

4A03

## ロドプシンの活性中心における水の水素結合強度の違い

(京大・生命科学系キャリアパス<sup>1</sup>, 名工大院・工<sup>2</sup>, JST さきがけ<sup>3</sup>)

齋藤圭亮<sup>1</sup>, 神取秀樹<sup>2</sup>, 石北央<sup>1,3</sup>

## Difference of H-bond strengths of water in the active center of rhodopsin

(Kyoto Univ.<sup>1</sup>, Nagoya Inst. of Tech.<sup>2</sup>, JST PRESTO<sup>3</sup>)

Keisuke Saito<sup>1</sup>, Hideki Kandori<sup>2</sup>, Hiroshi Ishikita<sup>1,3</sup>

【序】プロトンポンプ機能を持つ bacteriorhodopsin (BR)とポンプ能を持たない *Anabaena* sensory rhodopsin (ASR)は、互いに高い相同性を持つ蛋白質である。その活性中心には発色団としてレチナールが存在しここで光異性化反応が起こる。レチナール近傍にある水分子 W402 は BR と ASR で共通に存在し[1, 2], BR においてはプロトンポンプに関与していると考えられている。W402 は BR と ASR とで保存されているアスパラギン酸残基(それぞれ Asp85 と Asp75)と水素結合を形成している(図 1)。フーリエ変換赤外分光(FTIR)実験によると、重水素置換した W402 の O-D 伸縮振動数は BR のほうが ASR に比べて約  $300\text{ cm}^{-1}$  低い(=水素結合が強い)ことが報告されている[3, 4]。本研究では両蛋白質間で水素結合強度が異なる理由を、蛋白質構造に立脚した理論解析によって明らかにした[5]。

【計算手法】 全ての計算は BR および ASR の X 線結晶構造[1, 2]を基にした。連続体モデルを用いた静電ポテンシャル計算により、保存 Asp の  $pK_a$  を算出した。全ての蛋

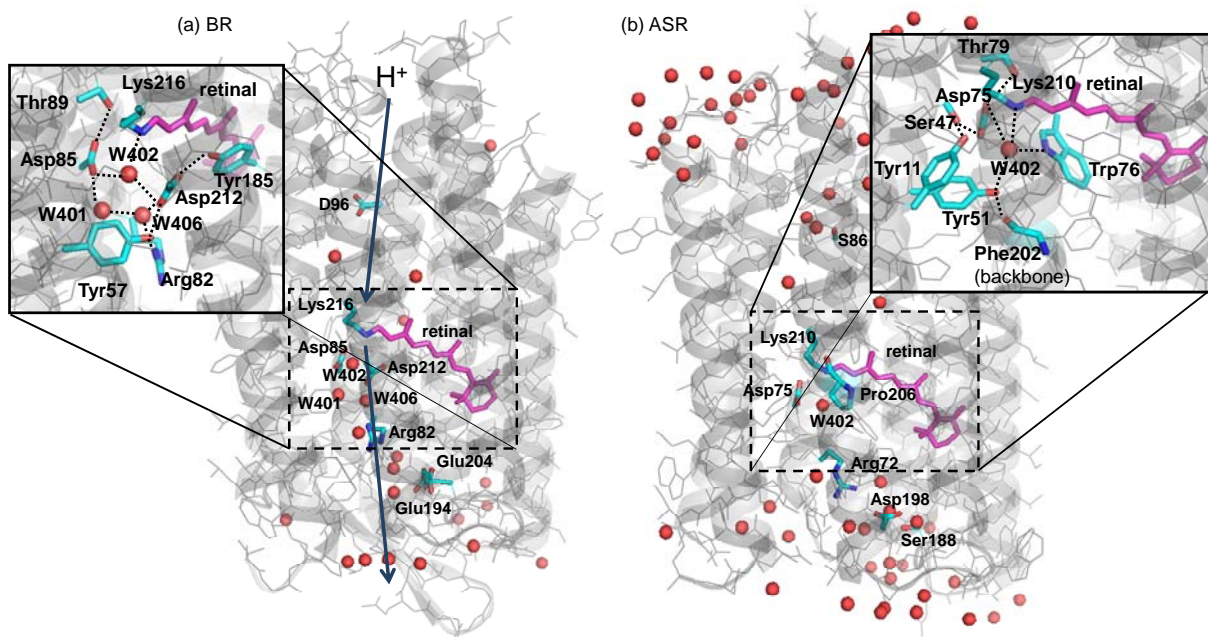


図 1: (a)BR および(b)ASR の全体構造と活性中心の水素結合ネットワーク[1, 2]。BR はプロトンポンプ能を持つが ASR は持たない。赤い球は水分子を表す。

白質環境を考慮に入れた QM/MM (quantum mechanical/molecular mechanical)法を用いて、構造最適化、振動数解析および水素結合ポテンシャルの計算を行った。QM 領域として W402 に関与する水素結合ネットワーク内の全残基と水分子(図 1)を含めた。

【結果と考察】BR における Asp85 の  $pK_a$  の計算値は 1.5 となり, ASR における Asp75 の計算値-5.1 に比べて大きかった。この  $pK_a$  差は、水素結合ポテンシャルの形(図 2)に違いを生じさせる：

(1) ポテンシャルの右肩(Asp 側)の高さは ASR より BR のほうが低い(図 2 矢印 1)。これは BR の Asp の  $pK_a$  が ASR より大きいことを反映している。  
 (2) ポテンシャルにおける左(W402 側)の well は ASR よりも BR のほうが緩やかにカーブしている(図 2 矢印 2)。well のカーブが緩やかなほど W402 の O-D 伸縮振動数は低くなる。実際、振動数解析の計算結果においても、BR の振動数は ASR に比べて  $300\text{ cm}^{-1}$  小さくなった。このことは FTIR の実験[3,4]と合致する(表 1)。

(3) W402 側と Asp 側の両方を含めたポテンシャル全体の well の幅は Asp と W402 間の水素結合距離を反映している。BR のこの幅は ASR に比べて小さく(図 2 矢印 3)、水素結合距離が短い(=結合強度が強い)ことを意味する。実際、構造最適化の結果、BR では W402-Asp 水素結合距離(結晶構造では  $2.6\text{ \AA}$ )は  $2.57\text{ \AA}$  と短い一方, ASR ではその距離(結晶構造では  $2.7\text{ \AA}$ )は  $2.71\text{ \AA}$  と長くなった。

【結論】水分子 W402 の水素結合の強弱は、結合先の保存 Asp 残基(BR では Asp85, ASR では Asp75)の  $pK_a$  の大小に起因する。このことが究極的に BR と ASR のプロトンポンプ能の有無を決定していると考えられる。

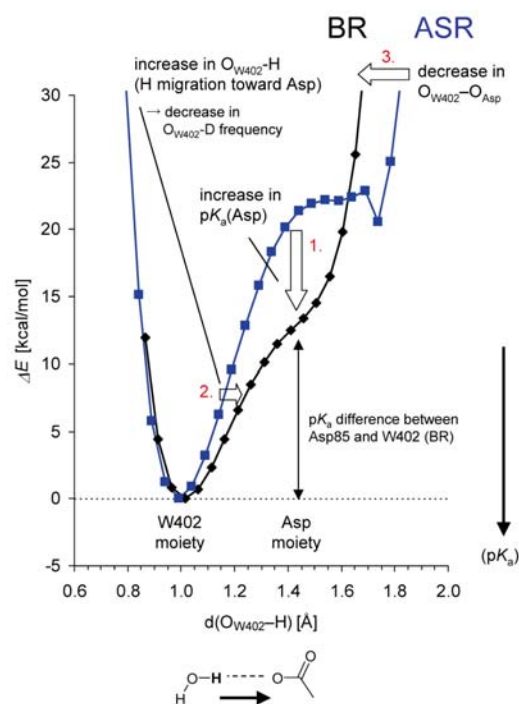


図 2: BR(黒)と ASR(青)における水分子 W402 と保存 Asp 間の水素結合ポテンシャル。左の well は水素原子が W402 に、右の肩は Asp に所属している状態を表す。肩の高さは W402 と Asp の  $pK_a$  差を反映している。左の well のカーブが緩いほど W402 の O-D 伸縮振動数は小さくなり、全体の well の幅が狭いほど水素結合距離は短くなる。

表 1: W402 の O-D 伸縮振動数の実験値と計算値との比較 [ $\text{cm}^{-1}$ ]

	FTIR実験	QM/MM計算
BR	2171 [3]	2078
ASR	~2500 [4]	2376
差	~300	298

## References:

- [1] Luecke, H., Schobert, B., Richter, H. T., Cartailler, J. P., Lanyi, J. K. (1999) *J Mol Biol* **291**, 899.
- [2] Voageley, L., Sineschekov, O. A., Trivedi, V. D., Sasaki, J., Spudich, J. L., Luecke, H. (2004) *Science* **306**, 1390.
- [3] Shibata, M., Kandori, H. (2005) *Biochemistry* **44**, 7406.
- [4] Furutani, Y., Kawanabe, A., Jung, K. H., Kandori, H. (2005) *Biochemistry* **44**, 12287.
- [5] Saito, K. Kandori, H. Ishikita, H. (2012) *J. Biol. Chem.*, in press.