

4A05

ハロロドプシンの光サイクル初期過程におけるタンパク質構造ダイナミクス： 塩化物イオンの効果

(阪大院理¹、名工大院工²) 下尾祐未¹, 水野操¹, 神取秀樹², 水谷泰久¹

Protein Dynamics in Primary Process of the Photocycle of Halorhodopsin: Effect of Chloride Ion in the Binding Site

(Osaka University¹ and Nagoya Institute of Technology²) Yumi Shimoo¹, Misao Mizuno¹,
Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

【序】ハロロドプシン (HR) は古細菌中に存在し、塩化物イオン (Cl⁻) を輸送する光駆動イオンポンプである。そのレチナル発色団の近傍にはCl⁻イオン結合部位が存在し、発色団の光異性化に駆動されたタンパク質の構造変化がイオンの移動を誘起する。本研究では、時間分解紫外共鳴ラマン (UVRM) 分光法を用いて、レチナル発色団の光異性化に対するタンパク質部分の応答について、Cl⁻イオンの効果を調べた。実験結果に基づき、タンパク質部分の初期過程の構造変化について議論する。

【実験】HR は、大腸菌中で発現させ、クロマトグラフィーを用いて精製した。測定試料には、HR を界面活性剤 (DDM) を含んだ 10 mM MOPS バッファー (pH 7.0) に可溶化したものを用いた。Cl⁻イオン結合形 (purple-form) は 150 mM NaCl を、アニオン非結合形 (blue-form) は 50 mM Na₂SO₄ を上記の溶液に加えて調製した。ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル測定はポンプ・プローブ法により行った (ポンプ光波長 586 nm、プローブ光波長 225 nm、装置応答時間 3.4 ps)。測定試料を液膜状に流し、そこにポンプ光、プローブ光を照射し、タンパク質からのラマン散乱光を観測した。可視共鳴ラマンスペクトルは、blue-form、purple-form、NO₃⁻イオン結合形、Br⁻イオン結合形、N₃⁻イオン結合形の試料について、アルゴンイオンレーザーの波長 514.5 nm の発振線を用いて測定した。

【結果と考察】図 1 に purple-form と blue-form の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを示す。各遅延時間におけるスペクトルは、光反応によるスペクトル変化が非常に小さいため、プローブ光とポンプ光を照射して測定したスペクトルから、プローブ光のみを照射して測定したスペクトルの差スペクトルである。それぞれのスペクトルにおいて、W で示されるトリプトファン (Trp)

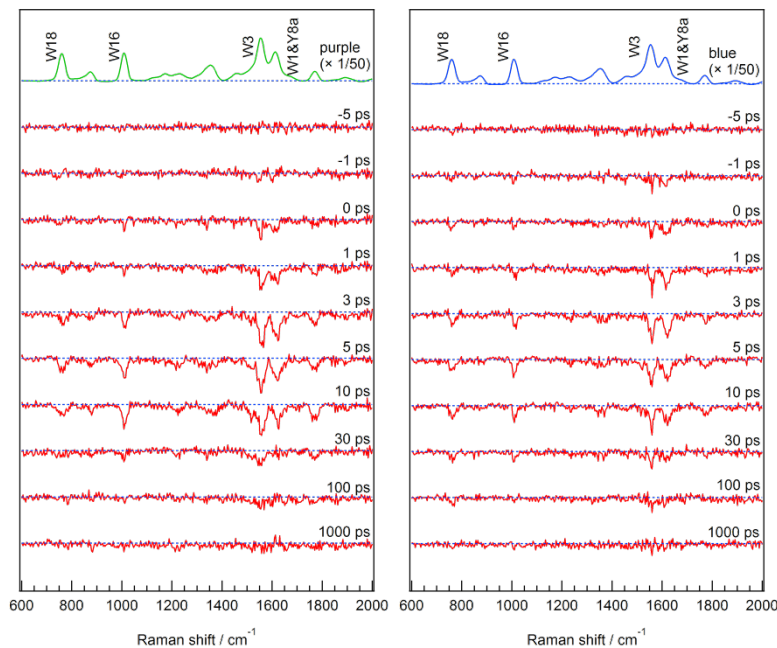


図 1. HR のピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。左は purple-form、右は blue-form のものである。

残基由来のバンドおよび Y で示されるチロシン (Tyr) 残基由来のバンドが負の強度を持ち、反応中間体では、バンド強度が減少することがわかった。この強度変化は、光励起に伴うタンパク質の構造応答を反映している。また、purple-form、blue-form とともに、W3 バンドを構成する成分のうち、高波数側の成分が強度減少を示した。差スペクトルにおける各バンド強度の時間変化を図 2 に示す。purple-form では、光励起に伴い、1616 cm⁻¹ のバンド (W1 バンドと Y8a バンドが重なったもの) および W3 バンドは装置応答時間内で強度が減少する

のに対して、W16 および W18 バンドは強度減少に約 2 ps の時定数をもつ成分があることがわかった。これらの 4 本のバンドはその後強度を回復し、回復はいずれのバンドも時定数 19 ps をもつ指数関数でよく表すことができた。blue-form についても同様に、W16 および W18 バンドの強度減少の遅れと約 20 ps の強度回復が観測された。以上のように、タンパク質の構造応答には Cl⁻イオンの効果はみられなかった。

これに対して、発色団の C=C 伸縮振動バンドには Cl⁻イオンの有無によって、またイオンの種類によって波数の違いがみられた (blue-form, 1520.0 cm⁻¹; purple-form, 1525.0 cm⁻¹; NO₃⁻結合形, 1529.4 cm⁻¹)。さらに、レチナールの吸収極大波長にもイオン依存性がみられた。

2 つの実験結果から、アニオンは静電相互作用によってレチナールの電子状態に影響を及ぼすが、タンパク質の初期過程の構造変化には大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。HR の IR 分光法による研究で、シッフ塩基と近傍の水分子との水素結合の強さは purple-form と NO₃⁻イオン結合形とで大きな違いがないことが報告されている¹。また、上に述べた可視共鳴ラマンスペクトルの結果において、purple-form と NO₃⁻イオン結合形の C=C 伸縮振動バンドの波数の差 (-4.4 cm⁻¹) と、purple-form と blue-form のそれ (+5.0 cm⁻¹) とは絶対値が同程度であり、Cl⁻イオンの有無による差は、上記 2 種類のアニオンの差と同程度の効果しか生まないと推測できる。したがって、purple-form と blue-form の間においてもシッフ塩基の水素結合には大きな差がないと考えられる。光異性化に伴うシッフ塩基の動きがタンパク質の構造変化の引き金であるとすると、2 つの form の間でタンパク質の構造応答の速さに大きな差がなかったことを説明できる。

観測された HR の強度回復の時定数は、これまでに報告された古細菌型ロドプシンのバクテリオロドプシン、センサーロドプシン II の値とよく似ていた^{2,3}。これらのタンパク質では、レチナール周辺にある 3 つの Trp 残基は保存されている。したがって、類似した時定数は、光異性化に伴う古細菌型ロドプシン共通の動的特性を反映していると考えられる。

ラマンバンドの強度減少の速さはバンドによって異なっていた。このような挙動は、他の古細菌型ロドプシンでは見られておらず、HR で初めて観測されたものである。これは、時間変化の速い Trp 残基と遅い Trp 残基がスペクトル変化に寄与しているためだと考えることができる。しかし、実験結果を定量的に再現するためには、速い残基と遅い残基のスペクトルに、大きな相対強度の差があることを仮定しなければならないため、この可能性については現在検討中である。

【謝辞】 HR の試料調製に関して、出村誠教授 (北海道大学)、古谷祐詞准教授 (分子科学研究所)、須藤雄気准教授 (名古屋大学) にご助言を頂きました。

¹ Nakashima, K., Nakamura, T., Takeuchi, S., Shibata, M., Demura, M., Tahara, T., and Kandori, H. (2009) *J. Phys. Chem. B*, **113**, 8429-8434. ² Mizuno, M., Shibata, M., Yamada, J., Kandori, H., and Mizutani, Y. (2009) *J. Phys. Chem. B*, **113**, 12121-12128. ³ Mizuno, M., Sudo, Y., Homma, M., and Mizutani, Y. (2011) *Biochemistry*, **50**, 3170-3180.

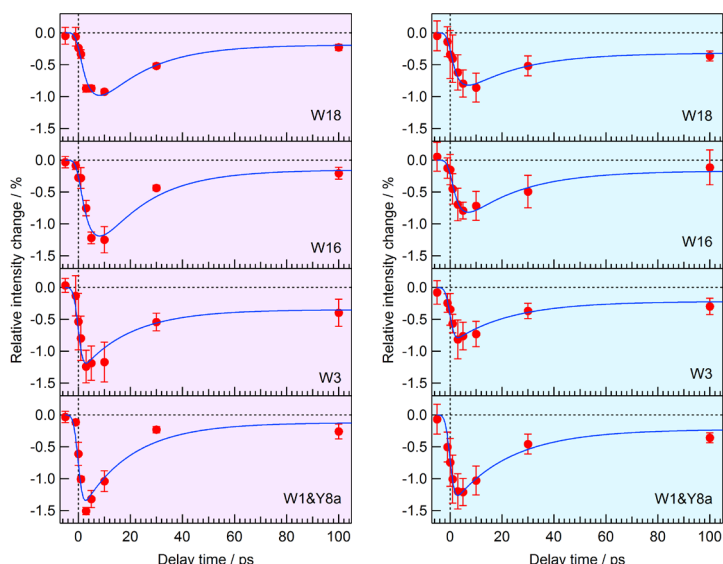


図 2. HR のバンド強度の時間変化。(左) purple-form、(右) blue-form。●は各遅延時間における相対強度変化。実線は、次の関数でフィットしたものであり、以下の時定数で最もよくフィットした。フィッティング関数: $A_1 \times \exp(-t / \tau_{\text{recovery}}) + A_2$ (W3, W1&Y8a バンド) $A_1' \times (-\exp(-t / \tau_{\text{bleach}}) + \exp(-t / \tau_{\text{recovery}})) + A_2'$ (W18, W16 バンド)
purple-form: $\tau_{\text{bleach}} = 2 \pm 1$ ps, $\tau_{\text{recovery}} = 19 \pm 4$ ps
blue-form: $\tau_{\text{bleach}} = 3 \pm 1$ ps, $\tau_{\text{recovery}} = 22 \pm 3$ ps