

タンパク質中で見られるチロシンの特異な水素結合状態の赤外分光解析

(名工大 院工*、JST さきがけ**)

○伊藤 奨太*、杉田 真也*、吉住 玲*、井上 圭一*、**、
岩田 達也*、岩城 雅代*、神取 秀樹*

FTIR study of specific hydrogen-bond of tyrosine in the protein

(Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Tech.,*, Prest, JST**)

○Shota Ito*, Shinya Sugita*, Rei Abe-Yoshizumi*, Keiichi Inoue*,**,
Tatsuya Iwata*, Masayo Iwaki*, Hideki Kandori*

【序】タンパク質中ではその機能発現のために、特異な水素結合構造を形成する場合がある。複雑分子系であるタンパク質内部の水素結合構造を検出することは容易ではないが、光やリガンドなどの刺激を与えた前後の差スペクトルを測定する赤外差スペクトル分光法は大きな可能性を持った手法である。これまでに我々は青色光受容タンパク質 BLUF の光反応中間体において、発色団 FAD 近傍の Tyr21 の O-H 伸縮振動が $2800\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ に観測されることを報告した¹。フェノール環の O-H 伸縮振動は水素結合を形成していないと 3600 cm^{-1} 付近に現れるが、水素結合を形成すると低波数シフトする。分子内水素結合を形成すると 3200 cm^{-1} 付近にまでシフトするが、文献にないほどの Tyr の O-H 伸縮振動の観測から、光活性化において強い水素結合の形成が BLUF の機能発現に関わると考察した¹。

今回、光駆動ナトリウムポンプである KR2 (*Krokinobacter Rhodopsin2*)² に対して全反射赤外分光 (ATR-FTIR) 法を用いて Na^+ 結合の際の差スペクトルを測定したところ、同様に $2800\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ の振動数領域にスペクトル変化を観測した。ATR-FTIR 法は溶液中での膜タンパク質の構造変化を捉えることができる一方、水分子の大きな赤外吸収も反映されるため、一般に X-H 伸縮振動領域の情報を得ることは困難である。しかし、試料を含めた測定条件を最適化することで水素結合供与基の構造情報を得ることが可能になった (図 1)。

【実験】大腸菌によって異種発現した KR2 は DDM による可溶化後、Co-NTA カラムを用いて精製した。その後、POPE:POPG=3:1 に調整した

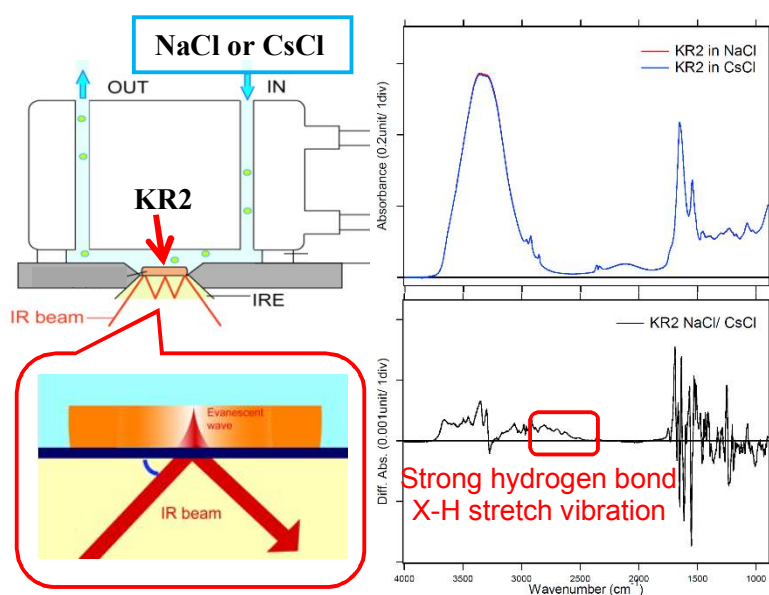


図 1. (左)ATR-FTIR 法の装置概念図
(右)溶液交換時の赤外吸収スペクトルとその差スペクトル

脂質を用いてモル比が 1 : 20 となるように KR2 を再構成した。KR2 を ATR-FTIR のシリコンプリズム上に自然吸着させ、100 mM NaCl/ CsCl, 20 mM Tris-H₃PO₄, pH8 の溶液を交換した際の赤外差スペクトルを測定した。また振動バンドの同定のため、同位体標識試料とアミノ酸部位特異的変異体を作製して同様の実験を行った。

【結果と考察】Na⁺結合に特徴的な 2800-2500 cm⁻¹の X-H 伸縮振動は ¹⁵N 標識試料では変化せず、¹³C や Tyr-D₄ 標識試料で低波数シフトしたことから Tyr の O-H 伸縮振動に由来することがわかった (図 2)。BLUF では光反応中に生成する過渡中間体においてのみ特異な Tyr の信号が観測されたが、KR2 の場合、光反応前の基底状態においてきわめて強い Tyr の水素結合が存在することになる。Na⁺は細胞外側表面に結合するが²、この領域に含まれる Tyr25 や Asp102 の変異体で振動バンドが消失したことから (図 2)、2800-2500 cm⁻¹に現れた信号は Tyr25 の O-H 伸縮振動がフェルミ共鳴により複数のピークを示したものと結論した。最近、報告された結晶構造によれば、Tyr25 は Na⁺近傍で負電荷を持った Asp102 と近接している (図 3)³。Tyr25 と Asp102 の酸素間距離は 2.40 Å であり、今回、測定した Tyr25 の水素結合強度とよく対応する。さらに D102E 変異体で Na⁺結合に伴う赤外吸収バンドが消失したが、この実験事実から、Na⁺結合のためには 102 位の負電荷だけでなく、Tyr25 との間での強い水素結合を形成することの重要性が示唆された。

これまで適当な観測手段がないことから、光駆動ナトリウムポンプの過程でいつ Na⁺の放出が起こるのか不明であった。この点、Tyr25 の O-H 伸縮振動は他の振動から離れた領域に現れる振動バンドであるため、ポンプ過程における Na⁺の結合・解離に関する情報が得られる可能性がある。講演では、光誘起差スペクトル法を用いて測定したナトリウムポンプの過程における水素結合状態の変化も含め、Tyr がタンパク質中で取りうる特異な水素結合状態とタンパク質機能との関わりについて議論したい。

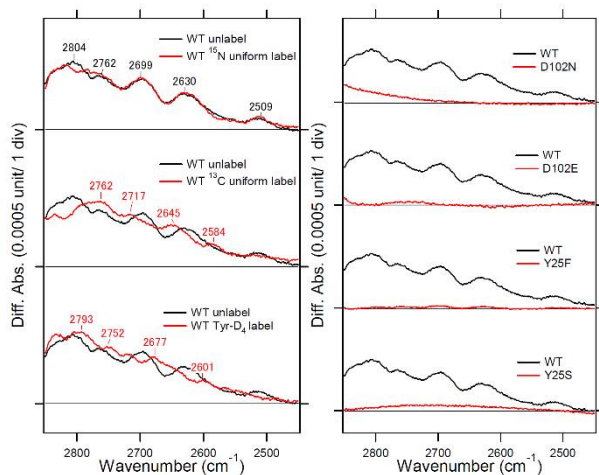


図 2. KR2 の NaCl/ CsCl に伴う赤外差スペクトル

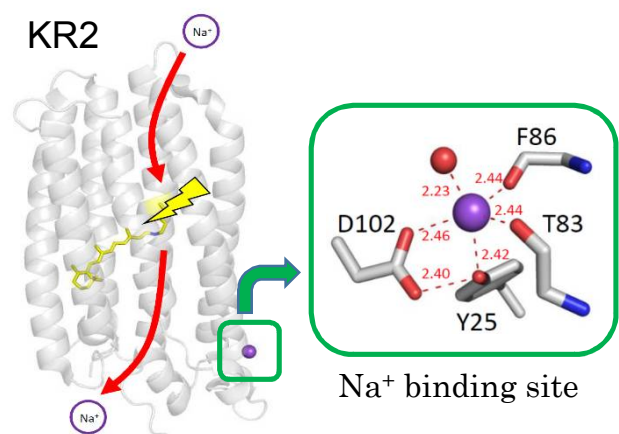


図 3. KR2 の結晶構造図

【参考文献】

- (1) Iwata et al., *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 1015-1019 (2011).
- (2) Inoue et al., *Nat. Commun.* **4**, 1678 (2013).
- (3) Gushchin et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 390-395 (2015).