

4C09

グロイオバクターロドプシンのプロトンポンプ機能を促進する 発色団構造変化

(¹ 阪大院理・² 名工大院工)

中嶋 亜侑美¹・○水野 操¹・神取 秀樹²・水谷 泰久¹

Structural changes in retinal chromophore of *Gloeobacter* rhodopsin
facilitating the proton pump function

(¹Osaka University, ²Nagoya Institute of Technology)

Ayumi Nakajima¹, Misao Mizuno¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

はじめに プロトンポンプは外部刺激に応答した構造変化により、細胞膜を隔ててプロトンを一方向のみに能動輸送するタンパク質である。その詳細な構造変化のメカニズムは、代表的な微生物型プロトンポンプのバクテリオロドプシン (BR) でさえ、いまだ完全には理解されていない。

グロイオバクターロドプシン (GR) は、真正細菌シアノバクテリア由来のプロトンポンプである。GR は、大腸菌系をもちいた大量発現が可能であり、プロトン輸送メカニズムを研究するうえで有利である。レチナール発色団 (図 1) の全トランス体から 13 シス体への光異性化反応がタンパク質構造変化の引き金であること、発色団のプロトン化シッフ塩基がプロトン輸送経路に含まれている可能性が高いことから、ポンプ機構の理解には各中間体における発色団構造を明らかにすることがきわめて重要である。本研究では、時間分解共鳴ラマン分光法をもちいて、レチナール発色団の構造変化をナノ秒からミリ秒の時間領域にわたり観測し、GR のポンプ機構におけるプロトン輸送モデルを新たに提案した。

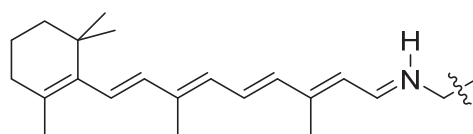


図1. レチナール発色団の構造.

実験 GR は、大腸菌中で発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。界面活性剤をもちい、バッファー (pH 9.0) に可溶化した試料をフローセル中に循環させて、時間分解共鳴ラマン測定を行った。ラマン散乱測定のプローブ光には、波長 475 および 400 nm (パルス幅 40 ns) の光をもちいた。光反応を開始するポンプ光には、波長 532 nm の光を使用した。反応初期の時間分解計測には、パルス幅 25 ns の光パルスをもちいたポンプ・プローブ測定 (時間分解能 50 ns) を行った。遅い時間領域では、cw 光で連続的に試料をポンプし、プローブ光との照射位置間隔で遅延時間を設定するデュアルビームフロー法 (時間分解能 100 μ s) をもちいて時間分解スペクトルを観測した。

結果と考察 図 2a に波長 475 nm のプローブ光で測定した GR の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。プローブ光のみで測定した一番上のスペクトルは、未反応状態のレチナール発色団の共鳴ラマンスペクトルである。レチナール発色団の構造を反映するマーカーバンドである C-C、C=C および C=N 伸縮振動バンドが、それぞれ 1199、1532 および 1641 cm^{-1} に観測された。その他のスペクトルは、各遅延時間において未反応状態のスペクトルの寄与を差し引いた光反応中間体の時間分解スペクトルである。ポンプ光照射直後には、1192、1538 および 1623 cm^{-1} に各マーカーバンドが現れた。300 ns のスペクトルには、これらに加えて 1184、1549 および 1652 cm^{-1} にバンドが観測され、10 μ s にかけてこれらの強度が増加した。バンド

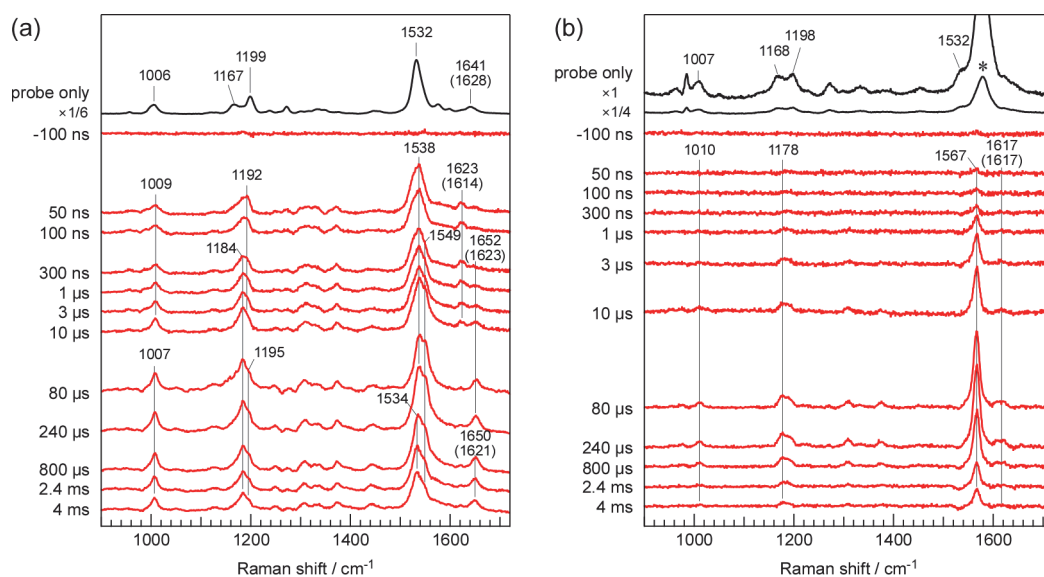


図2. GRの時間分解共鳴ラマンスペクトル. プロブ光波長 (a) 475 nm, (b) 400 nm. カッコ内数字は重水中のC=N伸縮振動数. *は400 nm付近に吸収をもつ種に由来するバンド.

の強度比が変化することから、この時間領域において二つの中間体のバンドが観測されることがわかった。過去の時間分解吸収観測の報告[1]により、後から出現したバンドはL中間体に起因すると考えられる。ミリ秒領域のスペクトルには、さらに1534および1650 cm^{-1} にN中間体に由来すると考えられるバンドが観測された。波長400 nmのプロブ光で測定した時間分解スペクトル(図2b)には、短波長領域に吸収ピークをもつM中間体に由来するバンドが観測された。プロトン化シッフ塩基をもつレチナル発色団の1610–1660 cm^{-1} に現れるC=N伸縮振動は、N-H変角振動と強くカップルしたモードである。このため、その振動数はシッフ塩基における水素結合強度に敏感である。水素結合が強いと、その振動数は高く、また重水素置換による波数シフトが大きいことが知られている[2]。L中間体のスペクトルでは、高い振動数かつ重水素置換による大きな波数シフトを示すC=N伸縮振動バンドが観測された。したがって、L中間体において発色団のシッフ塩基では強い水素結合が形成されていることがわかった。これは、プロトン化シッフ塩基とそのカウンターイオンの距離が近づくことに起因すると考えられる。また、M中間体のスペクトルにおいて、1617 cm^{-1} と振動数が低く、また重水素置換による波数シフトを示さなかった。これは、L中間体からM中間体への遷移において発色団が脱プロトン化することを示している。また、M中間体のバンドの出現・消滅の時間挙動は、L中間体と同様であった。これより、L中間体とM中間体との間で互いに速い遷移が起こり、すばやく平衡に達することが考えられる。このようなGRの中間体生成の時間挙動は、逐次的にL中間体とM中間体が生成するBRの光反応[3]とは異なる。GRでは、M中間体生成において、発色団がプロトンアクセプターであるアミノ酸残基と水素結合ネットワークを介して相互作用を強めると考えられる。

本研究の結果から、GRのプロトン輸送過程において、発色団の脱プロトン化の前駆過程で、シッフ塩基とカウンターイオンの距離が近づき、プロトン移動のエネルギー障壁が低くなることが示唆された。この過程により発色団からのプロトン移動が促進されると考えられる。

参考文献 [1] Miranda, et al., *Biophys. J.* **96**, 1471 (2009). [2] Baasov, et al., *Biochemistry* **26**, 3210 (1987). [3] Diller and Stockburger, *Biochemistry* **27**, 7641 (1988).