中央大学理工学研究所論文集 第6号 2000 年 Journal of the Institute of Science and Engineering, Chuo University

単一 Trp 残基蛍光法と光合成蛋白質の内部局所環境

甲斐義幸*

A Fluorescence Study of Internal Structure of Single Trp Protein (PS II Protein)

Yoshiyuki Kai*

Abstract

In this study, the intrinsic tryptophan (Trp) fluorescence of the isolated 33kDa (PSII) protein and transient fluorescence spectra techniques were used in order to investigate the micro-environment around Trp-241 and the changes in the accessibility to the solvent water upon denaturation. And also the results obtained from the theoretical analysis of electrostatic properties of single Trp protein were discussed. It was confirmed that the region around Trp-241 maintained hydrophobic and tight conformation in the native state in which access to water molecule was restricted.

(1) はじめに

蛋白質はそれぞれのアミノ酸組成とアミノ酸残基配列をもち,特有のネイティブな立体構造をとっている. 光合成蛋白質の一つ、33kDa(PSII)蛋白質は葉緑体のチラコイド膜表面にある光合成系 PSIIを構成し、PS IIの Mn 活性領域への H₂O 分子の出入りに関係している. この蛋白質は構成するアミノ酸残基に単一の Trp (Trp-241)をもち,その吸収,発光スペクトルは周囲の環境を反映することから蛋白質内部の状態についての 情報を知る手がかりとなる.

33kDa 蛋白質は主に機能面からの研究が進められている¹⁾. また他にも,その蛋白質のフォールディングの キネティクスが Trp-241 の蛍光法によって研究され,シスチン ss 結合 (ジスルフィド結合) 部位の局所的なゆ らぎと関係すると報告されている²⁾.

ー般に蛋白質の蛍光は芳香族アミノ酸からのものであり、特に Tyr や Trp 残基からのものである。 蛋白質 の局所構造の研究には蛍光法がしばしば用いられる。 この蛍光法は、Gdn-HCl などの変成剤と ss 結合の還元 剤によって完全に変性させられた蛋白質では、その Trp 残基からの蛍光スペクトルがネイティブな状態より も極大波長が長波長へシフトし、変性状態の蛍光 (ブロードな形と約 350nm の極大値) になるという性質に基 づいている.

水系(極性)溶媒中でのTrp分子(Indole誘導体)の蛍光スペクトルではその長波長シフトはさらに著しく, この場合の原因は主に励起状態のインドール環にたいし,溶媒である水分子の極性の影響またはエキサイプ レックスの発光によると考えられている^{3,4)}. こうしたTrp分子の蛍光特製の研究から推測して蛋白質の変性 にともなう蛍光の長波長シフトもTrp 残基が水に囲まれた環境に移ったためであると考えられているが詳細 は十分には明らかでない.

本論文では、こうした蛍光法における考察のもとになっている蛋白質内の固有の Trp 残基からの蛍光の性 質を蛋白質の局所的構造との関連で、より詳細に、かつ系統的に調べることが目的である.

第一に,蛋白質のネイティブな状態では,変性状態より短い波長にTrp 蛍光極大をもつことが知られている.このことからおおむね疎水環境にあると推定される.ここでは,まずネイティブ状態でのTrp 残基周辺の局所的環境について考察する.それはまた,変性状態では,どのような環境になっているかを考察することで

^{*} 中央大学理工学研究所研究員, 同法学部(総合教育)

甲斐 義幸

もある.更には、変性(アンフォールディング)の途中の時間経過についても関係してくる.実際、本稿では 蛋白質の変性過程を時間分割蛍光スペクトルによって測定し、考察した.

こうした目的のために、さらにまた解析の容易さから単一の Trp 残基をもつ蛋白質に着目した.そうした蛋白質のなかで、ここでは 33kDa 蛋白質を対象とし、その Trp-241 残基の蛍光測定によって、その局所環境を 推定した.

光合成蛋白質である 33kDa (PSII) において、水分子との接触がコントロールされているとすれば光合成の 機能とも関係すると考えられる.

さらに適宜,単一 Trp 残基をもつ幾つかの他の蛋白質についても参照し,それらの Trp 残基周囲の局所環 境を溶媒効果の式によって推定する.

(2) 33kDa 蛋白質試料の調製および試薬

33kDa 蛋白質の調製方法は既に記述された⁵⁾方法を一部変更したものである. 原材料のホウレンソウはトリトン X-100 で処理された. 作られた PSⅡ 膜は-80℃で保存された. 33kDa 蛋白質はこの PSⅡ 膜試料から冷暗所において CaCl₂ 処理によって抽出された. さらに, PSⅡ 蛋白質のうち 24kDa 蛋白質と 18kDa 蛋白質を 分離,除去し 33kDa 蛋白質試料として精製し用いた.

Gdn-HCl は Fluka から, 溶媒として用いた酢酸アンモニウムは Phone-Poulenc から購入した.

蛍光測定および時間分割蛍光スペクトル測定には SLM 8000C Photon-Counting fluorometer を使用した. 励起光は Xe ランプからの光を分光した. 溶媒とそのラマン光の影響は測定スペクトルからは差し引かれている. 蛋白質濃度は吸光度から測定し、4μM (pH6.5,10mM 酢酸アンモニウム)溶液をつかった.

蛋白質溶液に Gdn-HCl を急速に混合し溶媒環境を変えることにより, 蛋白質の変性の経過を観測した. この混合の操作は手動でおこない, 直接, Gdn-HCl 液を蛋白質溶液に素早く注入した. そのデッドタイムは約 20 秒であった.

注入直後から時間分割スペクトルの測定を開始した.時間分割蛍光測定は 300~400nm にわたり, 60.4 秒の周期でおこなわれた.これを続けて 10回(周期)繰り返し,画像処理をした.

(3) 吸収, 蛍光スペクトルおよび Gdn-HCl 変性過程の時間分割蛍光スペクトル測定

〈図 1〉は 33kDa 蛋白質の分光的性質をあらわしたものである.図は①吸収スペクトル、②ネイティブ状態の蛍光スペクトル、③Gdn-HCl 変性状態(1.0M Gdn-HCl,変性操作後 24 時間)の蛍光スペクトルを測定したものである.〈図 1〉において、吸収スペクトル極大は 277nm である.蛍光スペクトル極大はネイティブ状態で 310nm、変性状態の蛍光極大は 342nm である.(波長 295nm で励起)図では、それぞれの極大値は便宜のためにノーマライズされている.

④は吸収微分スペクトル(図中, O-O'は基線である)であり、いくつかの山がみられる. それはこの蛋白質 (ネイティブ状態)の吸収スペクトルが277nmの極大と、いくつかの肩(259nm,284nm,293nm)をもってい ることを示している. このような構造をともなう吸収スペクトルはTrp単体分子では非極性溶媒において観 察されることから、33kDa蛋白質の内部でもTrp-241 残基は非極性の環境にあると推測される.

蛋白質内部には特殊な場合(膜蛋白質など)を除いて極性アミノ酸残基は存在していない. 従って,定性的 にみると Trp-241 残基は蛋白質の内部にあって周囲には溶媒の水分子は存在していないことを示している. この点について後に,さらに詳しい議論を行う.

次に、ここでネイティブな 33kDa 蛋白質を 1.0M、0.75M および 0.5M の Gdn-HCl 環境に移し、その後の時 間経過(トランジエント)を蛍光時間分割スペクトルで測定した。1.0MGdn-HCl の場合、Trp-241 はこの蛍光 スペクトルの形から判断すると、約4分後にはネイティブ状態の環境から変性状態の環境にかわっている。 〈図 2 参照〉1.0M と 0.75M の場合は最終的なスペクトルの形は同じであり、342nm に極大値をもっている。 しかし、途中の経過は非常に複雑であって、アイソエミッシブポイントは存在していない。この変化は 0.5M、 0.75M においてさらに顕著に現われている。

単一 Trp 残基蛍光法と光合成蛋白質の内部局所環境



図1





この複雑な時間分割蛍光スペクトルは蛋白質の変性による構造変化にともなう Trp-241 残基の局所的な環 境変化を反映していると考えられる.

この Trp-241 の周囲の局所環境の変化について、時間分割蛍光スペクトルの解析の為につぎのような手続きを選んだ.

まず、ここで一つのモデルを採用する. それは変性途中の蛍光スペクトル(以下,蛍光スペクトルは単にス ペクトルと書く)を、ネイティブな状態(N,添字 n)のスペクトルと変性状態(U,添字 u)のスペクトルと のある割合(0から1まで)の和として表わしたものである. ただしそれぞれの状態での極大ピークの値を1 とした.

変性途中のスペクトルをこのモデルで再現を試みた結果,測定されたスペクトルは,N状態とU状態のスペクトルの単純な和モデルとしてほぼ再現することができた.

つまりある時刻 (t) での途中経過の蛍光スペクトル (St) はモデルとしたネイティブスペクトル (Sn) と変成スペクトル (Su) の和として、St(λ) = p * Sn(λ) + q * Su(λ) となる.

途中経過の各スペクトルの強度の解析の結果は図 3 に示されている. ただし、〈図 3〉において p、q はそれぞれ t 時刻の Sn、Su の極大強度の割合(ただし、Sn,max=Su,max=1 とする)を表わしている. p、q \leq 1.0 で ある.

甲斐 義幸



0.5M Gdn-HCl では変性は測定した 10 分間では最終まで進まず(〈図 3〉では点線で示されている), 10 分後のスペクトルはまだ,ネイティブ状態と変性状態それぞれのスペクトルの混合であり,平衡状態が保たれていた.一方, 1.0M Gdn-HCl では 10 分後には,ほぼ完全に変性状態となる. 0.75M では両者の中間である.

次に、このモデルによって解析した結果と対応できるようなキネティクスを考える.まず、簡単にネイティ ブ状態 N と変性状態Uの平衡的移行について検討してみると、〈図 3〉を参照すると、このような単純なモデル では表わすことはできない.つまり〈図 3 (0.75M(N),(U)〉でわかるように、曲線は一時停滞部分があり、 その結果、pの減少とqの増加とは 0.5を境にして逆対称になっていないからである.つまり変性の時間経過 は何らかの中間状態(I)を経ていると考えざるをえない.その詳細はここではわからない.秒から分の単位 の比較的長い経過時間を考えると ss 結合が関与している可能性がある.²⁾

(4) 単一蛋白質内部の極性と 33kDa 蛋白質の Trp-241 についての考察

インドールや3メチルインドール(3MI)の蛍光は水溶液中では長波長側に大きくシフトした蛍光をもつ (それぞれ357および369nm)ことが知られている.この著しいシフトにたいして Walker らはエキサイプ レックスモデルを提唱している.⁴⁾

一方、単一 Trp 残基をもつ蛋白質の蛍光極大はアズリンの 308nm⁶⁾、33kDa 蛋白質の 310nm、RNase T1の 320 nm⁷⁾、またヒト血清アルブミンの 337nm⁸⁾ など広く分布する。いずれの場合でも s-s 結合を還元した状態で、さらに Gdn-HCl(>6M) もしくは 8M-Urea 変性によって極大値は 350nm にシフトする。以下、この蛍光極大の特徴を考察する。

ー般にインドール類の溶媒効果を受けた蛍光の極大は溶媒の誘電率 D に依存するものとすれば,次式(1) が成り立つ.

ただし、 $\Delta 6_{g}$ 、 $\Delta 6_{e}$ は基底状態 (g)、励起状態 (e) の溶媒効果による変化.

 $h\nu_{a}$, $h\nu_{f}$ は非極性溶媒中でのフランクコンドンエネルギーに相当する吸収(添字 a), 蛍光(添字 f) 極大のエネルギー. $hcf_{a}(D)$, $hcf_{f}(D)$ は極性溶媒中での吸収, 蛍光極大のエネルギーである. D は誘電率である. 各エネルギー単位は cm^{-1} とする. h はプランク定数, c は光速度である.

$$hc(\Delta \delta_g - \Delta \delta_e) = h(\nu_a - \nu_f) - hc(\delta_a(D) - \delta_f(D))$$
(1)

いわゆる solvent function F (D,n) に関する理論より^{3,9,10,11)}, 左辺は δ ・F (D,n) となる. n は屈折率. ただし、F(D,n)=2[{(D-1)/(D+2)}-{(n²+2)}]

また $\delta = (\Delta \mu)^2 / a^3$; a は空所(着目分子のある)の半径である. $\Delta \mu$ は双極子モーメントの変化をあらわ

す. 式 (1) の右辺第一項は孤立分子の Stokes shift (一定) である. これらの蛋白質の水溶液 (透明) では, 屈折率は水のそれに近い値, n=1.358 (波長 303nm) として, F (D, n) から D の値が推定できる.

Lami,H. ら^{10,11}によると 3MI の電子状態は¹ La, ¹Lb のエネルギー順位が互いに接近していて極性溶媒中 では順位の逆転がある.こうした吸収スペクトルの同定から 3MI をタンパク質の Trp 残基のモデルとして採 用する.同じく、3MI について、溶媒に依存する $\Delta \delta_g$ の値は $\Delta \delta_e$ のそれ (4200 cm⁻¹) の 5%以内である.従っ て、ここで $\Delta \delta_g$ を無視することにする.この仮定で式(1) は蛍光だけの式となり、次の様に変形できる.

$$hc\delta_{f}(D) = k (const.) - \delta \cdot F(D,n)$$
⁽²⁾

式 (2) において、 δ 、kの値を推測するために、Lami,Hらの実験データ¹¹⁾と比較して、ここで δ として 2800 を採用する. 同様にして、k について非極性溶媒であるシクロヘキサンの 3MI の吸収極大値を採用して、k = 32786 cm⁻¹ (305nm) を得、これを式 (2) に当てはめて蛋白質に適用する.

ここで単一 Trp 残基を有する蛋白質の中で,アズリン, RNaseT1 およびヒト血清アルブミン(HSA)を参照し,各 Trp 残基の蛍光極大値を式(2)に代入することによって,計算からこれらの蛋白質における単一 Trp 残基の周囲の局所環境の「みかけの F(D,n)」の値を求めることができる.

その計算によって RNase T1 では F=0.548 である. また 33kDa 蛋白質の場合では F=0.188 となる. こうして蛍光スペクトルの溶媒効果についての式を変形した式(2)を蛋白質に応用し、それぞれ計算した F 値をもとに蛋白質内部の Trp 局所環境の疎水状態を推定し 〈表 1〉に示した.

| | | F(D, n) 値 * | nm (cm^{-1}) | (nm) λ exc |
|--------|----------------------------|--------------------|------------------|---------------|
| ネイティブ型 | AZURIN | 0.113 | 308 (32476) | (292) |
| | 33kDa(PSII) | 0.188 | 310 (32258) | (295) |
| | RNase T1 | 0.548 | 320 (31250) | (290) |
| | HSA | 1.11 | 337 (29673) | (300) |
| 変性型 | Gdn-HCl 変性 | 1.27 | 342 (29239) | (295) |
| | ss 還元 Gdn-HCl 変性 | 1.50 | 350 28571 | |

*F=0 のとき 350nm, λ exc は励起光の波長

表1

蛋白質はヘテロな内部環境をもち、内部の誘電率の見積りは容易ではないが、D.C.Ress¹²⁾ によると蛋白質内 部のその値は 1~5 となっていて、ここで得た値はこの値の範囲にある.

またネイティブ状態の 33kDa 蛋白質では Trp-241 の周囲の局所環境の誘電率は非極性溶媒に近い値である.

次に、式(2)を利用し、変性状態における蛋白質の蛍光極大値について見積もってみる.

s-s 結合を還元し、かつ Gdn-HCl で完全に変性させた状態ではスペクトル極大は 350nm である. これを式 (2) にいれて見積ると、その F 値は 1.50 である. この値は水の溶媒関数の値、1.51 に一致する. このことは完 全な変性状態において、Trp 残基はほぼ溶媒の水分子に囲まれていて、その蛍光の性質は通常の溶媒効果とし

甲斐 義幸

て説明できることを意味している.

一方, Gdn-HClのみによる変性では 33kDa 蛋白質の場合,実測の蛍光極大は 342nm であり,溶媒水分子との接触は完全ではない。

これらの結果からすると、蛋白質の Trp 残基の場合、たとえ変性状態であっても、従来の研究からエキサイ プレックスとして説明されているインドールや 3MI などの水溶液中での蛍光の場合とは異なっていると結論 できる.

(5) 溶媒の水分子の寄与について

Abe¹³⁾ は直接溶媒分子と溶質分子の相互作用を双極子近似を用いた計算で,角度成分の平均処理をした結果,距離依存の項と,双極子エネルギーの項に分離し,さらに距離依存の項を近似式で表わすことができることを示した.すなわち式(3)となる.

$$hc(\Delta \delta_{g} - \Delta \delta_{e}) = \Sigma R_{p}^{-6} \cdot [双極子エネルギーの項]$$

= { $\Delta I + \Delta II + \Delta II$ } · [双極子エネルギーの項] (3)

但し、 R_p は溶質分子の中心から各溶媒分子までの距離、 ΔI 、 ΔII 、 ΔII は半径a=3.0Åをもつ溶質分子を囲む 球の外側に仮定した第一~第三層までの水分子の層(厚さ3.0Å)であり、第四層以降は微小として無視されている.

各層の値を Abe¹³⁾ に従って計算すると、Δ I =0.20(87%)、Δ II =0.025(11%)、Δ III +···=0.0003(<2%) である.

このことから考えるとネイティブ状態の 33kDa 蛋白質の Trp 残基の周囲が疎水的環境にあるという上記の 結果に基づいて,仮にこの蛋白質の蛍光波長シフトが純粋に水の影響で起ったと考えると、その波長シフトの 値では(3)式の計算からは少なくとも第一層の水分子の寄与はない.つまり溶媒水分子は最近接の周囲には存 在しないことを示している.これは蛋白質の構造に当てはめてみるとネイティブ 33kDa 蛋白質 の Trp 残基は 蛋白質表面からは内部にあって,溶媒の水分子から隔離されていることを示している.この状態は一般には 「埋もれた(buried)」状態と呼ばれている.

(6) 結論

Trp 単体分子である 3MI における蛍光の溶媒効果(エクサイプレックスのような特殊な相互作用は除く)を 蛋白質内部に適用できると仮定して,蛋白質内部の Trp 残基からの蛍光スペクトルについて適用出来る式(2) を考えた.

その(2) 式により 33kDa (PSII) 蛋白質について計算すると Trp-241 の蛍光にたいして F(D,n) の値は, F=0.19 である. このことから Trp-241 の周囲には少なくとも最近接の第一層領域内には溶媒の水分子は存在 しない. この値は例えば非極性溶媒である di-isopenthyl ether (F=0.224,D=2.8) に近い値である. この F 値は蛋白質によって異なり、単一 Trp 残基のおかれた環境が各々大きく異なることを示している. そうした 「埋もれた」度合もそれぞれ異なっていることが F 値から知ることができる.

それに対して、蛋白質の変性(D)状態は最近接領域まで水分子に囲まれていて、蛍光極大(max=350nm) は水の溶媒効果として説明可能である。一方、ss 結合をもった蛋白質では Gdn-HCl のみによる変成状態(U) では十分に溶媒水分子と接触した状態ではないことも明らかになった。こうした蛋白質の Trp 残基の蛍光特 性は、インドールや3メチルインドールの分子が特殊な相互作用をし、水分子とエキサイプレックスを形成す るのとは異なる。

以上の考察から、33kDa 蛋白質の場合 Trp 残基の周囲の局所環境は蛋白質表面から離れた内部に「埋もれた」状態にあり、疎水環境であり、Gdn-HCl による変性で水に接する環境に移る.

この議論は33kDa 蛋白質以外でもRNaseT1のように比較的,波長シフトの少ない蛋白質の場合には同様

の議論が成り立つと考えられる.しかし、ヒト血清アルブミン(341nm)のように蛍光スペクトルの波長シフトがより長い波長に観測されるいわば表面に近く半ば露出した Trp 残基の場合については水分子による寄与が大きいと考えられる.

また, 33kDa 蛋白質の Gdn-HCl による変成の過程は複雑であり,中間状態を含む秒または分単位のゆっくりした時間経過を経る. これは ss 結合が関与していることも考えられる.

謝辞

この論文の一部(33kDa 蛋白質の調製および時間分割蛍光測定)は Tom Wydrzynski 氏(Research School of Biological Science, The Australian National University, Australia)に協力して頂いた.氏に感謝します.

参考文献

- [1] T.Wydrzynski,W.Hiller and J.Messinger (1996) PHYSIOLOGIA PLANTARUM 96, 342-350
- [2] S.Tanaka, Y.Kawata, K.Wada, and K.Hamaguchi (1989) Biochemistry 28,7188-7193

[3] N.Mataga, Y.Torihashi, and K.Ezumi (1964) Theoret. chim. Acta 2,158

- [4] M.S.Walker, T.W.Bendner and R.Lumry (1967) J.Chem.Phys., 47, 1020
- [5] Berthold D.A. et. al., (1981) FEBS Letter 134,231-234
- [6] A.F-Agro, G.Rotilio et.al (1970) *Biochemistry* 9, 2009-2014
- [7] Y.Kai and K.Imakubo (1979) Photochem.Photobiol., 29, 261-265
- [8] M.Sogami, K.B.Itoh and Y.Nemoto (1975) Biophys. Acta 393,446
- [9] H.Lami (1977) J.Chem.Phys. 67,3274-3281
- [10] H.Lami and N.Glasser (1986) J.Chem.Phys.84, 596-604
- [11] A.T.Amos and B.L.Burrows (1873) Advanced in Quantum Chemistry, 7, 289-313
- [12] D.C.Ress J.Mol.Biol., (1980) 141,323-326
- [13] T.Abe (1965) Bull.Chem.Soc.Japan 38, 1314-1318