

## 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<sup>1</sup>・バルセロナ自由大学<sup>2</sup>・名工大院工<sup>3</sup>)

○古谷 祐詞<sup>1</sup>、Victor A. Lórenz-Fonfría<sup>3</sup>、神取 秀樹<sup>3</sup>

【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。

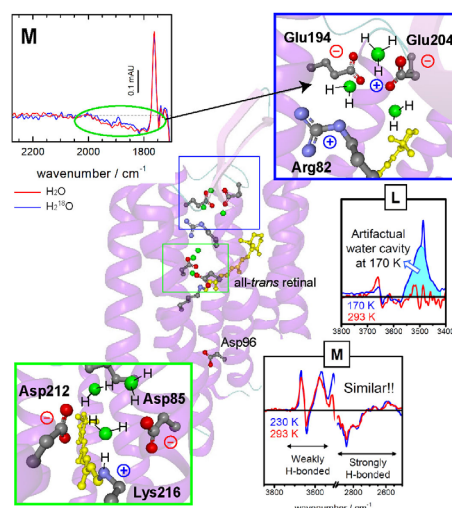


図1 バクテリオロドプシンの X-H 伸縮振動に対する時間分解赤外分光計測

### 【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  $\mu$ L を直径 25mm の CaF<sub>2</sub> 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 D<sub>2</sub>O、~1  $\mu$ 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(OD<sub>3</sub>)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 H<sub>2</sub>O 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  $\mu$ sec の時間分解能、8  $\text{cm}^{-1}$  の波数分解能により、-125  $\mu$ s~25 ms まで 4000-900  $\text{cm}^{-1}$  の波数領域 (4000  $\text{cm}^{-1}$  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由来なのかを検討した。

【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  $\mu s$ , 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。

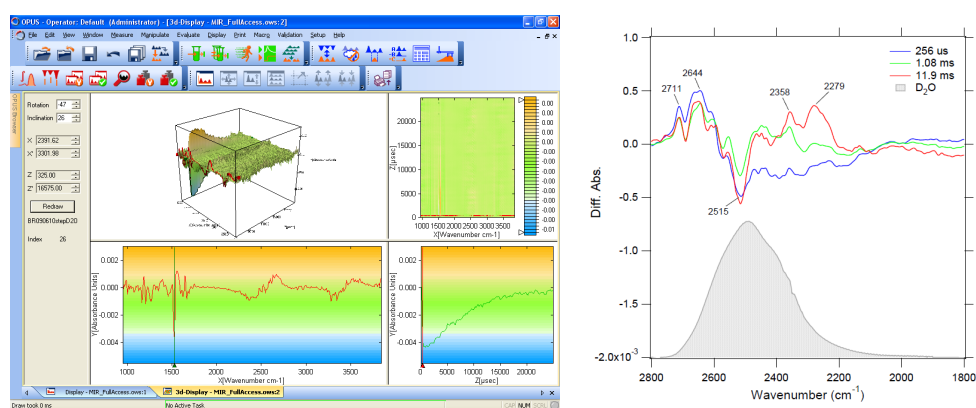


図 2 バクテリオロドプシンの X-D 伸縮振動に対する時間分解赤外分光計測

#### 【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.