

# 化学修飾ヘムタンパク質の光ダイナミクスに関する研究

Photophysical property of chemically-modified hemoprotein

塚原 敬一<sup>1)</sup> 高島 弘<sup>1)</sup> 村上 洋<sup>2)</sup>

Keiichi TSUKAHARA Hiroshi TAKASHIMA Hiroshi MURAKAMI

<sup>1)</sup>奈良女子大学 <sup>2)</sup>原子力機構

ヘムタンパク質の一種であるシトクロム c(cyt c)について、表面に存在する 6 つのリジン側鎖に DNA 結合性白金(II)錯体を化学修飾し、それぞれの異性体を分離した。この修飾 cyt c は、修飾された位置に依存して、水溶液中 450 nm 付近に光励起一重項由来の異なる強度の蛍光を示す。これは分子内消光移動反応に基づいているが、この反応過程ダイナミクスについて、蛍光寿命測定から評価し、Förster 型のエネルギー移動反応として解析した。

**キーワード**：ヘムタンパク質、DNA、光電子移動、蛍光寿命、白金錯体

**1. 目的** 本研究の最終的な目的は、ヘムタンパク質表面への金属錯体化学修飾反応によってヘムタンパク質-DNA 複合体を形成させ(引用文献参照)、その複体内光誘起電子移動反応・エネルギー移動反応特性を詳細に検討することである。本研究課題における具体的実験は、平成 18 年 12 月以降に開始したが、これまでに金属錯体修飾ヘムタンパク質の蛍光寿命測定における最適な測定条件(レーザー、観測波長、時間領域、試料濃度等)を決定するため、ヘムタンパク質の補因子であるポルフィリンに着目し、亜鉛ポルフィリンを用いた蛍光寿命測定を行った。これらの予備の実験を経て、本期間の実験では、ヘムタンパク質の一種である cyt c 表面に、DNA 結合性白金(II)錯体を修飾し、その蛍光寿命測定を行った。

**2. 方法** cyt c 表面に修飾する、DNA 結合性白金(II)錯体として、我々は 2,3-ジアミノプロピオン酸誘導体である新規ジアミン型配位子 dapap を含む [Pt(bpy)(dapap)](bpy=2,2'-bipyridine)錯体を合成し、これを cyt c 表面に存在する 6 つのリジン側鎖のうち一つに修飾し、それぞれを分離した。この修飾 cyt c (cyt c-[Pt(bpy)(dapap)])は、水溶液中 450 nm 付近に光励起一重項由来の強い蛍光を示す。その強度は、修飾された位置に依存することがわかった。そこでこの消光過程ダイナミクスについて、光量子施設内フェムト秒レーザーシステム(CPA 1000)を用いた蛍光寿命測定を行った。

**3. 研究成果** 上記の測定より、cyt c-[Pt(bpy)(dapap)]の各異性体の蛍光寿命は二成分解析により算出し、短寿命成分が 0.4-0.6 ns (30%)の範囲内に、長寿命成分が 4.2-5.4 ns (70%)の範囲内にあることがわかった。また、これらの値は全て、cyt c と [Pt(bpy)(dapap)]の分子間 1:1 混合系よりも短寿命であることから、cyt c 中のヘム(鉄(III))によって白金(II)錯体の蛍光が分子内消光されたことが明らかとなった。

**4. 結論・考察** cyt c-[Pt(bpy)(dapap)]の各異性体における蛍光寿命の相違は、定常光蛍光スペクトル測定から得られるピーク強度の違いにほぼ対応した。またそれらの分子内消光反応は、ドナー-アクセプター間の距離を through-space で見積もったところ、Förster 型のエネルギー移動反応であることが示唆された。現在、cyt c-DNA 複合体の構築にあたり、蛍光スペクトルによる滴定実験から、cyt c-[Pt(bpy)(dapap)]は未修飾の cyt c と比較して約 2 倍の高い DNA 親和性(結合定数  $K$ )を示すことが明らかになっている。また蛍光偏光スペクトル測定から、DNA との結合には、白金(II)錯体部分と DNA との相互作用が重要であることが示唆された。

## 5. 引用(参照)文献等

Synthesis and Spectroscopic Property of Reconstituted Zinc-Myoglobin Appending a DNA-binding Platinum(II) Complex, *Chem. Biodiv.*, 2008, in press.