

2P056

脱プロトン化した Retinal Schiff-base における color-tuning mechanism

(京大院工¹, 京大院理², Q C R I³) 浅井 康太¹, 藤本 和宏², 長谷川 淳也^{1,3}, 中辻 博³

【序】膜蛋白質であるレチナル蛋白質は、非常に良く似た構造を有するにも関わらずセンサーやポンプという異なる機能を発現する。これらの機能は、蛋白質中のレチナル色素が光を吸収することから開始される。レチナル色素の吸収波長は蛋白質によって異なり、紫外域から可視光域まで幅広い波長域に及んでいる。バクテリオロドプシン(bR)は光サイクルによって数種類の間体を經由して反応が進むが、それらの中間体の吸収波長は1eV以上の変化を示す(図1)。また、bRは図1のような反応を通じてプロトン膜内から膜外へ輸送する。L stateからM stateへの反応がプロトンポンプの一方向性を実現する重要な反応であり、レチナル色素周辺構造がポンプメカニズムの解明にとって重要である。この際、

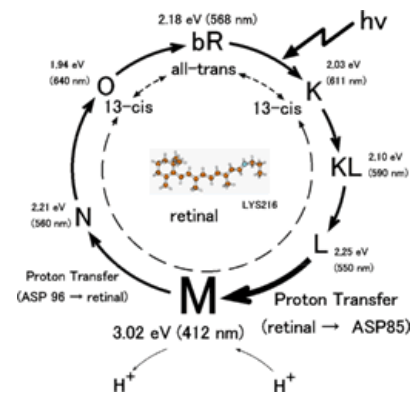


図1.バクテリオロドプシンの光サイクル

L state における protonated Schiff-base(PSB)が M state で脱プロトン化され deprotonated Schiff-base(SB)になる。また、この M state では実験結果から複数の中間体が存在する可能性が示唆されている。FTIR(ref.1)および NMR(ref.2)の実験では、レチナル色素の構造が異なる2つの中間体の存在が示唆されており、M₁/M₂と呼ばれている。X線結晶構造解析では M state として捕らえられている結晶構造に、レチナル色素の SB が syn/anti 型と異なる2つの構造が観測されている(図2)。しかし、mutant(D96N)の X 線結晶構造解析で anti 型の M₂ state の結晶のみが観測された。M state の光吸収波長は412nm(3.02eV)と変化しない。このように、二つの M state の存在が示唆されているが、構造の異なるレチナル色素であるにも関わらず吸収波長が変化しないことから、複数の M state が存在するかどうかの結論を得るには至っていない。



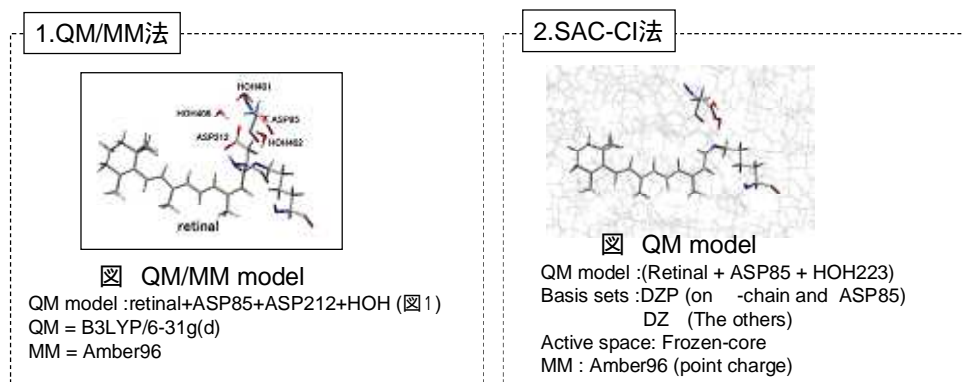
図2.M₁/M₂に対応する syn/anti 型のレチナル色素の構造

我々の以前の研究では、QM/MM 法、SAC-CI 法を用いた研究で異なる蛋白質 (bR,SRII,Rh) 間での PSB (protonated Schiff-base) の color-tuning mechanism を解明した(ref.3)。また同様に、バクテリオロドプシンの光サイクルにおける bR,K,KL 状態の吸収波長を理論計算により再現した(ref.4)。この研究により、レチナル色素の吸収波長は、3つの効果(色素の構造、蛋白質の静電的な効果、カウンター残基からの量子的な効果)で主に説明されることがわかった。また、吸収波長の制御メカニズムを解明することにより、レチナル色素周辺の構造についての知見を得ることも可能である。

本研究の目的は、1)バクテリオロドプシンの光サイクルにおいて、プロトン輸送の鍵となる L/M state 間の遷移で観測される550nm(2.25eV)から412nm(3.02eV)への大きい短波長シフトのメカニズムを解明し、2)M state において、M₁/M₂に対応するとされる syn(1M0M)/anti(1CWQ)型の構造の

異なるレチナル色素を用いて吸収波長を理論的に計算し、光吸収スペクトルの観点から M₁/M₂ state の妥当性を議論することである。

【方法論】QM/MM法（構造最適化）SAC-CI法（吸収波長計算）を以下の条件で計算を行った。



【結果と考察】Table1 に PSB(L state)と SB(M state)における吸収波長の計算結果をまとめた。この結果より、PSB と SB では吸収波長の制御メカニズムが大きく異なっていることがわかった。PSB では、励起状態は分子内電子移動 (CT) で特徴付けられ、蛋白質からの静電相互作用により吸収波長が制御されていた(ref.3)。これに対して、SB ではレチナル色素の構造レベルで吸収波長が決定されている。また、蛋白質の静電的な効果、カウンター残基からの量子的な効果は PSB に比べると非常に小さく、脱プロトン化したSBでは電子状態におけるCT性が小さくなること、カウンター残基のASP85が中性化し静電相互作用が小さくなることの二つの効果で説明される。

次にM₁/M₂に対応するとされるレチナル色素のsyn(1M0M)/anti(1CWQ)型の二つの構造について同様に吸収波長を計算し、Table2 にまとめた。Table1 からわかるように、syn(1M0M)/anti(1CWQ)型の2つの結晶でも蛋白質の静電的な影響、カウンター残基からの量子的な効果は同様に小さいことがわかった。ただし、量子的な効果については水素結合するカウンター残基が異なる影響が多少観られた。このように、SB では異なる構造においても同等の吸収波長を示すメカニズムが明らかになった。従って、光吸収波長の実験結果は構造が異なる M₁/M₂ 中間体が存在するという説に矛盾しない結果を得た。

Table1 . Excitation Energy of retinal chromophore with the SAC-CI

Protein	Enviroment	QM	SAC-CI Eex (eV)	osc.	Exptl.(eV)
PSB	in protein	AS *1	2.26	1.16	2.25
		RET	1.97	1.05	
	in vacuo	RET	1.33	0.76	
SB	in protein	AS *1	3.13	1.66	3.02
		RET	3.01	1.55	
	in vacuo	RET	3.04	1.53	

AS *1 QM region:Retinal+ASP85+ASP212+HOH402

Reference

- 1.B.Hessling,J.Herbst,R.Rammelsberg,and K.Gerwert Biophysical journal (1997) vol.73 2071-2080
2. Hu,J.G,Sun,B.Q.,Bizounok,M.,Herzfeld,J. et.al. Biochemistry (1998) vol37 8088-8096
3. K. Fujimoto, S. Hayashi, J. Hasegawa, and H. Nakatsuji JCTC (2007) vol.3 605-618
- 4.K. Fujimoto, J. Hasegawa, S. Hayashi, S. Kato, H. Nakatsuji, CPL (2005) vol.414 239-242

Table2 . Excitation Energy of retinal chromophore with the SAC-CI

Protein	Enviroment	QM	SAC-CI Eex (eV)	osc.	Exptl.(eV)
1M0M	in protein	AS *1	3.13	1.66	3.02
		RET	3.01	1.55	
	in vacuo	RET	3.04	1.53	
1CWQ	in protein	AS *2	3.11	1.75	3.02
		RET	3.07	1.70	
	in vacuo	RET	3.07	1.62	

AS *1 QM region:Retinal+ASP85+ASP212+HOH402

AS *2 QM region:Retinal+THR89