

3P077

光駆動塩化物イオンポンプの反応初期中間体の発色団構造

(阪大院理¹、名工大院工²) ○久保田 真司¹、水野 操¹、神取 秀樹²、水谷 泰久¹

Chromophore structures in the early intermediates of light-driven chloride ion pumps
(Osaka University¹, Nagoya Institute of Technology²)

Shinji Kubota¹, Misao Mizuno¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

【序】 *Fulvamarina* rhodopsin (FR) は光駆動塩化物イオンポンプである。FR は発色団として *all-trans* レチナールをもち、その光異性化により開始するサイクル反応に伴ってイオン輸送が起こる。塩化物イオンポンプとしては、これまでにハロロドプシン (HR) がよく研究されている。HR で機能に重要と考えられているアミノ酸残基が FR では異なっている[1]。また、中間体の寿命も両者で違いがみられる。FR と HR を比較することは、タンパク質の塩化物イオン輸送メカニズムを明らかにするうえで重要である。本研究では、時間分解可視共鳴ラマン分光法を用いて、FR のサイクル反応の初期段階にみられる反応中間体の発色団構造を調べ、その特徴を HR と比較して議論した。

【実験】 大腸菌で発現させた FR を精製し、200 mM MOPS-NaOH (pH 8.0)、1 M NaCl、0.03% β -DDM に可溶化したものを試料として用いた。時間分解共鳴ラマン測定はフローセル中に氷冷した試料を流し、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。遅延時間は-200 ns から 50 μ s までの 13 点について測定した。

【結果と考察】 図 1 に、FR の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。図 1(a)は始状態の FR のスペクトルで、971、1164、1170、1200、1537、1629 cm^{-1} にバンドが観測された。図 1(b)は遅延時間 30 ns のスペクトルで、954、973、1194、1548、1619、1634 cm^{-1} に、図 1(c)の遅延時間 50 μ s のスペクトルでは 953、1186、1198、1550、1646 cm^{-1} にバンドが観測された。両者のスペクトルでは異なる波数にバンドが観測された。これは、反応開始後 50 μ s までの間に少なくとも 2 つの中間体が存在することを示している。

時間分解スペクトルにはレチナール発色団の構造を反映するマーカーバンドが観測された。1150-1250 cm^{-1} にみられるバンドは C-C 伸縮振動バンドで、これはレチナールのコンフィギュレーションを敏感に反映する。始状態で観測された 1164、1170 cm^{-1} のバンドの強度は、2 つの中間体のスペクトルでは減少し、代わりに \sim 1190 cm^{-1} のバンドが強くなった。これは、レチナールが *all-trans* 形から *13-cis* 形へ異性化した際にみられる特徴であり、2 つの中間体では発色団は *13-cis* 形をとっていることを示唆している。次に、波数が 650-1000 cm^{-1} のバンドは C-H 面外変角振動モード (HOOP モード) に帰属される。このバンドはレチナールのポリエーテル鎖が平面である場合は観測されないため、レチナールのポリエーテル鎖の歪みの程度を示すマーカーとなる。始状態では 971 cm^{-1} 、50 μ s では 953 cm^{-1} にバンドが観測されたのに対し、30 ns では 973、954 cm^{-1} などの弱いバンドが数本観測された。このことから、始

状態と 50 μs では歪みの箇所が異なり、30 ns ではその遷移の途中段階にあると考えられる。さらに、1610–1650 cm^{-1} にみられるのは C=N 伸縮振動モードの寄与を含むバンドである。C=N 伸縮振動は N-H 面内変角振動とカップルしている。重水中ではシッフ塩基のプロトンは重水素に置換されるため、同位体効果により N-D 変角振動は大きく低波数シフトする。このため、重水置換により C=N 伸縮振動バンドはデカップリングによる低波数シフトを起こす。また、N-H 変角振動はプロトン化シッフ塩基がつくる水素結合強度が強くなると振動数が高くなる。よって、重水素化による C=N 伸縮振動数のシフトの大きさはプロトン化シッフ塩基の水素結合強度のマーカーとなる。軽水中と重水中での時間分解スペクトルを比較すると、始状態、30 ns、50 μs での C=N 伸縮振動の波数シフトはそれぞれ 13、9、27 cm^{-1} であった。したがって、FR のプロトン化シッフ塩基の水素結合強度は光異性化から 30 ns でいったん弱くなり、50 μs で始状態よりも強くなることがわかった。

共鳴ラマンスペクトルにより明らかになった FR の発色団の特徴を HR のそれ[2]と比較した。まず、中間体が現れる時間領域とスペクトルの概形から、FR の光サイクル中の 30 ns、50 μs で観測された中間体はそれぞれ HR の K 中間体、L 中間体に対応すると考えられる。次に、重水素置換による C=N 伸縮振動バンドのシフトは、HR の始状態、K 中間体、L 中間体でそれぞれ 10、9、31 cm^{-1} と報告されている。したがって、FR、HR はともに、シッフ塩基の水素結合強度は K 中間体形成でいったん弱まり、L 中間体形成で始状態よりもさらに強くなるという共通の性質をもつことがわかった。一方で、HOOP バンドの強度は、HR の K 中間体に比べて FR の K 中間体の方が弱かった。このことは、FR の K 中間体のレチナールのポリエーテル鎖の歪みが、HR の K 中間体に比べて小さいことを示唆する。

【参考文献】

- [1] Inoue, K et al., *J. Phys. Chem. B*, **2014**, 118 (38), pp 11190–11199
 [2] 水野ら, 第 7 回分子科学討論会, **2013**, 3D19

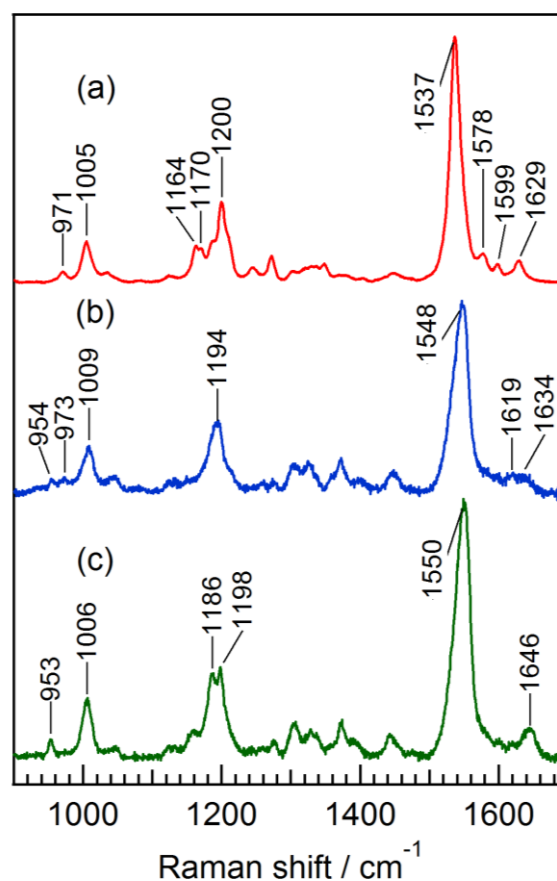


図 1. FR の時間分解共鳴ラマンスペクトル。(a) 未反応の FR。遅延時間が (b) 30 ns、(c) 50 μs の時間分解スペクトル。(b)、(c) については未反応の寄与を除いてある。