

2C21 バクテリオロドプシンの光反応初期過程におけるタンパク質ダイナミクス

(阪大院理¹、名工大院工²)

○水野 操¹、柴田 幹大²、山田 純也²、神取 秀樹²、水谷 泰久¹

【序】バクテリオロドプシン (BR) は、高度好塩菌の紫膜中に含まれる光駆動プロトンポンプタンパク質であり、細胞内から外へプロトンを能動輸送する。BR の発色団はレチナールであり、光吸収により全トランス型から 13 シス型に異性化する。これが引き金となって、タンパク質部分の構造変化が誘起され、タンパク質内をプロトンが移動する。ポンプ機構を理解するためには、構造変化のダイナミクスを、部位ごと、段階ごとに明らかにする必要がある。レチナール発色団の構造ダイナミクスについては、これまで数多くの研究例がある。しかしながら、機構解明に重要と考えられるタンパク質部分の初期過程を、室温において実時間で調べた例は少ない。われわれは、共鳴ラマン効果を利用して、タンパク質部分に含まれているトリプトファン (Trp) やチロシン (Tyr) 残基に由来する振動スペクトルを、部位特異的に、かつピコ秒の時間分解能で観測することで、タンパク質の初期高次構造ダイナミクスを調べている。今回、BR の光サイクル初期過程において、レチナール発色団の構造変化に連動した、タンパク質部分のピコ秒ダイナミクスを捉えることに成功したので、これを報告する。

【実験】時間分解紫外共鳴ラマン測定では、チタンサファイヤレーザーから出力されたピコ秒パルス光をふたつに分け、種々の非線形光学効果による波長変換を行い、BR の光反応を開始させるための可視ポンプ光 (565 nm) と、タンパク構造変化を検出するための紫外プローブ光 (225 nm、238 nm) を発生させた。BR を含む膜断片を超音波破碎し、その懸濁溶液の液膜に、それぞれの光パルスを室温下で集光し、タンパク質からの紫外共鳴ラマン散乱光を得た。迷光除去のためプリズム型前置分光器をフィルターとして用いた後、ラマン散乱光を主分光器で分散し、CCD 検出器で検出した。

【結果と考察】図 1(a)に波長 225 nm のプローブ光を、図 1(b)に波長 238 nm のプローブ光をもちいて測定した BR のピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを示す。明順応状態の紫外共鳴ラマンスペクトル (各図、黒のスペクトル) には、BR 中に含まれる 8 個の Trp 残基と 11 個の Tyr 残基の寄与がすべて含まれている。時間分解スペクトルは、光反応によるスペクトル変化を差スペクトルで示している (各図、赤のスペクトル)。これらのスペクトルには、構造変化した Trp および Tyr 残基に由来する変化分のみが観測された。

プローブ光 225 nm の条件では、W で表示される Trp 残基の振動バンドが強く観測された。時間分解差スペクトルが負のバンドを示すことから、明順応状態に比べ反応中間体では、Trp 残基のバンド強度が減少することがわかった。アミノ酸残基の構造変化により、ラマン励起プロフィールはシフトする[1]。プローブ光の波長が励起プロフィールの極大波長 (224 nm) に近いことから、スペクトル変化において強度減少が顕著に観測されたと考えられる。1555 cm^{-1} に現れる W3 バンドの強度の時間変化を図 2 に示す。Trp 残基のバンド強度は、①光励起に伴い減少する、②30 ps の時定数で回復する、③1000 ps まで一定である、というふるまいを示した。このことから、構造変化を示す Trp 残基周辺のタンパク質構造には、30 ps の時定数を示すダイナミクスがあることが明らかになった。

プローブ光 238 nm の条件では、Y で表示される Tyr 残基のバンド強度が相対的に大きく観

測された。時間分解差スペクトルには、Trp、Tyr 残基の両方の変化がみられた。W3 および Y7a バンドには、光反応による波数シフトを意味する微分形の差スペクトルが、W7 および Y9a バンドには、強度変化を表す差スペクトルが観測された。これらは、5 ps と 100 ps のスペクトルの間でほとんど違いがみられなかった。一方で、W16 および W18 バンドは、5 ps では変化がなかったのに対し、100 ps では負の強度を示した。また、Y8a バンドは、5 ps で大きく負の強度を示したのに対し、100 ps では負のバンドが消失した。上述したスペクトル変化の異なる時間挙動は、Trp、Tyr 残基それぞれについて、異なるダイナミクスを示す複数（少なくとも2つ）の残基が、スペクトル変化に寄与していることを示唆している。

図 1(b)に示した 100 ps のスペクトルは、ナノ秒時間分解測定で観測された KL 中間体の紫外共鳴ラマン差スペクトル[2]に類似している。これをもとに、100 ps のスペクトルは KL 中間体、5 ps のスペクトルは K 中間体と帰属した。したがって、Trp 残基の 30 ps の構造ダイナミクスは、K 中間体から KL 中間体への構造変化を表していると考えられる。5 ps における W3 バンドの波数シフトは、インドール環の配向変化に、Y7a バンドの低波数シフト、Y8a バンドの強度減少は、それぞれヒドロキシル基のプロトン供与性の増加、水素結合強度の強化に由来すると考えられる。これらは、K 中間体における Trp182 の環の配向変化、Tyr57、Tyr185 のプロトン供与性や水素結合強度の変化と帰属できる。100 ps における W16、W18 バンドの強度減少は、Trp 残基周辺の疎水性相互作用の減少に、Y8a バンドの強度回復は、K 中間体構造からの Tyr 残基の水素結合強度の低下に由来すると考えられる。KL 中間体の生成に伴い、発色団周辺の水素結合ネットワークが変化することが示唆されている[3]。上記のスペクトル変化は、この構造変化が引き起こした、Trp86 の疎水性の減少、Tyr57、Tyr185 の水素結合強度の変化によると帰属できる。

【参考文献】 [1] Z. Chi and S. A. Asher, *JPCB* **102**, 9595 (1998). [2] S. Kaminaka and R. A. Mathies, *Laser Chem.* **19**, 165 (1999). [3] S. J. Doig, P. J. Reid, and R. A. Mathies, *JPC* **95**, 6372 (1991).

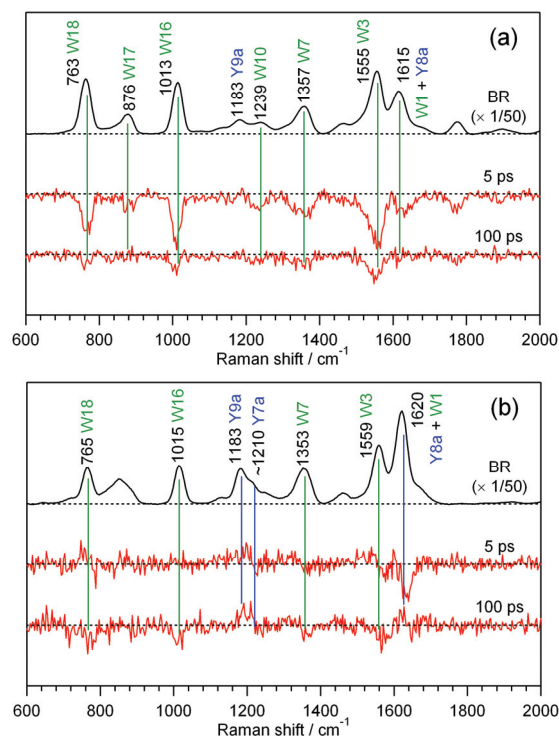


図 1 BR のピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル. プロブ光の波長 (a) 225 nm, (b) 238 nm.

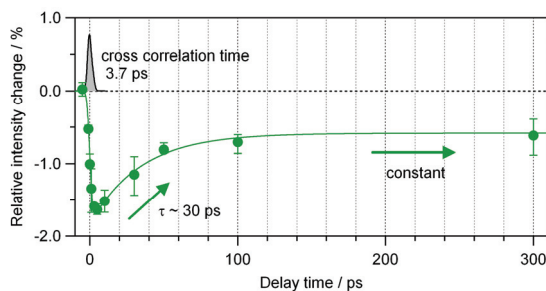


図 2 W3 バンド強度の時間変化. プロブ光の波長 225 nm.

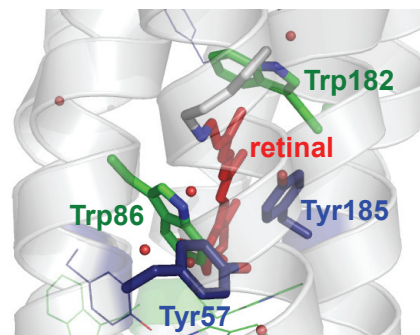


図 3 レチナル周辺の Trp および Tyr 残基.