

3D19

ハロロドプシン光反応中間体のタンパク質構造ダイナミクス観測

(阪大院理¹、名工大院工²) ○水野 操¹、下尾 祐未¹、神取 秀樹²、水谷 泰久¹

Observation of protein structural dynamics in photointermediates of halorhodopsin

(Osaka University¹, Nagoya Institute of Technology²)

Misao Mizuno¹, Yumi Shimoo¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

はじめに ハロロドプシン (HR) は、光駆動イオンポンプである。レチナール発色団の光異性化がトリガーとなり、さまざまな中間体を経由するサイクル反応[1]の間に、塩化物イオンを細胞外から細胞内へポンプする。レチナールは、タンパク質中に含まれるリジン残基とプロトン化シッフ塩基を介して結合している。HR では、シッフ塩基近傍にアニオン結合サイトがある。この結合サイトには、塩化物イオンの他にもさまざまなアニオンが結合する。レチナール発色団の電子状態は、結合するアニオンの影響を受け、吸収スペクトルの吸収極大波長や C=C 伸縮振動の振動数に変化する。われわれは、今年の討論会において、塩化物イオンの移動開始前のピコ秒時間領域では、レチナールの異性化に対するタンパク質部分の応答速度が、結合サイトにあるアニオンの影響を受けないことを報告した[2]。今回、HR 内を塩化物イオンが移動するナノ秒からマイクロ秒領域において時間分解共鳴ラマン測定を行い、タンパク質構造ダイナミクスについて、結合サイトにおけるアニオン依存性を調べた。

実験 測定試料には、*N. pharaonis* 由来の HR をバッファー (pH 7.0) に可溶化させたものを用いた。塩化物イオン結合形 (purple 形、 $\lambda_{\max} = 578 \text{ nm}$)、アニオン非結合形 (blue 形、 $\lambda_{\max} = 602 \text{ nm}$)、およびギ酸イオン結合形 ($\lambda_{\max} = 563 \text{ nm}$) の 3 種類の試料溶液をバッファー調製により作製した。時間分解共鳴ラマン測定は、円筒状セルに試料溶液をフローさせ、ポンププローブ法 (ポンプ光 532 nm、プローブ光 475 nm、パルス幅約 20 ns) により行った。

結果と考察 図 1 に purple 形 HR の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。一番上のスペクトルは、プローブ光のみで測定したスペクトルで、未反応状態の HR におけるレチナール発色団のスペクトルに対応する。その他のスペクトルは、ポンプ光照射により現れる光反応中間体における発色団の時間分解共鳴ラマンスペクトルである。ポンプ光照射直後の 50 ns のスペクトルでは、972, 1198, 1532 および 1622 cm^{-1} にバンドが現れた。これらのバンドは時間とともに減衰し、代わりに 1012, 1166, 1188, 1200, 1550 および 1651 cm^{-1} にバンドが出現し、その強度が増大した。

はじめに現れたバンドは、出現の時間帯から K 中間体 ($\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$ [1]) のバンドであると考えられる。K 中間

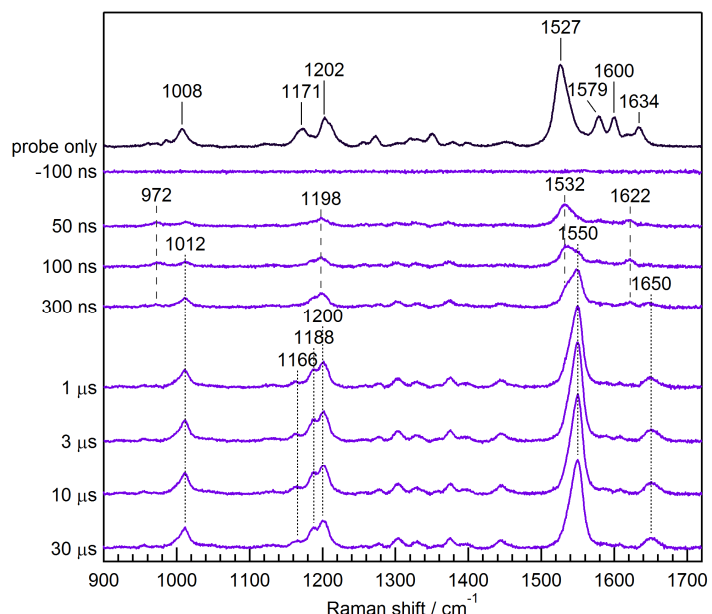


図 1. purple 形 HR の時間分解共鳴ラマンスペクトル。

体のスペクトルは、HR と同じ微生物型ロドプシンであるバクテリオロドプシン (BR) において観測されている[3, 4]。BR では、K 中間体の C=C 伸縮振動バンドは 1517 cm^{-1} に観測され、未反応状態のバンド (1528 cm^{-1}) よりも低波数側に現れる。今回、HR では発色団の C=C 伸縮振動バンドが、未反応状態では 1527 cm^{-1} に、K 中間体では高波数側の 1532 cm^{-1} に観測され、BR とは逆の関係がみられた。K 中間体の吸収極大波長は、未反応状態のそれと比較して、BR では長波長側 ($570 \rightarrow 590\text{ nm}$) に、HR では短波長側 ($578 \rightarrow 570\text{ nm}$) にシフトする。したがって、今回の観測結果は、レチナルタンパク質について知られている C=C 伸縮振動の振動数と吸収極大波長の相関関係を満たしていることがわかる。

図 1 のマイクロ秒領域で観測されたスペクトルは、既報のスペクトル[5, 6]との比較から purple 形 HR の L 中間体 ($\lambda_{\text{max}} = 520\text{ nm}$ [1]) に帰属できる。そこで時間分解ラマンスペクトルから、L 中間体の生成ダイナミクスやレチナル発色団周辺の構造を議論する。図 2 に、結合するアニオンの種類の異なる HR の時間分解共鳴ラマンスペクトルの C=C および C=N 伸縮振動バンド領域の拡大図を示す。図 2(a)の purple 形と比較して、(b)の blue 形および(c)のギ酸イオン結合形では、異なるスペクトル変化を示すことがわかった。blue 形では、purple 形で観測されるような K 中間体のバンドは観測されなかった。また L 中間体では、過去の報告[6]どおりに 2 本の C=C 伸縮振動バンドが観測された。これらは、結合サイトにアニオンがないことで、発色団の構造が purple 形とは異なっていることを示唆している。ギ酸イオン結合形では、K および L 中間体のスペクトル形状は、purple 形のものとはよく一致していた。しかしながら、 $10\text{ }\mu\text{s}$ 以降の遅延時間では、 1562 cm^{-1} に新たに C=C 伸縮振動バンドが出現した。ギ酸イオン結合形 HR には、purple 形 HR では現れない M 中間体が生成する[7]ため、 1562 cm^{-1} のバンドは M 中間体のバンドと帰属した。この C=C 伸縮振動バンドの振動数は、BR の M 中間体 [4]ともよく一致していた。バンド強度の時間変化から、L 中間体の生成時間は、purple 形、blue 形およびギ酸イオン結合形で、それぞれ 650 , 750 および 390 ns と求められた。結合サイトにあるアニオンの効果は、ピコ秒領域でのレチナルの異性化に対するタンパク質の応答速度に現れなかった[2]が、ナノ秒以降の塩化物イオンの移動が起こる L 中間体の生成過程の速度に影響を与えることがわかった。

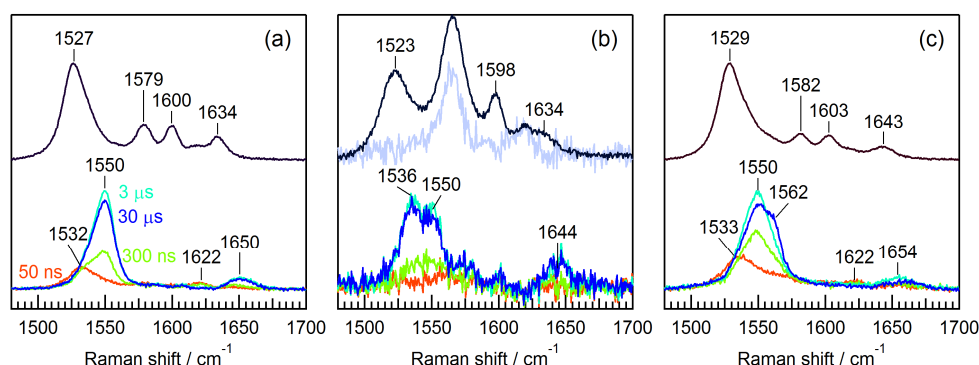


図 2. HR の時間分解共鳴ラマンスペクトルの結合アニオンの影響. (a) purple 形, (b) blue 形, (c) ギ酸イオン結合形. 各スペクトルの上段が未反応状態のスペクトル, 下段が時間分解スペクトル (遅延時間: 橙 50 ns, 緑 300 ns, 水色 3 μs , 青 30 μs). (b)上段、 1565 cm^{-1} 付近のバンドは、遊離したレチナル (薄青色) のバンドである。

参考文献 [1] I. Chizhov and M. Engelhard, *Biophys. J.* **81**, 1600 (2001). [2] 下尾ら, 第 6 回分子科学討論会, 4A05 (2012). [3] R. Lohrmann and M. Stockburger, *J. Ramam Spectrosc.* **23**, 575 (1992). [4] S. Smith, et al., *J. Membr. Biol.* **85**, 95 (1985). [5] J. B. Ames, et al., *Biochemistry* **31**, 12546 (1992). [6] S. Gerscher, et al., *Biochemistry* **36**, 11012 (1997). [7] K. Mevorat-Kaplan, et al. *Biochemistry* **44**, 14231 (2005).