

バクテリオロドプシンのプロトン放出基としての プロトン化水クラスターの構造解析

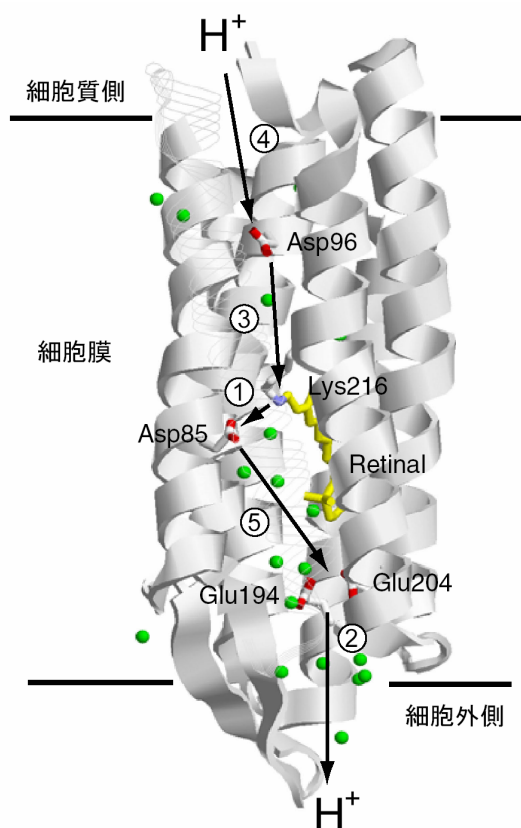
(名工大院工) ○神取秀樹、Victor A. Lorenz-Fonfria、古谷祐詞

【序】 最も理解の進んだプロトンポンプ蛋白質であるバクテリオロドプシンの場合、4 個のプロトン結合基を経由する 5 回のプロトン移動の結果として 5 ナノメータほどの膜を貫通してプロトンが能動輸送される[1]。光異性化反応が起こると、レチナルシッフ塩基のプロトンが L 中間体から M 中間体への遷移に伴い約 50 μs で Asp85 へと移動する。一方、解離したシッフ塩基は反対側の Asp96 からプロトンを受け取ることにより、一方向のプロトン輸送が実現する。我々はレチナルシッフ塩基の部位が方向性を決定することを、クロライドポンプへの機能転換[2]や内部結合水の水素結合とプロトンポンプ活性との相関[3]などから明らかにしてきた。一方、プロトン放出基はポンプ活性には必須でないものの、効率のよいポンプサイクルには重要であることが知られている。しかしながら、細胞外側部位にある Glu194, Glu204 の解離の信号が赤外分光によって捉えられなかったため、その候補として消去法的に水が考えられてきた。唯一の実験的な根拠は、時間分解赤外分光で観測された 2000 cm^{-1} 付近の continuum band と呼ばれるブロードな負の信号であったが[4]、これが水に由来するという証拠はなかった。

今回、我々は時間分解赤外分光法を用いて、室温における水の信号の変化を計測した。特に、(1) 最初のプロトン移動の前後に生成する L, M 中間体における内部結合水の信号は室温と低温で同じかどうか、(2) プロトン放出基として水クラスターが実際に存在するかどうか、について検討した[5]。

今回、我々は時間分解赤外分光法を用いて、室温における水の信号の変化を計測した。特に、(1) 最初のプロトン移動の前後に生成する L, M 中間体における内部結合水の信号は室温と低温で同じかどうか、(2) プロトン放出基として水クラスターが実際に存在するかどうか、について検討した[5]。

【実験】 高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* から紫膜（蛋白質としてバクテリオロドプシンだけを含む）を精製し、BaF₂ 窓板上で乾燥させたフィルム試料を相対湿度 92 % の条件で水和した。蛋白質 1 分子あたり 800 個程度の水分子を含むこの条件では、光反応サイクルは遅くなるが正常なプロトンポンプが起こることが知られている。この試料に対して、レーザー励起（波長 532 nm, 繰り返し 10 Hz）と同期させたステップスキャン FTIR 法（波数分解能 8 cm^{-1} , 時間分解能 5 μs ; Bruker 社 IFS 66v/S）により時間分解赤外スペクトルを得た。水分子の振動の帰属のためには、H¹⁸O で水和した試料に対する測定を同条件で行った。



【結果と考察】 水和量を厳密に制御したバクテリオロドプシン試料の時間分解計測により、初めて $4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ の波数領域での高精度の赤外差スペクトル測定が実現した[5]。200 μs までの時間領域で現れる（試料からの熱放出による）バルクの水の温度上昇成分を差し引くことで、水の O-H 伸縮振動領域の時間分解スペクトルを得た。その結果、170 K の L 中間体に特徴的な $3600\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ の水の強いバンドは室温では全く観測されなかった。水素結合の弱いこれらの水は、変異体実験から疎水的な細胞質側に存在すると帰属されているが、実際には低温のアーティファクトであることがわかった。一方、230 K の M 中間体の水のスペクトルは室温とよく一致していた。プロトンポンプ活性をもつ蛋白質には強い水素結合を形成した水分子が存在するという事実[3]は、低温で測定した基底状態の水分子の水素結合構造が、生理的な条件にも当てはまることを示唆している。一方、本研究から、L 中間体の水には低温と室温の違いが顕著であったのに対して、M 中間体ではほぼ完全に一致することがわかった。水の信号に対する両中間体の差には、ガラス転移温度に関わる蛋白質ダイナミクスが影響しているものと考えられる。

さてプロトン放出基に関して、我々も $2000\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ の continuum 信号を得ることができたが、興味深いことに 230 K ではこのような負の信号は観測されなかった。我々は本研究において注意深い実験から continuum band に水の同位体効果を観測し、ブロードな信号には水の振動が含まれることを結論した。Continuum band が水の振動成分を含むことが初めて明らかになったのである。本実験により、永年の未解明課題であった「バクテリオロドプシンのプロトン放出基は何か？」という疑問に決着がついたわけであるが、それにしても蛋白質内部という疎水環境において、プロトン化水クラスター構造が 2 個の負電荷をもったグルタミン酸 (Glu194, Glu204) とともに安定に存在するのは不思議である。X線結晶構造からその部位を推定するのは困難であるが、私の発表ではこのようなユニークな蛋白質場のプロトン化水クラスターについて議論したい。

- [1] 神取秀樹, *日本物理学会誌* **56**, 75-82 (2001); 柴田幹大, 神取秀樹, *生物物理* **44**, 113-117 (2004).
 [2] J. Sasaki, L. S. Brown, Chon, Y.-S., H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman and J. K. Lanyi, *Science* **269**, 73-75 (1995); M. Shibata, K. Ihara and H. Kandori, *Biochemistry* **45**, 10633-10649 (2006).
 [3] Y. Furutani, M. Shibata and H. Kandori, *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 661-666 (2005); 神取秀樹, *現代化学* **414**, 51-57 (2005).
 [4] R. Rammelsberg, G. Huhn, M. Lubben and K. Gerwert, *Biochemistry* **37**, 5001-5009 (1998).
 [5] V. A. Lorenz-Fonfria, Y. Furutani and H. Kandori, *Biochemistry* **47**, 4071-4081 (2008).

