

微生物型ロドプシン中に存在する水分子の近赤外分光解析

(名古屋工業大学*) ○伊藤 奨太*、神取 秀樹*

Near infrared spectroscopy of water molecules in microbial rhodopsins

(Nagoya Institute of Technology*) ○Shota Ito*, Hideki Kandori*

【序】光エネルギーを利用してイオンの輸送を行う微生物型ロドプシンとして、光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン(BR)、クロライドポンプであるハロロドプシン(HR)、光駆動のカチオンチャネルであるチャンネルロドプシン(ChR)などがある。これら微生物型ロドプシンのイオン輸送メカニズムの研究のため、我々は赤外分光法を用いた水素結合ネットワークの解析を行ってきた。その結果、BRなどのプロトンポンプには必ず強い水素結合を形成した水分子が存在していることを発見し(図1左)、水分子の水素結合エネルギーがポンプ機能に必須であることを明らかにした^[1]。またBRではアミノ酸変異体を用いた水分子の伸縮振動解析によって、レチナールシッフ塩基近傍に存在する水分子の水素結合強度が明らかにされている(図1右)^[2]。その一方で、ChRでは水分子の水素結合がBRなどと比較して弱く、水分子の位置も異なっていることが示唆された。さらにChRではカチオンを通すために非常に多くの水分子が存在していることがわかった^[3]。

このように、微生物型ロドプシンに結合した水分子の伸縮振動を直接、捉えることで、さまざまなロドプシン機能における水分子の役割を調べているが、タンパク質内の水素結合ネットワークに含まれる複数個の水分子の解析は容易なことではない。BRの場合、1個の水分子に含まれる2個の伸縮振動モードのカップリングが弱かったため(図1右)、変異体解析を用いて水分子の伸縮振動を同定することができ^[2]、理論計算との対応も取れている^[4]、タンパク質構造を変えてしまう変異体を用いた部位の同定には限界がある。そこで本研究において、我々は近赤外分光法に着目した。近赤外の領域には、水分子のO-H伸縮振動の倍音成分やO-H伸縮振動と変角振動の結合音成分が現れる。近赤外分光は、水の状態をモニターすることで食品の分析などに実用化されている手法であるが、同時に中赤外の振動情報が得られないために、基準振動との対応が得られず、解析は経験的なものに留まっているのが現状で

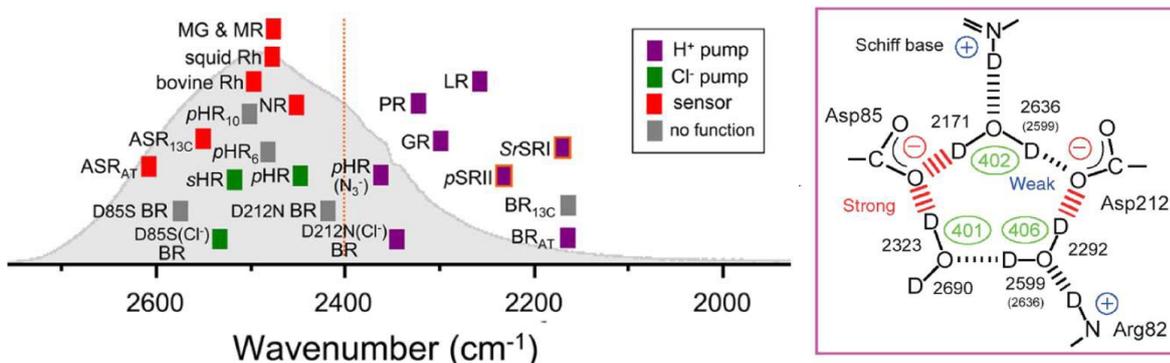


図1. (左図) ロドプシンに含まれる内部結合水で最も強い水素結合を形成した水分子のO-D伸縮振動^[1] (右図) BRのレチナール近傍に存在する水分子を含めた水素結合ネットワーク^[2]

ある。特定の水分子に対する伸縮振動（中赤外）とその倍音や結合音（近赤外）を測定することができれば、複雑な水素結合ネットワーク中における伸縮モードの非調和性なども将来的には議論することが可能になると期待される。

【実験】微生物型ロドプシンの中で比較的安定かつ光反応強度の大きいBRとプロテオロドプシン（GPR）を試料として用いた。これらの精製タンパク質をフッ化バリウム製の窓板に載せ、乾燥後、5 μl の純水によって水和させ測定を行った。測定にはアジレント社製のFT-NIR分光器（Cary 670）を用いて、7500-2800 cm^{-1} 領域の設定でX-H伸縮振動とその倍音・結合音の成分を検出した。

【結果と考察】近赤外分光法では禁制遷移であるX-H伸縮振動の倍音や結合音の振動を検出するが、その吸収はX-H伸縮振動の10-100分の1程度である。そのため始めに、C-H伸縮振動（2925 cm^{-1} ）とその倍音（5785 cm^{-1} ）・結合音（4333 cm^{-1} ）の成分を用いて吸収強度の比較を行い、近赤外分光測定に必要なタンパク質量を見積もった（図2）。その結果、近赤外分光には5.0 mgのサンプル量が必要と見積もられた（中赤外分光には0.1 mgを使用）。

次に、プロトンポンプ型微生物型ロドプシンであるBRとGPRの試料(5.0 mg)を用いて、光反応の観察を77 Kで試みた。

BRやGPRのレチナル近傍に存在する水分子には、水素結合を形成していないO-H伸縮振動（3620 cm^{-1} 付近）をもつ水分子（dangling water）が中赤外分光で確認されている。一方、近赤外分光での濃い試料の条件では3600-2800 cm^{-1} の中赤外領域の吸収が大きすぎて測定不可能であるが、dangling waterのO-H伸縮振動は同一のバンドとして観察された。そこで、dangling waterのO-H伸縮振動を中赤外分光法と近赤外分光法との共通の指標とした上で、O-H伸縮振動の倍音・結合音成分の解析を行っている。

本発表では微生物型ロドプシンに対する近赤外領域で光誘起差スペクトルを測定し、中赤外領域に現れる水分子のO-H伸縮振動と比較した結果をもとに議論したい。

【参考文献】

- [1] Kandori, H. (2010) K.-L. Han, G.-J. Zhao, eds., pp. 377-391, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.
- [2] Shibata, M. Kandori, H. (2005) *Biochemistry* **44**, 7406-7413
- [3] Ito, S., Kato, H. E., Taniguchi, R., Iwata, T., Nureki, O., Kandori, H. (2014) *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 3475-3482
- [4] Hayashi, S. Tajkhorshid, E. Kandori, H. Schulten, K. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10516-10517

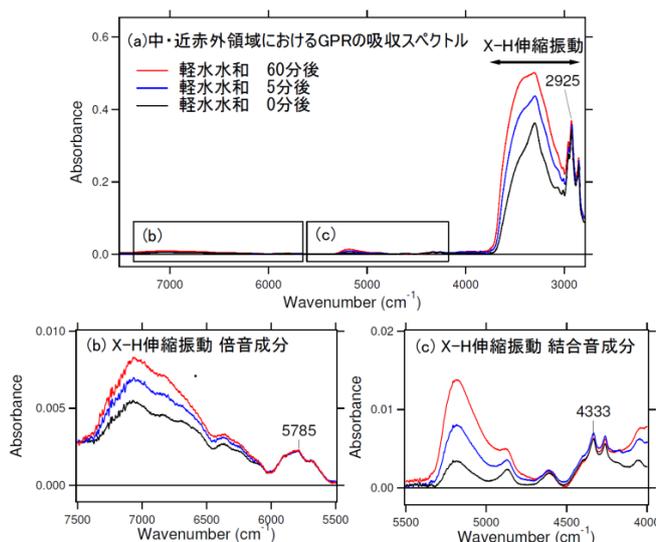


図2. 中・近赤外領域におけるGPRの吸収スペクトルの軽水水和による時間変化