでのタンパク質内エネルギー移動に関する研究ではTrp残基をプローブ分子として、TrpのアンチストークスW18バンド強度の時間変化に関する解析を行っていたが、その過渡エネルギーの定量的な解析はできなかった。そこで振動励起後の内部温度を議論するために、平衡状態での占有率と非平衡状態での占有率を比較した。Trpモデル分子の非平衡状態の占有率は、高温平衡状態の占有率とよく一致していた。このことは、非平衡の励起状態にあるTrpは分子単位で高温状態にあると考えられることを意味している。また、Trp水溶液の温度依存性を調べることで、Trpのラマンバンド強度と温度の検量線を得た。この研究から、Trpが持つ測定上の強みに加えて、内部温度の定量化を可能にするという新しい利点を示した。

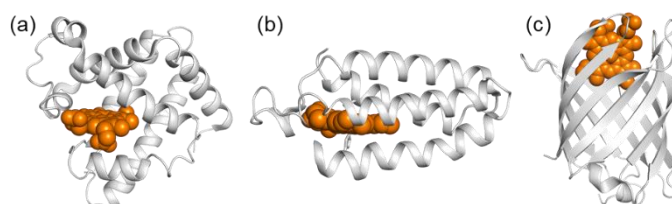


図1 ヘムタンパク質の立体構造を示した図。熱源分子をオレンジ色で示している。(a)これまでの研究で用いられてきた球状タンパク質。フォールディング構造が複雑である。(bとc)本研究で着目した特徴的な構造を持つタンパク質。規則的な周期構造を持っている。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 （山下 聡）		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 水谷 泰久
	副 査	教授 中澤 康浩
	副 査	教授 谷口 正輝

論文審査の結果の要旨

熱伝導は、最も基本的な化学過程のひとつである。バルクの空間スケールにおいては、熱伝導はしばしばフーリエの法則によって記述される。しかし、分子の空間スケールの現象に対して、このような熱拡散の概念を適用することはできない。なぜなら、この空間スケールにおいては媒質を均一とみなすことはできず、「熱伝導」は分子内・分子間のエネルギー移動として取り扱う必要があるからである。

山下聡君は、時間分解共鳴ラマン分光法の長所を最大限に活かして、タンパク質内のエネルギー移動をアミノ酸残基の空間分解能で観測し、エネルギー移動機構を明らかにした。本論文はその研究成果をまとめたものである。以下のように、主に 3 つの内容から構成される。

(1) アミノ酸残基の時間分解温度計測法の開発

アミノ酸側鎖のモデル化合物 18 種に対して、平衡状態および非平衡状態における、振動準位の占有率を計算した。トリプトファンモデルに対して得られた非平衡状態の占有率は、高温の熱平衡状態の占有率とほぼ一致した。このことは、トリプトファン残基の過渡的な振動励起状態のエネルギーを、ある振動モードのアンチストークスバンド強度比に基づいて定量化できることを示している。この結果を基に、アンチストークスバンド強度と温度の検量線を作成し、時間分解アンチストークス共鳴ラマンスペクトルに基づいて、トリプトファン残基側鎖の過渡的温度をピコ秒の時間分解能で計測する手法を確立した。

(2) タンパク質内エネルギー移動の距離依存性

α ヘリックスの周期性を活かして、タンパク質内エネルギー移動の距離依存性を系統的に調べた。ヘム（熱源）からトリプトファン残基の距離が異なる 5 種の変異体を作製し、トリプトファン残基の過渡的温度上昇および降下を比較した。その結果、エネルギー移動は原子間接触を介した経路を主に起きていることを明らかにした。

(3) タンパク質内エネルギー移動の方位依存性

β バレル構造が持つ円筒形の形状を活かして、タンパク質内エネルギー移動の方位依存性を系統的に調べた。ヘムからトリプトファン残基の方位が異なる 3 種の変異体を作製し、トリプトファン残基の過渡的温度上昇および降下を比較した。エネルギー移動速度には異方性が観測され、エネルギー移動はヘムとトリプトファン側鎖との接触面積に依存することが考えられた。

本論文の研究成果は、残基単位の時間分解温度計測法を開発し、さらにその手法を用いてタンパク質内エネルギー移動の機構を明らかにしたものであり、タンパク質の物理化学研究として意義深い。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。