

FMN 結合型蛍光タンパク質 iLOV の分光解析

(名工大院工¹、神戸大院理²、神戸大分子フォト³、スクリプス研⁴、グラスゴー大⁵)
 ○張 宇¹、高務 真美²、秋本 誠志^{2,3}、岩田 達也¹、人見 研一⁴、E. D. Getzoff⁴、富永 圭介^{2,3}、
 J. M. Christie^{4,5}、神取 秀樹¹

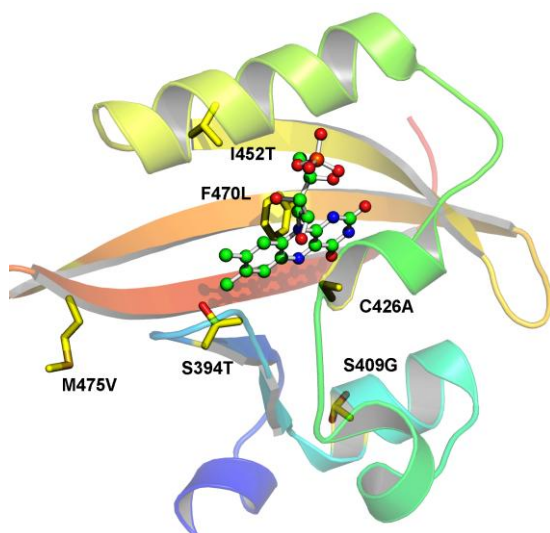


図1 iLOVの構造と変異箇所

FMNと共有結合を形成するシステインに加えて5カ所のアミノ酸に変異が導入されている(立体構造は、ホウライシダ *neol* LOV2を元としている。PDB ID:1G28)

手法を用いて野生型、C/A変異体との比較解析を行った。

【実験】 [試料] *Arabidopsis phot2-LOV2*の野生型、C/A変異体、iLOVは大腸菌によりGSTとの融合タンパク質として発現した。大腸菌破砕液から目的タンパク質をグルタチオンセファロースカラムによって精製した後、スロンビン処理でGSTタグを除去した。赤外分光解析以外の実験は中性水溶液中で行った一方、赤外分光のためには濃縮した試料を赤外窓板上で乾燥させた上で、水和フィルムあるいは再溶解試料を実験に用いた。

[分光解析] 蛍光寿命は、励起光425 nm、測定光520 nmの時間分解蛍光測定装置を用いて決定した。蛍光の量子収率は、硫酸キニーネを標準試料として360 nmの励起波長を用いて決定した。励起三重項状態の赤外分光解析は、水和フィルム試料を用いて77 Kでの>400 nmの光照射中と照射前との差スペクトルとして測定した^[2]。一方、酸化型とセミキノン型との構造変化はDTTを含む再溶解試料に対する>400 nmの光照射に伴う赤外差スペクトルとして測定した。

【序】 LOVドメインは植物の青色光センサーとして機能するフォトトロピン (phot) の光受容ドメインである(図1)。LOVドメインは約100アミノ残基から構成され、発色団としてフラビンモノヌクレオチド (FMN) を結合しており、FMNの励起三重項状態におけるシステイン側鎖との光誘起共有結合形成によりタンパク質の構造変化が引き起こされる。Christieらは細胞生物学のための蛍光プローブとしての応用を考え、共有結合が形成されないCys→Ala変異体を鋳型として5カ所の変異を加えることで高い蛍光強度を示すiLOVを作製した^[1]。iLOVは蛍光プローブとして有名なGFPよりも優れた性質をもっているが^[1]、図1の六重変異体がどのようにFMNの光反応に影響を与え、蛍光を強めるのかそのメカニズムは不明である。そこで本発表ではiLOVの光反応の性質を明らかにするため、様々な分光学的

【結果と考察】

吸収極大波長は野生型と C/A が 446 nm、iLOV が 448 nm であり、Cys→Ala に対して加わった 5 カ所の変異導入が 2 nm の長波長シフトに関与することがわかった。一方、蛍光寿命はいずれも 2 ns & 4 ns の二成分で構成することができ、ほとんど試料間の差がなかった。蛍光の量子収率は、野生型が 0.081、C/A が 0.153、iLOV が 0.180 と決定され、iLOV が最大値を示したものの、*in vivo*^[1]での顕著な違いとは異なっていた。これらの結果は、天然状態での発光環境には、酸化型からの一光子反応だけではない複雑な過程が含まれることを示唆している。

野生型の場合、励起された分子は項間交差により生成した励起三重項状態において、システイン側鎖と共有結合を形成する。数マイクロ秒の共有結合形成が起こらないため、C/A および iLOV では励起された分子は蛍光などの緩和過程を経てもとの酸化型に戻るものと考えられている。しかしながら、我々は還元剤存在下の光反応において、C/A が光照射時間に比例するようにセミキノン型 (FMNH^{*}) を生成したのに対し、iLOV では光照射の初期段階でセミキノン型が生成しにくいことを見出した。長時間安定なセミキノン型を生成しにくいという事実は、iLOV が細胞内のある程度、還元的な環境における蛍光プローブとして優れていることを示唆する。発表では、励起三重項状態やセミキノン型の赤外差スペクトルを比較し、iLOV において電子移動あるいはプロトン移動が起こりにくいメカニズムについて議論したい。

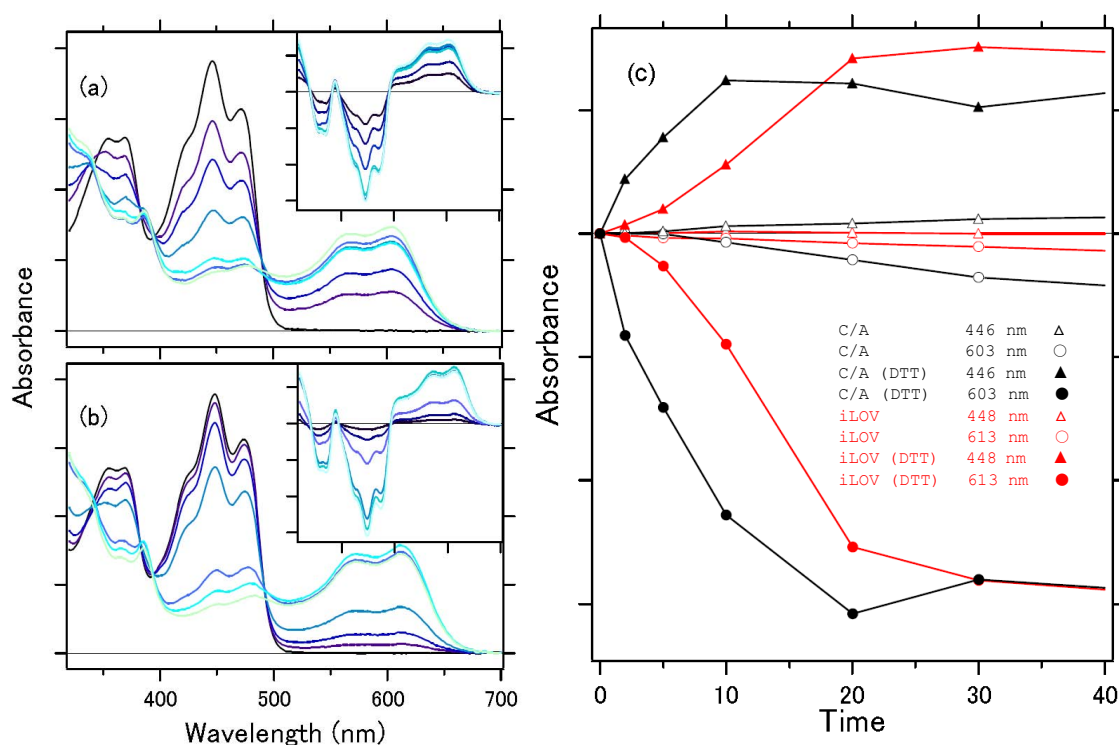


図2 DTT存在下での光照射による紫外可視吸収スペクトル変化

C/A変異体(a)とiLOV(b)ではいずれも40分程度の照射によりでセミキノン型が蓄積する。(c)はC/A変異体(黒線)とiLOV(赤線)におけるセミキノン型生成の照射時間依存性を示す。

[1] S. Chapman, C. Faulkner, E. Kaiserli, C. Garcia-Mata, E. I. Savenkov, A. G. Roberts, K. J. Oparka, J. M. Christie (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20038-20043.

[2] Y. Sato, T. Iwata, S. Tokutomi, H. Kandori (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1088-1089.

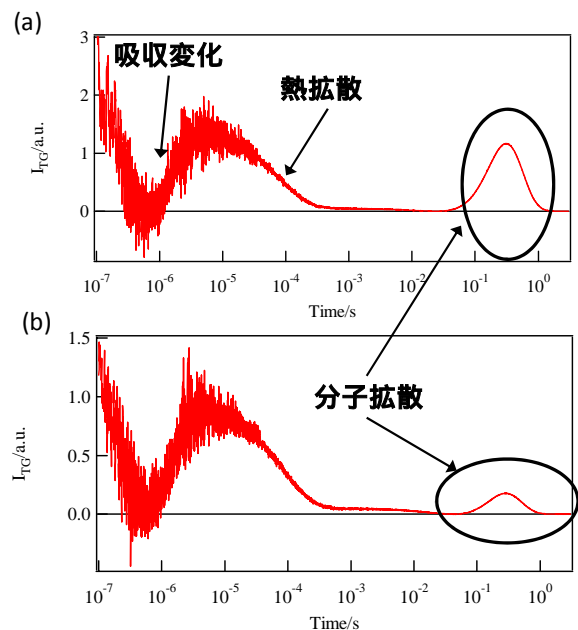
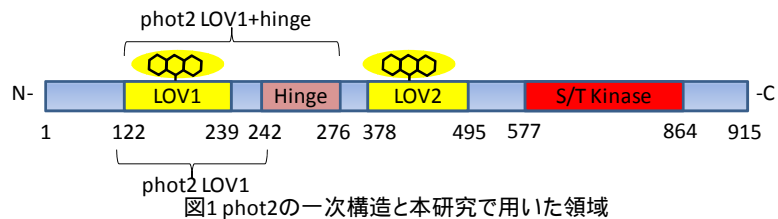
光センサータンパク質 Phot2LOV1 の光反応の解明

(京大院理¹、九大院理²) 川口 雄輝¹、 孔 三根²、 和田 正三²、 寺嶋 正秀¹

【序】ほとんどの生物は、外的環境に応じて行動するために、様々な光センシング機能を有するタンパク質を持っている。光照射によって、光センサータンパク質の構造変化や相互作用変化が誘起され、その情報が下流の分子に伝わり、機能を発現するに至る。そうした光センサータンパク質の一つであるフォトトロピンはシロイヌナズナなどに含まれている青色光センサーであり、光屈性や気孔の開閉、葉緑体の光定位運動等を制御している。光受容を担うドメインとして、Light-Oxygen-Voltage-sensing(LOV)ドメインを2つ有しており、その光反応がこれまで広く興味を持たれてきた。このうちの一方である LOV1 ドメインは Phototropin の二量体化サイトとしての機能を持つと考えられている。また最近、機能解析の結果から、LOV1 のC末端側に存在するヒンジと呼ばれる領域が生理的な機能に重要であることが示唆された。そこで、本研究では過渡回折格子法 (TG 法) を用いて、ヒンジ付きの LOV1 とヒンジなしの LOV1 (図1) の光反応を明らかにし、それらを比較することで、ヒンジ領域の果たす役割について考察する。

【実験】二本の励起光で作った干渉縞によって分子を光励起し、ここにプローブ光を入射することで得られる回折光(TG 光)の強度の時間変化を光電子増倍管で検出した。励起光には excimer 励起に色素レーザー(465nm)を用い、プローブ光には赤外ダイオードレーザー(840nm)を用いた。タンパク質試料として phot2 LOV1(116-242)と phot2 LOV1+hinge(116-276)をバッファに溶かしたものを用いた。

【結果と考察】パルス光で光励起した後の phot2 LOV1 と phot2 LOV1+hinge の TG 信号を図 2 に示す。それぞれの試料発色団近傍の構造変化に起因する吸収スペクトル変化による信号と、励起分子から放出された熱の拡散信号が、比較的



早い時間スケールで観測されている。その後の信号は、タンパク質分子が溶液中を拡散していく過程を反映した信号であると同定された。これらの信号より、両方の試料で拡散係数が減少するような反応が起こっていることが分かる。また興味深いことに、格子波数を変化させて測定したところ、この拡散信号の形や強度が観測時間に依存していることが明らかになった。この分子拡散信号の強度や形が時間変化することは、拡散係数変化を伴う反応がこの時間スケールにおいて起こっていることを意味している。その拡散係数が変化する速度にそれぞれの試料で違いがあることが分かり、phot2 LOV1+hingeの方が遅いことが分かった。

次に、この拡散係数変化が会合反応によるものか、構造変化によるものかを決めるために、TG 信号の濃度依存性を測定した。構造変化によって拡散係数が変化する場合、反応速度が濃度に依存しないため、TG 信号は濃度に依存しない。会合反応によって拡散係数が変化する場合、反応速度が濃度に比例するため、濃度を濃くすると TG 信号の強度が大きくなることが予想された。しかし、実際に得られた信号は濃度を濃くすると拡散信号の強度が小さくなるという予想に反した結果が得られた(図 3)。この濃度依存性を、反応物に単量体と多量体の平衡があり、濃度を濃くすることによって、平衡が信号に寄与していない方の分子に偏り、信号が小さくなったと解釈した。この解釈を検討するため、早い時間スケールにおいて同様に濃度依存性の実験を行ったところ、どちらの試料においても、遅い時間で観測したときよりも濃度変化割合が小さくなることが見られた(図 4)。

この結果は、上で述べた単量体と多量体の平衡とともに、会合反応による拡散係数変化が存在しているとして解釈できる。phot2 LOV1 と phot2 LOV1+hinge において、TG 信号自体や、濃度変化による信号強度の変化率などに違いが見られたが、この違いが何に起因するのかは、動的光散乱法(DLS)等、他の実験を併用しながら現在調べており、この内容も含めて講演会で発表予定である。

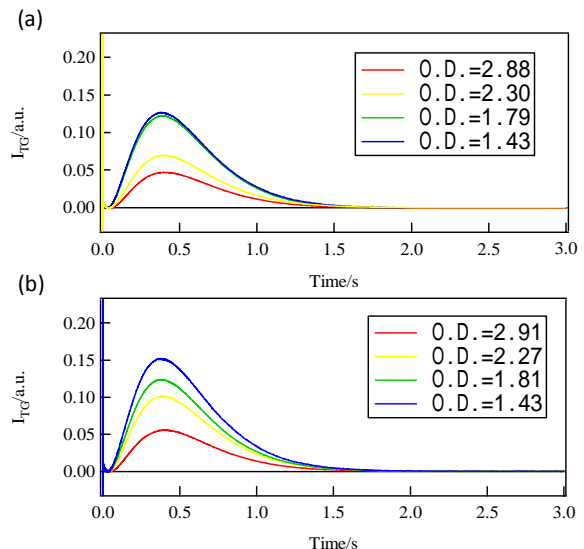


図3(a)phot2 LOV1+hinge(b)phot2 LOV1のlowqでの濃度依存性

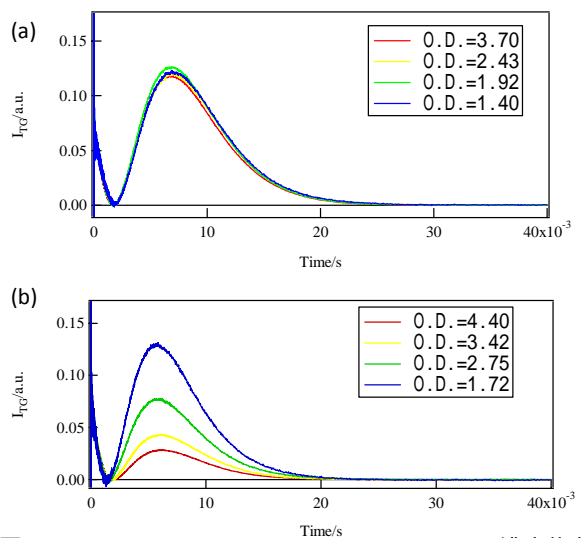


図4(a)phot2 LOV1+hinge(b)phot2 LOV1のhighqでの濃度依存性

高圧 TG 法による光センサータンパク質 TePixD の光反応中における揺らぎ変化検出

(京大院理¹、東大院総合文化²、大阪府立大院理³) ○黒井邦巧¹、田中啓介¹、木村佳文¹、岡島公司^{2,3}、池内昌彦²、徳富哲³、寺嶋正秀¹

【序】

近年タンパク質反応における構造揺らぎの重要性が注目を集めており、タンパク質構造の動的側面の研究に興味を持たれている。安定状態にあるタンパク質分子の構造揺らぎについては、いくつかの手法で揺らぎが研究されつつある一方で、反応中間体の構造揺らぎに関する知見は検出の困難さゆえにほとんど得られていない。本研究では、タンパク質反応過程における揺らぎ変化を、高圧下での過渡回折格子法 (TG 法) により検出することを試みた。TG 法を用いることで、反応に伴う拡散係数変化や部分モル体積変化、エンタルピー変化などのさまざまな熱力学量を高時間分解能で検出することが可能である。構造揺らぎを直接反映する体積揺らぎ、 $\langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle$ は図 1 のように表されるので、圧力を変調させながら TG 法で反応過程に伴う体積変化量を測定することで、反応中の体積揺らぎ変化を検出することが可能である。

$$\Delta \langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle = k_B T V \Delta \beta_T$$

$$\rightarrow \Delta \bar{\beta}_T = -\frac{1}{\bar{V}} \left(\frac{\partial \Delta \bar{V}}{\partial P} \right)_T$$

$$\left[\begin{array}{l} \beta_T : \text{等温圧縮率} \\ V : \text{部分モル体積} \end{array} \right]$$

図 1 体積揺らぎと等温圧縮率

本研究においては青色光受容タンパク質のひとつである TePixD というタンパク質を対象に高圧 TG 測定を行った。このタンパク質は BLUF ドメインを持つ光センサータンパク質で、環状 5 量体が 2 つ重なり 10 量体を形成して存在する。その光反応は TG 法を用いた先行研究により調べられていて、図 2 のような光反応を行うと考えられている。このような光反応を行う TePixD の TG 信号を、高圧条件下で測定して、中間体の構造揺らぎの検出を試みた。同時にその高圧 TG 信号の解析から、高圧条件下における反応ダイナミクスについても検討した。

【実験】

タンパク質試料として TePixD を大腸菌において発現、精製したものを用いて、耐圧光学セル内で圧力を 0.1MPa から 200MPa まで変えながら TG 信号を測定した。TG 測定では励起パルス光として 460nm 色素レーザーを用い、840nm のダイオードレーザーを連続プローブ光として用いた。

【結果と考察】

図 3 は各圧力で測定した TePixD の TG 信号である。常圧 (0.1MPa) においてミリ秒領域に見える大きな山型の信号は分子拡散信号であり、10 量体の拡散係数変化反応に対応する。また 40 マ

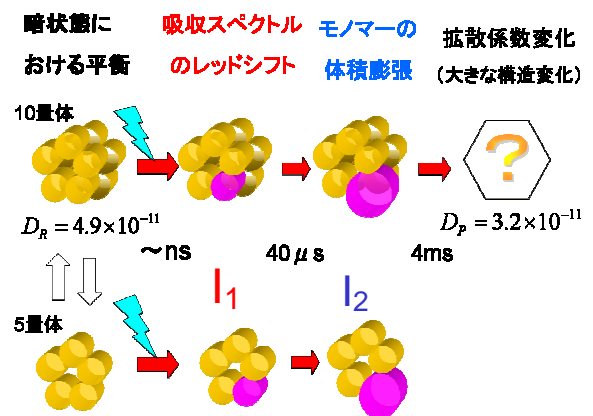


図 2 TePixD の光反応機構

マイクロ秒付近の小さな減衰は体積膨張過程に対応する。

1) 高圧下での反応ダイナミクスの検討

図3のように山型の分子拡散信号の強度が加圧とともに劇的に減少することが分かるがこれは暗状態における10量体、5量体間の平衡が加圧とともに5量体側に傾くためと解釈できる。このことは濃度を変えて圧力に対する挙動の違いを調べることで確かめられた。常圧における5量体と10量体間の平衡定数を見積もることは難しいがおおまかに $K = 1000 \text{ M}^{-1}$ と見積もられ、これより平衡定数の圧力依存性は図4(a)のよう

になった。また分子拡散信号の解析、体積膨張過程の信号の解析から構造変化の速度、体積膨張速度の圧力依存性が求まりその結果は図4(b)(c)のようになった。これらより求まる10量体、5量体間の体積差と各反応過程での活性化体積も併せて載せてある。

2) 反応中間体揺らぎの検出

40マイクロ秒付近の体積膨張過程を表す信号の圧力依存性から中間体 I_1 、 I_2 の体積揺らぎを、基底状態からの差として検出したものが図5である。これより光励起直後に生成する吸収スペクトルシフトを起こした中間体 I_1 は大きな揺らぎを持ち、体積膨張して生じる中間体 I_2 は比較的小さな揺らぎを持つことが分かった。この結果を、我々は光励起により誘起された大きな揺らぎが、光反応を推進する駆動力になっていると解釈している。

このように、タンパク質の構造揺らぎが反応過程においてダイナミックに変化する様子が、初めて捉えられた。

【参考文献】 K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima., *J. Mol. Biol.* 386, 1290–1300, 2009

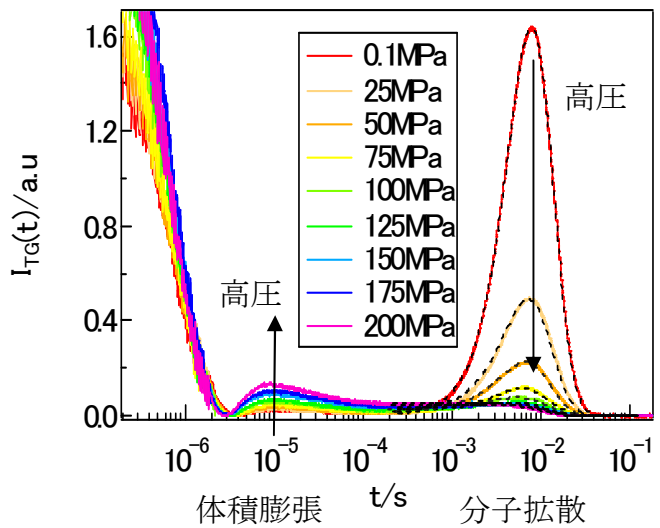


図3 高圧下における TePixD の TG 信号

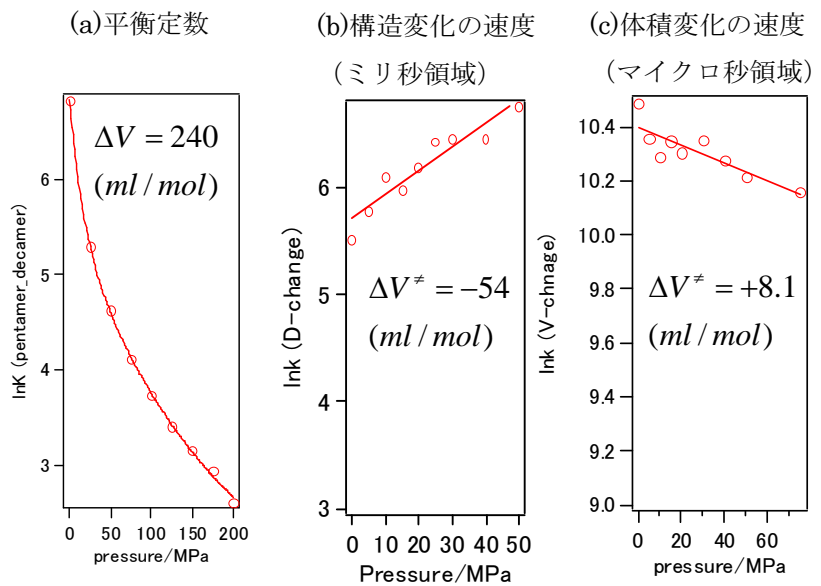


図4 平衡定数、反応速度の圧力依存性

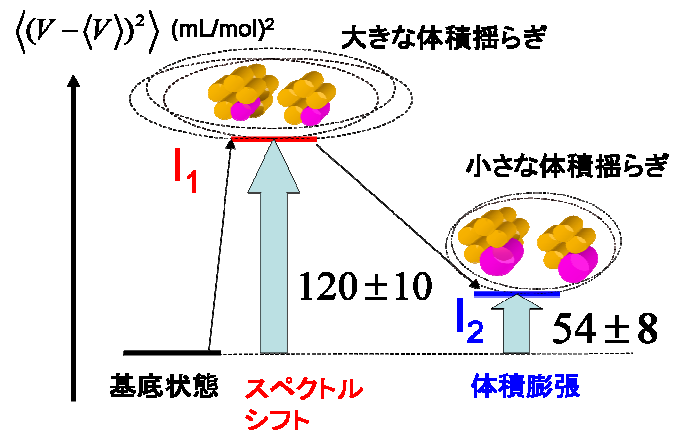


図5 反応座標に沿った体積揺らぎの変化

異体において通常の水素結合へ変化することを示している。一方、野生型における Tyr42 残基と発色団との水素結合距離が、E46Q 変異体における結合距離とほぼ同じであることが報告されている[3]。このことから、図 1

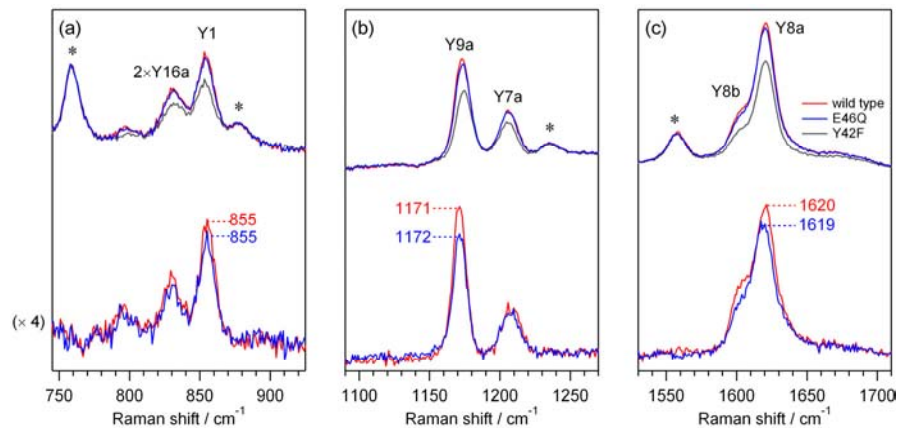


図 1. 野生型および変異体イエロープロテインの紫外共鳴ラマンスペクトル。(a) Y1, (b) Y9a および Y7a, (c) Y8a バンド領域。(上段) 各試料のスペクトル。*は Trp 残基の振動バンドを表している。(下段) 測定結果をもとに得られた野生型 (赤) および E46Q 変異体 (青) における Tyr42 残基のスペクトル。

Tyr42 残基のラマンバンド強度の変化は、水素結合のドナー (D) - アクセプター (A) 間の結合距離の変化を単純に反映しているのではなく、結合角 ($\angle O-H \cdots O$) などの因子にも依存すると考えられる。今後、野生型[1]だけではなく、E46Q 変異体についても、水素原子位置の同定が可能な中性子結晶構造解析の結果とあわせた検討が必要となる。

次に、野生型と E46Q 変異体イエロープロテインの時間分解紫外共鳴ラマン差スペクトルを図 2 に示す。差スペクトルは、ポンプ光照射によるスペクトル変化を取り出したものである。光励起後 3 ps では、Tyr 残基の振動バンドの位置に負のバンドが現れた。これは、発色団の光励起に伴い、Tyr42 残基のバンド強度が減少したことを表している。これまでの研究において、チロシン溶液における水素結合強度の変化により、ラマン励起プロファイルのシフトが起こることが報告されている[4]。これにより我々は、

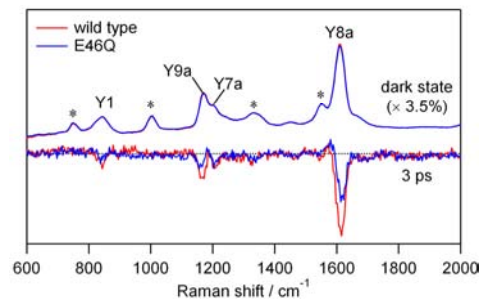


図 2. 野生型 (赤) および E46Q 変異体 (青) の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。Y で表示したバンドは Tyr 残基の振動バンドを、*で表示したバンドは Trp 残基の振動バンドを示している。

観測された Tyr42 残基のバンド強度の減少が、水素結合強化による励起プロファイルのシフトに起因すると結論した。励起状態における発色団と Tyr42 残基との水素結合強度は、暗状態の場合と同様に、水素結合における D-A 間の結合距離だけではなく、結合角などの因子により変化すると考えられる。また、発色団が励起状態にあるときと暗状態にあるときの Tyr42 残基のバンド強度の差は、野生型よりも E46Q 変異体のほうが小さいことがわかった。実験はポンプ光の強度を強くして、スペクトル変化が飽和する条件で行った。この条件では、反応しうる全てのイエロープロテイン分子が励起状態にあると考えられる。得られた結果をもとに励起状態の野生型と E46Q 変異体における Tyr42 残基のスペクトルを算出したところ、暗状態で観測されるほどバンド強度に差が見られないことがわかった。

今回の研究により、Glu46 残基から Gln 残基への置換が、暗状態でも励起状態でも水素結合ネットワークを介して、Tyr42 残基の構造変化に影響を与えることがわかった。

【参考文献】

- [1] S. Yamaguchi, et al., *PNAS* **106**, 440 (2009). [2] M. Mizuno, et al., *JPCB* **111**, 6293 (2007). [3] M. Sugishima, et al., *Acta Crystallogr., D* **60**, 2305 (2004). [4] Z. Chi and S. A. Asher, *JPCB*, **102**, 9595 (1998).

ロドプシンの分子科学

(名工大院工) 神取秀樹

【序】 ロドプシンは、我々の視覚センサーとして光情報変換を担う膜蛋白質である。ある種のバクテリアにも含まれるがこの場合は、光情報変換だけでなく、プロトンポンプやクロライドポンプとして光エネルギー変換にも利用される。最も理解の進んだプロトンポンプとして有名なバクテリオロドプシンなどロドプシンは、波長制御機構や超高速異性化反応、プロトン移動反応の連鎖による濃度勾配に逆らった輸送など、分子科学的課題の宝庫である。私はこれまで超高速分光や赤外分光を用いて、この魅力的な蛋白質のメカニズムを解明するため研究を行ってきた^[1]。講演では四半世紀におよぶ分光学的挑戦の中から、最近の研究成果を中心として紹介したい。

【視物質ロドプシンの研究】 私は大学院に進学した 1984 年に視物質の超高速分光を開始した。今から考えると 25 ピコ秒のレーザーで 2 桁以上速い異性化過程を捉えようとしていたわけで、無謀な試みであったと言えるかもしれない。しかしながら、幸い優れた共同研究者に恵まれ、京大・分子研・理研と短いレーザーパルスを追い求める中で、「視覚の初期過程がレチナールの 11 シス型から全トランス型への異性化反応であること、蛋白質は反応効率を最適化していること」を明らかにすることができた^[1]。一方、1994 年には赤外分光によるロドプシンの構造解析を開始した。明暗を感じるロドプシンに対する研究例を図 1 にまとめたが、この間、一貫して「新しい分光学そのものを開発するわけではないが、試料まで含めた最適化により、他ではできない分光計測を実現する」といったスタンスでの研究を行ってきた。

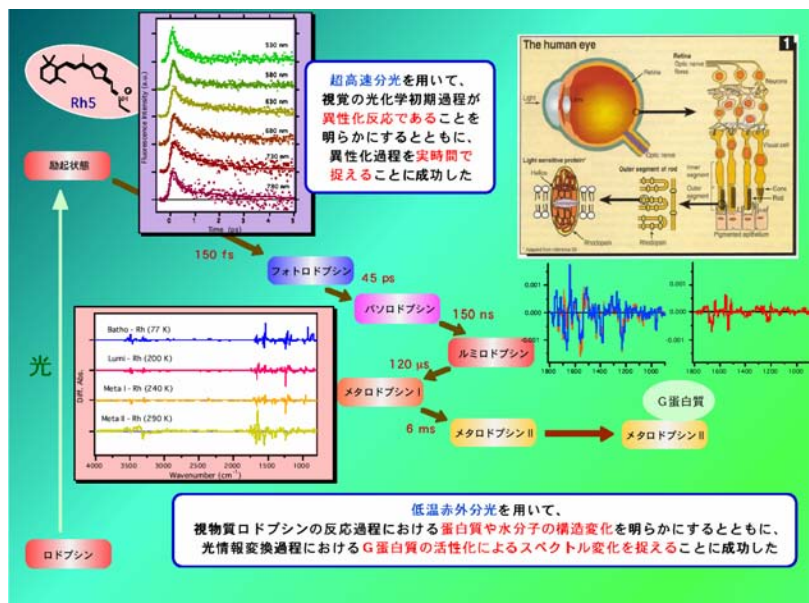
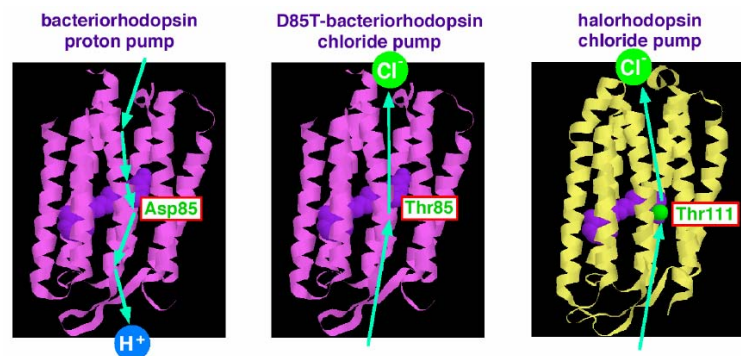


図 1 超高速分光、赤外分光を用いた明暗視を担う視物質ロドプシンの研究

その一例として色覚視物質の研究を挙げるができるかもしれない。ウシやイカから大量の試料調製が可能な明暗視のロドプシンと異なり、色覚視物質は試料調製が困難であることから超高速分光や構造解析は不可能であると考えられてきた。我々は 20 年前に二千枚以上のニワトリ網膜から赤感受性視物質を調製することで、色覚視物質の初期過程を直接、捉えることに成功したが^[2]、20 年後の今年には霊長類が赤と緑を識別する色覚視物質の赤外分光解析を初めて実現することができた^[3]。

【古細菌型ロドプシンの研究】 全トランス型レチナールを発色団とする古細菌型ロドプシンには視物質ロドプシンとのアミノ酸の相同性はないが、いずれも7回膜貫通型のヘリックスから構成される。視物質ロドプシンが光情報伝達という唯一の機能をもつものに対して、古細菌型ロドプシンは光センサーだけでなくプロトンポンプやクロライドポンプなど光エネルギー変換の機能も持っている。イオンポンプの蛋白質内部には能動輸送を補助するような水分子の存在が示唆されていたが、我々は低温赤外分光を用いてX線結晶構造解析に先がけてこのような水分子の存在を明らかにした^[4]。最近では、活性中心で強い水素結合を形成した水分子がプロトンポンプ機能をもったロドプシンだけに存在することを見出し、水が機能を決定することを提唱している^[1,5]。これらの実験においては、前述の通り、市販の分光器を用いながら様々な工夫をすることで最高の分光計測を実現した結果、蛋白質に結合したわずか1個の水の水素結合変化を捉えることが可能になった。

蛋白質機能を理解する上で、アミノ酸の変異による機能の改変が重要な知見を与えるが、1995年にプロトンポンプであるバクテリオロドプシンを1アミノ酸の置換によりクロライドポンプに転換させた研究は機能転換の最初の例となった(図2)^[6]。一方、天然に存在するプロトンポンプはすべて外向きであり、内向きのポンプは天然にも人工的にも実現したことがなかったが、昨年、我々は内向きのプロトン輸送を行うロドプシンの創成に成功している(図2)^[7]。



【将来展望】 ゲノム研究の進展により新しいロドプシンの発見が相次いでいる。そのような中で、ヒトと全く関係ないと考えられていた古細菌型ロドプシンをマウスの脳に発現させ、光で神経回路を制御しようという応用研究も活発に行われるようになった。このような新しい時代において、ロドプシン研究に参入しようという分子科学者の挑戦を大いに歓迎します。

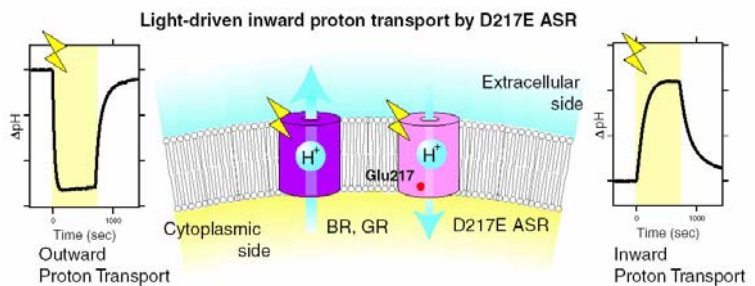


図2 1アミノ酸の置換による古細菌型ロドプシンの機能転換の例
(上) 外向きプロトンポンプを内向きクロライドポンプに転換した。
(下) 光センサーを使って内向きプロトン輸送を実現した。

[1] H. Kandori, "Retinal binding proteins" in *cis-trans Isomerization in Biochemistry*; Wiley-VCH, pp 53-75 (2006); H. Kandori, "Protein-controlled ultrafast photoisomerization in rhodopsin and bacteriorhodopsin," in *Supramolecular Effects on Photochemical and Photophysical Processes*, John Wiley & Sons, in press (2010). [2] H. Kandori, T. Mizukami, T. Okada, Y. Imamoto, Y. Fukada, Y. Shichida, T. Yoshizawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8908 (1990). [3] K. Katayama, Y. Furutani, H. Imai, H. Kandori, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 891 (2010). [4] H. Kandori, *Biochim. Biophys. Acta* 1460, 177 (2000). [5] M. Shibata, T. Tanimoto, H. Kandori, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 13312 (2003); Y. Furutani, M. Shibata, H. Kandori, *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 661 (2005). [6] J. Sasaki, L. S. Brown, Y.-S. Chon, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman, J. K. Lanyi, *Science* 269, 73 (1995). [7] A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung, H. Kandori, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16439 (2009).

2B08

ロドプシン／古細菌型ロドプシンキメラタンパク質を用いた G タンパク質活性化機構の解明

(名工大院工*, 京大院理**) ○井上 圭一*, 佐々木賢吾*, 中妻 亜弥*, 山下 高廣**,
七田 芳則**, 神取 秀樹*

【序】ロドプシンは高等動物の網膜内に存在する桿体細胞に含まれる光受容タンパク質であり、主として薄明視における光受容過程に関わっている。G タンパク質を活性化することで信号伝達を行う G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種であるロドプシンは、光によって反応を開始することができることから分光的な研究が盛んに行われてきた。また 2000 年に結晶構造が報告されたこともあって、最も理解が進んだ GPCR のモデルタンパク質となっている。しかしロドプシンがはたらく上で最も重要な桿体中の G タンパク質 (トランスデューシン) との相互作用については未だに分子論的な理解が進んでいないのが現状である。

古細菌型ロドプシンは視物質ロドプシンと同様、7 回膜貫通型 α ヘリックス構造の内部にレチナル分子を結合した光受容タンパク質であるが、G タンパク質の活性化能はないことが知られている。しかしながら、Geiser らは 2006 年に光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (BR) の細胞質側第 3 ループをロドプシンのもので置換したキメラタンパク質 (BR wt/Rh-loop3) が、光依存的にトランスデューシン活性化能を持つことを明らかにした。この結果は、ロドプシンと BR との光誘起構造変化に共通性があることを示唆しているが、Geiser らの論文ではキメラタンパク質の性質に関する記述がほとんどなく、活性化能もロドプシンの 1 / 3 程度という驚くほど高い値を報告している。

そこで本研究では、キメラ BR のトランスデューシン活性化能や光反応ダイナミクスを詳細に解析した。特に、BR のシッフ塩基に対するプロトン供与体である Asp96 を Asn に変異させた D96N 変異体をもとにしたキメラタンパク質も併せて調べることで、構造変化と活性化能との相関を検討した。

【実験】試料には BR の野生型および D96N 変異体の細胞質側第 3 ループをウシロドプシンのループに置き換えたキメラタンパク質 (それぞれ BR wt/Rh-loop3、BR D96N/Rh-loop3 とする) を用いた (図 1)。G タンパク質活性化能は試料に光を照射したとき、トランスデューシンに結合する $GTP\gamma^{35}S$ の量を測定することで評価した。また溶媒として 20 mM K_2HPO_4 (pH = 7.4)、200 mM NaCl を用いた。

過渡吸収測定はナノ秒 Nd^{3+} :YAG パルスレーザーを励起光源とし、ICCD カメラを使ったフラッシュフォトリスシステム (C9125、C8808-01、浜松ホトニクス) を用いて行った。

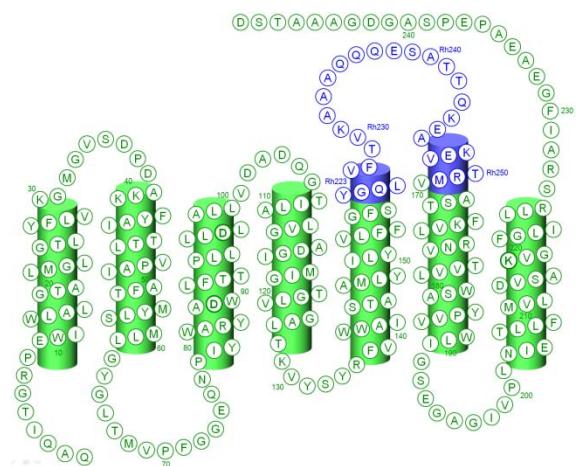


図 1 BR/Rh-loop3 キメラタンパク質の構造

励起光強度を $\sim 500 \mu\text{J/pulse}$ とし、光励起 50 回分の信号を平均化した。過渡吸収測定は 10 mM K_2HPO_4 、300 mM KCl 中に行い、 $\text{pH} = 7, 8, 9$ の異なる pH 条件下で実験を行った。

【結果と考察】図 2 に野生型 BR および BR/Rh-loop3 キメラの光依存的なトランスデューシン活性化能測定の結果を示す。野生型 BR については光依存的な活性化が見られなかったのに対し、BR wt/Rh-loop3 と BR D96N/Rh-loop3 についてはそれぞれ 64 と 80 $\mu\text{mol/min/mol pigment}$ の活性化能があることが示された。これはウシロドプシンの 58600 分の 1 および 46900 分の 1 で、今回の結果は Geiser らの報告とは大きく異なっており、天然の GPCR はトランスデューシンを活性化するために最適化されているものと解釈できる。

次にこれらの試料のフラッシュフォトリシスを測定したところ、BR wt/Rh-loop3 のフォトサイクルにおいて M 中間体が減衰した後に、さらに短波長シフトした野生型 BR では見られない中間体 ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) が存在することが明らかになった。この中間体は O 中間体と同じ時定数で減衰することから、O 中間体と準平衡にある過渡的な中間体であると考えられる。またフォトサイクルの Turn over 速度は野生型 BR では $4.91 \pm 0.08 \text{ ms}$ であるのに対し、BR wt/Rh-loop3 ではそれよりも少し遅く $22.0 \pm 0.4 \text{ ms}$ であった。

一方 BR D96N/Rh-loop3 についてはそのフォトサイクルは BR wt/Rh-loop3 のものと大きく異なり、光励起後 100 μs 以降に存在する過渡的な中間体としては M 中間体のみが観測された。さらに驚くべき事に Turn over 速度が野生型 BR のものより 1000 倍以上遅い $9.6 \pm 0.6 \text{ s}$ であることが明らかになった。そして pH を上げるとその速度はさらに遅くなり、 $\text{pH} = 9$ では $78.6 \pm 1.0 \text{ s}$ となった。BR wt/Rh-loop3 と BR D96N/Rh-loop3 の間でこれほどまで Turn over 速度が異なるのに対し、トランスデューシン活性化能が同程度であることはロドプシンによるトランスデューシンの活性化と活性中間体の寿命の間に相関がないことを示唆している。

【参考文献】 1. Geiser *et al.*, *Protein Sci.* (2006) 15, 1679-1690.

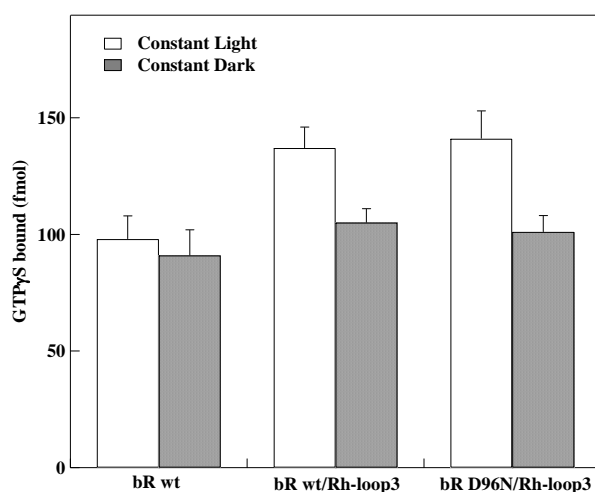


図 2 野生型 BR および BR/Rh-loop3 のトランスデューシン活性化能

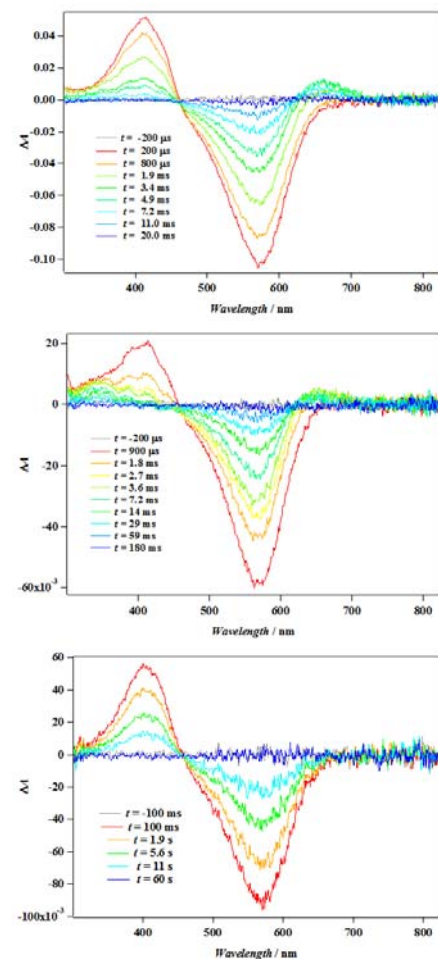


図 3 野生型 BR および BR/Rh-loop3 の過渡吸収スペクトル

時間分解赤外分光法によるバクテリオロドプシンの X-D 伸縮振動の解析

(分子研¹・バルセロナ自由大学²・名工大院工³)

○古谷 祐詞¹、Victor A. Lórenz-Fonfría³、神取 秀樹³

【序】 バクテリオロドプシン (bR) は、7回膜貫通ヘリックス構造をもち、分子内に結合した all-trans 型レチナールの光異性化によって開始する一連の光サイクル反応過程で一方向のプロトン輸送を行う。その分子機構については各種分光法、結晶構造解析、計算科学などにより詳しく解析が行われているが、蛋白質内部での段階的なプロトン移動反応の全てが理解されているとは言い難い。我々は、低温赤外分光法により、最初のプロトン移動反応における水分子の役割を明らかにし[1]、時間分解赤外分光により蛋白質外へのプロトン放出過程におけるプロトン化水クラスターの役割について明らかにした[2](図 1)。しかしながら、これまでの時間分解赤外分光計測では、水の吸収極大波長領域での計測は困難なため、その領域における X-H もしくは X-D 伸縮振動については議論されて来なかった。今回、重水水和条件下において、水の吸収極大波長領域を含む X-D 伸縮振動の時間分解計測に成功したので、その結果を報告し、bR のプロトン輸送機構との関連について議論する。

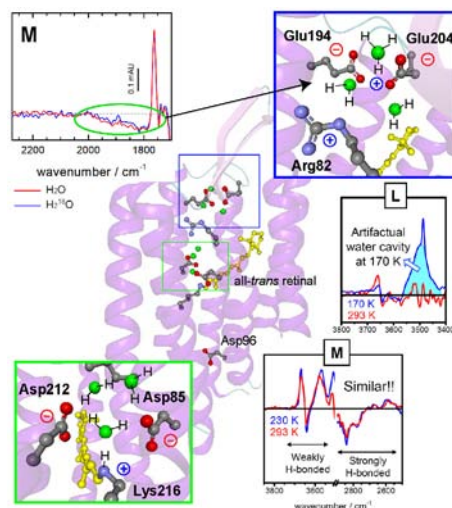


図1 バクテリオロドプシンの X-H 伸縮振動に対する時間分解赤外分光計測

【実験方法】

バクテリオロドプシンは高度好塩菌 *Halobacterium Salinarum* の菌体膜に形成される紫膜に二次元結晶を形成して存在する。これらをショ糖密度勾配遠心により紫膜のみが含まれる画分を回収し、pH 7 の 2 mM リン酸緩衝液に懸濁した。吸収極大波長(570 nm)の吸光度が 6.6 O.D.程度となるように調製し、40 μ L を直径 25mm の CaF₂ 窓板上に滴下し、真空引きすることで乾燥させフィルム状試料とした。純度 99.9% の D₂O、~1 μ L 程度の液滴 8 粒をフィルム周辺に配置させ、空の窓板と厚さ 2mm のシリコン O リングにより密閉させることで 60 分間水和した。このことで BR に含まれる H/D 置換可能な水素原子が重水素に置換される。その後、重水に 20%(v/v) で Glycerol(OD₃)を混合し、再度水和作業を行った。このことにより、大気中に含まれる H₂O 由来による O-H 伸縮振動の増大を最小限に抑えることが可能となった。

時間分解赤外分光計測は Bruker 社の VERTEX80 のステップスキャンモードにより 12.5 μ sec の時間分解能、8 cm⁻¹ の波数分解能により、-125 μ s~25 ms まで 4000-900 cm⁻¹ の波数領域 (4000 cm⁻¹ のショートパスフィルターを使用) で計測した。試料の励起は、LOTIS TII 社製のナノ秒 Nd-YAG レーザー LS-2134 の 2 倍波 532 nm (1mJ/pulse) により、10 Hz の繰り返し周波数で行った。S/N 比を高めるために、1 回の時間分解スペクトルの計測に 10 回の光反応の積算を行い、

異なる試料を用いて 2~4 回計測を行い、最終的には 20~40 本の積算を行った。同様に $D_2^{18}O$ 水和条件下の計測も行うことで水の O-D 伸縮振動の帰属を行った。さらに、pH 5 (2 mM クエン酸緩衝液)、pH 9 (2mM ホウ酸緩衝液)についても計測し、正側に現れた振動バンドが光反応サイクル中に現れるどの中間体に由来するのかを検討した。

【結果と考察】 水和量をグリセロールによって調節することで、2800-1800 cm^{-1} の領域での O-D 伸縮振動の時間変化を捉えることができた(図 2)。256 μs , 1.08 ms, 11.9 ms とそれぞれの時間領域で代表的な形状を示す差スペクトルは、低温赤外分光計測で観測した M および N 中間体との赤外差スペクトルとよく似た形状であることがわかった。また、11.9 ms での差スペクトルにはレチナールの C=C 伸縮振動が 1507 cm^{-1} に観測されていることから、O 中間体がある程度含まれている。 H_2O 水和条件下では O 中間体の蓄積が少ないため、今回の計測によって初めて O 中間体に関する構造情報が得られた。同様の計測を O 中間体がまったく蓄積しない pH 9 で行い、振動バンドが N もしくは O 中間体のどちらに由来するか検討した。その結果、2279 cm^{-1} の特徴的な正のバンドは pH 9 でも確認されたため、N 中間体で既に観測されていると結論づけた。また、N 中間体が蓄積しにくい pH 5 での計測においても、2279 cm^{-1} のバンドは確認されたことから、両方の中間体にほぼ同じ振動数で現れることが分かった。水の OD 伸縮振動を帰属するため $D_2^{18}O$ での計測も行ったが、2279 cm^{-1} のバンドは同位体シフトを示さなかったため、蛋白質部分に由来する X-D 伸縮振動であることがわかった。

N から O 中間体を形成する際に、レチナールが 13-*cis* 型から *all-trans* 型へと熱異性化し、シッフ塩基のプロトンが細胞質側から細胞外側方向へと向きを変えるため、その領域に存在する水分子の O-D 伸縮やシッフ塩基の N-D 伸縮に大きな変化が生じることが期待されたが、実際には N と O 中間体の遷移では変化がほとんど観測されなかった。つまり、N から O 中間体への遷移において、シッフ塩基領域での水素結合強度変化によるエンタルピー変化の寄与は少ないことが示唆される。現在は、2279, 2258 cm^{-1} に観測されている振動バンドがシッフ塩基の N-D 伸縮振動に由来するのか明らかにするため、 ^{15}N -Lys 標識試料の計測を進めている。

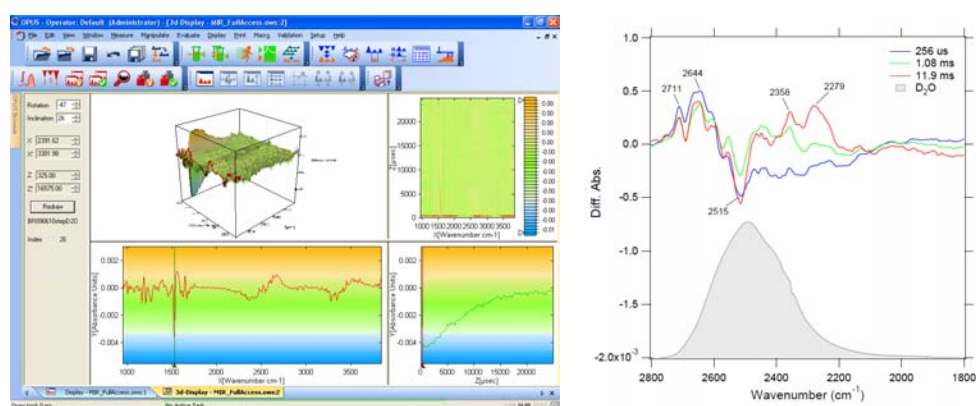


図 2 バクテリオロドプシンの X-D 伸縮振動に対する時間分解赤外分光計測

【参考文献】

- [1] Tanimoto, T., Furutani, Y. and Kandori, H. (2003) *Biochemistry* 42 (8), 2300.
- [2] Lórenz-Fonfría, V., Furutani, Y., and Kandori, H. (2008) *Biochemistry* 47 (13), 4071.

2B10

エキシトン CD スペクトルに関する計算手法の開発とレチナールタンパク質への応用

(京大院理) ○藤本和宏

【序】 円偏光二色性(CD)はキラル分子において観測される現象であり、左円偏光と右円偏光に対する吸光度の差として定義される($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$)。それぞれのキラル分子に対して特徴的な CD スペクトルが観測されることから、CD 測定は分子の絶対立体配置を決定する際に広く用いられている[1]。また、分子生物学の分野ではタンパク質の α ヘリックスや β ストランドなどの2次構造を解析する際に CD 測定が広く利用されている。

CD スペクトルの形状に対してエキシトン(励起子)結合が大きく影響を与えることが知られており、この現象は Exciton-Coupled CD (ECCD)と呼ばれている。バクテリオロドプシン3量体や塩化メチレン中でのレチナール2量体(Fig. 1)において観測される CD スペクトルは、その形状からエキシトン結合の寄与が示唆されているが[1]、理論的研究が不十分なために、これらの統一的理解には至っていないのが現状である。

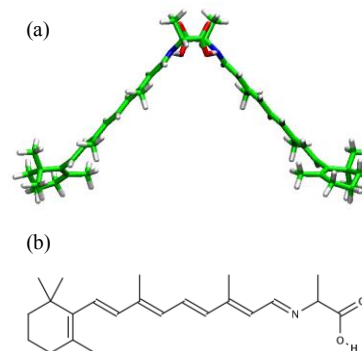


Fig. 1. (a) Optimized structure of the C_2 -symmetric retinal dimer and (b) structural formula of the monomer.

【結果】 Bayley らの考案した Matrix 法は、大規模系に対する CD スペクトル計算を可能とする方法であるが[2]、この際にハミルトニアン行列の行列要素をいかに高精度に計算するかが要求される。Matrix 法では、ハミルトニアン行列を構成する際の基底は、Frenkel 励起子モデルのように表現することから、ハミルトニアン行列の非対角項は、励起エネルギー移動(EET)速度式における電子・電子(擬クーロン)相互作用と同じ形式となる。したがって、我々の考案した TDFI 法(Transition-Density-Fragment Interaction)を用いて非対角項を計算することが可能となる[3]。

$$V_{\text{Coul}}^{\text{TDFI}} = \int d\mathbf{r}_1 \int d\mathbf{r}_2 \rho_{eg}^J(\mathbf{r}_1) \rho_{eg}^I(\mathbf{r}_2) / r_{12} = \sum_{\mu, \nu \in J} P_{\nu\mu}^J \sum_{\lambda, \sigma \in I} P_{\lambda\sigma}^I (\mu\nu | \sigma\lambda) = \sum_{\mu, \nu \in J} P_{\nu\mu}^J V_{\mu\nu}^I$$

ここで、 $P_{\nu\mu}^X$ ($X = I$ or J)は電子遷移密度行列を、 $(\mu\nu | \sigma\lambda)$ は原子基底の二電子積分を表す。計算アルゴリズムとしては我々が以前に構築した DFI 法を適用することで、遷移ポテンシャル $V_{\mu\nu}^I$ を効率よく計算できる[4]。TDFI 法の利点として、双極子・双極子(dd)近似に生じる原点依存性(双極子ベクトル)の問題を克服できる点が挙げられる。

TDFI 法の精度を調べるため、従来多用されてきた dd 近似や TrESP 法との比較を行なった。Fig. 2 に示すように、TDFI 法は他の方法と比べ、非常に高精度に電子・電子相互作用を計算で

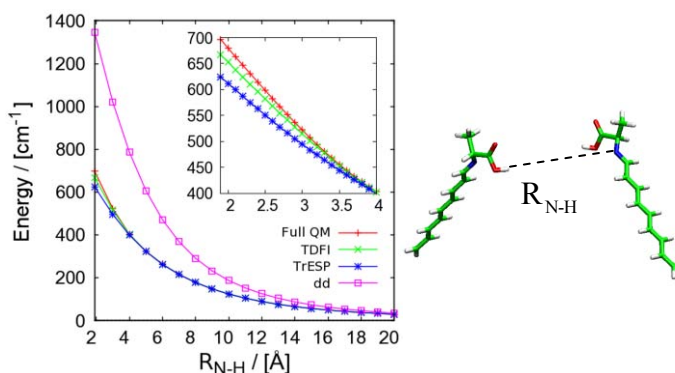


Fig. 2. Electronic coupling energies between two SB5 chromophores as a function of inter-molecular N-H distance.

きることが示された。dd 近似は 17Å 以内の距離において相互作用を過大評価するが、これは分子を取り囲む 2 つの球の間に生じる重なりによって多極子展開の仮定が成立しないことが原因であることが分かった(**Fig. 3**)。また、TrESP 法では分子間距離が 2.5Å 以内で精度が落ちるが、これは 2 分子の電子遷移密度の間での self consistency が満たされていないことが原因であることが分かった[5]。

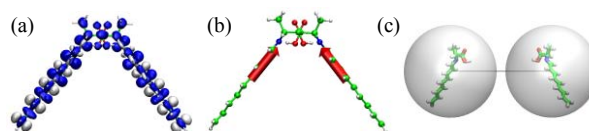


Fig. 3. (a) Transition density distributions, (b) electric transition dipole moments, and (c) spheres enclosing the transition densities.

次に、溶媒効果(PCM)が電子・電子相互作用に与える影響について調べた。**Table I** に示すように、塩化メチレン中での相互作用は気相中の場合と比べて大幅な減少(TD-B3LYP: 195cm⁻¹, TD-rCAM-B3LYP: 285cm⁻¹)が見られた。これは溶媒による遮蔽効果であることが分かった。現在の SAC-CI では PCM 計算を行えないため、このような遮蔽効果は得られなかった。これらの計算値を用いて Matrix 計算を実行した。その結果、エキシトン結合の効果によって励起エネルギーは 0.06eV の Davydov 分裂を、Rotational strength は ±3800×10⁻⁴⁰cgs という大幅な増大を起こすことが分かった。これらの計算値から CD スペクトルの計算を行なった結果、**Fig. 4** に示すような負のキラリティを示す曲線が得られた。ピークの分裂幅は 3472cm⁻¹ であり、実験値 3217cm⁻¹ を非常に高精度で再現することに成功した[5]。

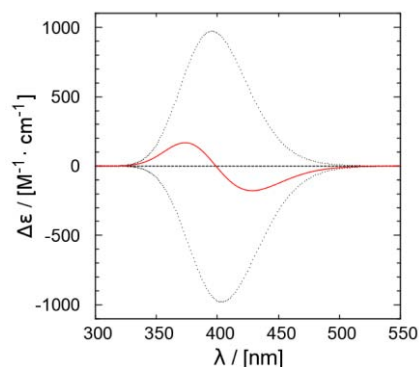


Fig. 4. Theoretical CD spectrum of the dimerized retinal. The solid line is the total CD curve and the dotted lines are the component CD ones.

本発表では、Matrix 法の対角項の計算に必要な電子分極効果についての説明、スペクトルシフト、さらにバクテリオロドプシン 3 量体で観測される CD スペクトルとエキシトン結合の効果についても述べる予定である。

Table I. Excitation energies, electronic coupling energies, and rotational strength.^a

	TD-B3LYP	TD-rCAM-B3LYP	SAC-CI	Expt. ^b
E_{ex} (eV)	3.15 (3.31)	4.00 (4.17)	3.50 (3.52)	3.26
V_{Coul} (cm ⁻¹)	252.8 (447.6)	327.8 (612.5)	517.8 (510.6)	-
R (10 ⁻⁴⁰ cgs)	-15.0 (-25.5)	44.0 (36.9)	-12.8 (-13.4)	-

^a Data in parenthesis was calculated in gas phase. The atomic coordinate used was the same as that in methylene chloride, ^b Ref. [1].

References:

- [1] Y. Gat and M. Sheves, *Photochem. Photobiol.* **59**, 371 (1994).
- [2] P. M. Bayley, E. B. Nielsen, and J. A. Schellman, *J. Phys. Chem.* **73**, 228 (1969).
- [3] K. J. Fujimoto and S. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14152 (2009).
- [4] K. Fujimoto and W.-T. Yang, *J. Chem. Phys.* **129**, 054102 (2008).
- [5] K. J. Fujimoto, submitted.

2B11

レチナールタンパク質と蛍ルシフェラーゼに対する励起状態解析

○田口 尚貴¹, 林 智彦², 櫻井 実², 加藤 太一郎³, 田中 成典⁴, 望月 祐志^{1,5}

1. 立教大理、2. 東工大バイオセンター、3. 兵庫県大院工、4. 神戸大院シス情、5. 東大生研

1. 序 近年、QM/MM 法、Divide and Conquer 法、Elongation 法、そして MTA 法など様々な大規模分子系に対する電子状態計算手法の改良や実問題への応用計算が積極的になされている。この様な中、生体分子の第一原理計算として現在までに多くの成果が報告されている方法に、フラグメント分子軌道 (FMO) 法がある[1]。FMO 計算によって知る事の出来る物理量は様々であるが、光応答タンパク質などに関する励起状態のエネルギーは CIS (Configuration Interaction Singles), ならびに電子相関を含めた CIS(D) (CIS with perturbed doubles) 系の方法で可能となっている[2,3]。本発表は、これらの枠組みを使ってレチナールタンパク質と蛍ルシフェラーゼに対する理論計算を行い、電子遷移エネルギーの評価や励起状態となる部位の詳細な解析を試みた結果について報告するものである。

2. Duo 補正 FMO スキームに基づく励起状態の計算は、分子全体 (Layer 1) を Hartree-Fock レベルでまず解き、次に光応答を担う部分と周辺部分からなる活性領域 (Layer 2) に対して、CIS(D)などの励起状態計算を適用する多層型 (Multilayer FMO; MFMO) で行われる[4]。本方法の下、我々はこれまでに赤色系蛍光タンパク質や蛍ルシフェラーゼに対し、CIS(D)から MP2 相関によって誘導される余剰緩和エネルギーの導入 (extra singles; -s) や相関振幅の部分再規格化 (Partially Renormalized; PR)を併用した PR-CIS(Ds)/6-31G*レベル[5]の励起状態計算理論を採用した解析を行って実験値との対応をとった[6,7]。本研究では、電子遷移エネルギーに対する対補正の考え方[8,9]をフラグメント分子軌道の文脈に対し直截に導入することで、計算時間の短縮と共にタンパク質中の各アミノ酸残基からもたらされる分極効果の影響を取り入れた励起エネルギーの算出を試みた (二体 (Duo) 補正の式 (ω は電子遷移エネルギー、C は活性中心フラグメントを表す); $\omega = \omega_c + \sum (\omega_{CI} - \omega_c)$)。またこれに対して、PR-CIS(D)の摂動表式のエネルギー分母中にある占有軌道エネルギーについて Green 関数による二次の自己エネルギーの繰り込み補正を行った PR-CIS(D)_{ss(2)} (-ss(2); 2nd-order Self-energy Shift, [10]) などの手法も援用した (同一理論を用いた応用計算は 4P100 でポスター講演予定)。なお実装は、私たちが自主開発している ABINIT-MPX に対して行っている。

3. レチナールタンパク質 バクテリオロドプシン (bR, PDB; 1C3W) やフォボロドプシン (ppR, PDB; 1JGJ) の発色団であるレチナールは、リシン塩基とプロトン化レチナールシッフ塩基 (Protonated Retinal Schiff base; PRSB) が共有結合したものであり、光異性化されたクロモフォアは all-*trans*-retinal と呼ばれている (図 1)。発色領域の励起は π - π^* 遷移であり、bR と ppR の吸収極大波長はそれぞれ 568nm と 498nm に相当しこの差はおよそ 70nm である[11,12]。これら二つのタンパク質間の構造は高い相同性をもっているにも関わらず、この様な違い (オプシシフト) が現れるという点について様々なモデルが提唱されているが、シフトの要因が具体的にどの程度の寄与でレチナールタンパク質の吸収波長制御に関与しているかは明らかになっていない。そこでこの問題に対する一つのモデル化学としてのアプローチとして、私たちは FMO スキーム

に基づいた励起エネルギーに対する Duo 補正計算を行い、タンパク質中のどの残基がどれだけ発色団の吸収波長に対して寄与しているのかを評価した。解析に使用した構造は、Gaussian プログラムを用いて QM/MM による構造最適化により作成した。なお、最適化計算レベルは B3LYP/6-31G** と Amber 力場である。この手順によって得られた構造を用いて MFMO に基づいた計算を行った結果、bR と ppR との間の吸収極大波長の差は実験値とほぼ対応がとれた。Duo 補正を用いた解析結果の詳細については当日詳しく報告したい。

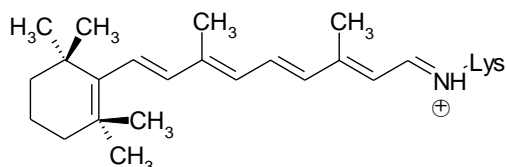


図 1. all-*trans*-retinal

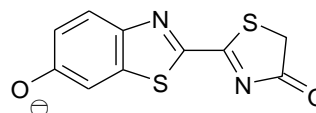


図 2. Oxyluciferin

4. 蛍ルシフェラーゼ ホタルの生物発光は分子生物学や生体内の分子イメージングで広く用いられている。蛍の発光反応の最大の謎は、発光色の制御のメカニズムである。我々は、アミノ酸置換によって様々に変化する発光波長をできるだけ正確に予測する為、実験的研究と相補的に理論計算を進行している。スタンスとしては、活性中心であるオキシルシフェリンについては図 2 で示した通りのままの構造とし、周辺残基に対して行う変異が発光エネルギーに対してどの様に寄与するかを検証するというものである。本研究では、既に先行研究[7]として報告済みである分子動力学 (MD) シミュレーションパッケージ Amber7 を使って構造サンプリングした野生型 (WT, PDB; 2D1S) と I288A 変異型の構造を用いて Duo 補正計算を行った (WT の結果: 表 1)。また、Oxyluciferin の構造については π - π^* 遷移した状態について CIS/6-31G レベルで最適化したモデルを使用した。現在、基底状態と励起状態との電子密度差を CIS レベルで算出し、FMO で直截に計算可能なフラグメント間相互作用エネルギー (IFIE; Inter-Fragment Interaction Energy) と連携して議論出来る様に調整しているところなので、これらの進捗と併せて当日講演したい。

表 1. Duo 補正計算の結果 (CIS(D)/6-31G)

r_{\min} (Å)		$W_{CI}-W_C$ (eV)	E_{exc} (eV)
	Oxyluciferin		2.30
2.147	AMP 546	-0.03	2.27
2.299	ARG 220	0.00	2.26
2.610	THR 253	0.00	2.26
2.733	GLY 318	-0.01	2.25
2.830	GLY 341	0.02	2.27
2.847	GLY 317	-0.01	2.26
2.867	LEU 344	0.00	2.26
2.878	WAT	-0.01	2.25
2.926	THR 345	0.00	2.25
2.939	PHE 249	-0.02	2.23
2.989	ALA 350	-0.01	2.22
Expt. [13]			2.21

r_{\min} : Oxyluciferin と対象フラグメント間の最近接原子間距離

謝辞 本研究は、文部科学省科学技術研究費 (特別研究員奨励費) と立教大学学術推進特別重点資金 (立教 SFR; Rikkyo University Special Fund for Research) の支援を受け実施した。

参考文献 [1] K. Kitaura et al., *Chem. Phys. Lett.*, **313** (1999) 701. [2] M. Head-Gordon et al., *Chem. Phys. Lett.*, **219** (1994) 21. [3] Y. Mochizuki et al., *Theor. Chem. Acc.*, **117** (2007) 541. [4] D. G. Fedorov et al., *J. Phys. Chem. A*, **109** (2005) 2638. [5] Y. Mochizuki et al., *Chem. Phys. Lett.*, **443** (2007) 389. [6] N. Taguchi et al., *J. Phys. Chem. B*, **113** (2009) 1153. [7] A. Tagami et al., *Chem. Phys. Lett.*, **472** (2009) 118. [8] S. Hirata et al., *Mole. Phys.*, **103** (2005) 2255. [9] M. Chiba et al., *Chem. Phys. Lett.*, **444** (2007) 346. [10] Y. Mochizuki, *Chem. Phys. Lett.*, **472** (2009) 143. [11] R. R. Birge et al., *J. Chem. Phys.*, **92** (1990) 7178. [12] J. Hirayama et al., *Biochemistry*, **31** (1992) 2093. [13] T. Nakatsu et al., *Nature*, **440** (2006) 372.