

1F03

ハロロドプシン光反応中間体のレチナル発色団に対する水分子の役割 (阪大院理¹・名工大院工²)

○水野 操¹・神取 秀樹²・水谷 泰久¹

Role of a water molecule to a retinal chromophore of harorhodopsin photointermediate

(Osaka University¹, Nagoya Institute of Technology²)

Misao Mizuno¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

はじめに 微生物型ロドプシンの代表的な機能のひとつは光駆動イオンポンプである。その一種であるハロロドプシンは、細胞膜の内側から外側へ塩化物イオンを輸送する。イオンの輸送経路には、レチナル発色団がタンパク質と形成するプロトン化シッフ塩基が存在する (図1)。シッフ塩基の周辺領域がイオン輸送経路に含まれていることから、ポン

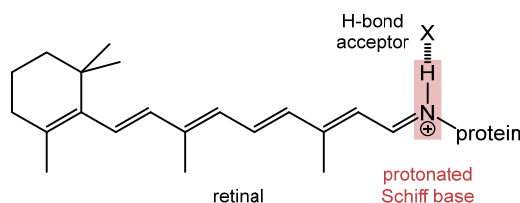


図1. レチナル発色団の構造。

プ機構の理解には発色団に起きる段階的な構造変化の解明がきわめて重要である。わたしたちは、古細菌 *Natorobacterium pharaonis* 由来ハロロドプシン (*pHR*) のイオン輸送機構を明らかにするために、時間分解可視共鳴ラマン分光法をもちいてレチナル発色団の構造の時間発展をナノ秒からミリ秒の幅広い時間スケールで調べている。本研究では、レチナル発色団のシッフ塩基の水素結合に対する構造マーカーバンドであるC=N伸縮振動の共鳴ラマンバンドの振動数およびバンド幅から、シッフ塩基の水素結合強度および水素結合のアクセプターを同定し、イオン輸送の鍵となるタンパク質の構造変化を明らかにした。

実験 *pHR* 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、軽水および重水バッファー (pH 7.0 および pD 7.0) に可溶化した。測定では、試料をフローセル中で循環させた。ラマン散乱測定のプロブ光には、波長 475 nm (パルス幅 40 ns) の光をもちいた。反応初期の時間領域では、波長 532 nm (パルス幅 25 ns) のポンプ光パルスをもちいたポンプ・プロブ測定 (時間分解能 50 ns) を行った。遅い時間領域では、波長 561 nm の cw 光で連続的に試料をポンプし、プロ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) により時間分解計測を行った。

結果と考察 時間分解共鳴ラマンスペクトルには、3つの反応中間体 (K、L および N) の寄与が観測された。特異値分解解析によりこれら中間体のスペクトルを得た。図2に未反応状態および反応中間体の共鳴ラマンスペクトルを 1580 cm^{-1} から 1700 cm^{-1} まで拡大して示す。軽水中でのC=N伸縮振動バンドは、未反応状態では 1634 cm^{-1} に観測され、K 中間体では 1621 cm^{-1} に低波数シフトし、L 中間

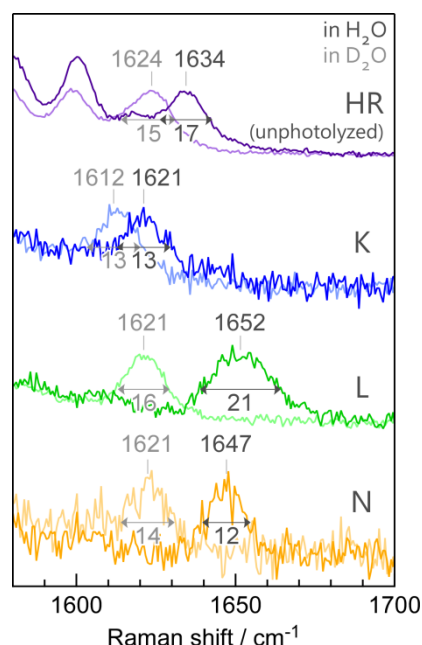


図2. *pHR*の未反応状態およびK、L、N中間体のC=N伸縮振動領域の共鳴ラマンスペクトル。バンド幅はローレンツ関数によるフィッティングにより決定した。

体では 1650 cm^{-1} に高波数シフトし、その後 N 中間体では 1647 cm^{-1} へ若干シフトした。重水中では、すべての状態において C=N 伸縮振動バンドが軽水中よりも低波数シフトを示した。そのシフトの大きさは、未反応状態および K 中間体では 10 cm^{-1} 程度と小さく、L および N 中間体ではそれぞれ 31 および 25 cm^{-1} と大きかった。また、L 中間体のみ軽水中でバンド幅の増加が観測された。

レチナール発色団のプロトン化シッフ塩基において、C=N 伸縮振動モードは N-H 変角振動モードとエネルギーが近接し強くカップルしている。そのため、スペクトルに観測されるバンドの振動数は、純粋な C=N 伸縮振動数よりも高くなる。重水中では、シッフ塩基のプロトンは重水素イオンに完全に置換される。この結果、N-D 伸縮モードの振動数は低下し、C=N 伸縮振動モードとのカップリングが解消する。これにより、重水中で観測される C=N 伸縮振動バンドは軽水中と比べ低波数側へシフトする。このシフトの大きさは、シッフ塩基の水素結合強度に依存する。すなわち、水素結合強度が強いと、N-H 変角振動数は高くなるため、スペクトルに観測される C=N 伸縮振動バンドは高波数側に現れ、また重水素化による低波数シフトは大きくなる[1]。本研究で観測されたスペクトル変化から、プロトン化シッフ塩基における水素結合強度は、未反応状態に比べ K 中間体で弱くなり、L 中間体の生成にともなって強くなるのがわかった。N 中間体でも、L 中間体ほどではないが強い水素結合が形成されていることがわかった。

次に C=N 伸縮振動のバンド幅について議論する。未反応状態のバクテリオロドプシン(BR)の共鳴ラマンスペクトルでは、重水中に比べ軽水中で C=N 伸縮振動バンド幅の増加がみられている[2]。BR はプロトン化シッフ塩基のすぐ近傍に水分子が存在する。軽水の HOH 変角振動数はおよそ 1640 cm^{-1} である。この振動数は、 1630 から 1650 cm^{-1} に観測されるプロトン化シッフ塩基の C=N 伸縮振動数と非常に接近している。したがって、プロトン化シッフ塩基と水分子が直接相互作用できるような近距離にある場合、C=N 伸縮振動モードと HOH 変角振動モード間で共鳴振動エネルギー移動が起こる。このとき、C=N 伸縮振動の位相緩和時間が短くなりバンド幅が増加すると考えられる。一方、重水では DOD 変角振動数は約 1200 cm^{-1} へ低下するため、共鳴振動エネルギー移動は起こらない。*pHR* では L 中間体において、C=N 伸縮振動バンドに軽水中でバンド幅の増加が観測された。これは、発色団のプロトン化シッフ塩基の水素結合のアクセプターが水分子に交換したことを強く示唆する。一方、N 中間体では強い水素結合を形成しているにもかかわらず、軽水中のバンド幅が重水中と変わらなかったことから、L→N の過程で水素結合のアクセプターが水分子から別の化学種に交換したことがわかる。

低温 FTIR の研究結果[3]から、 170 K で観測される L 中間体の生成とともに、プロトン化シッフ塩基の水素結合アクセプターが塩化物イオンから水分子へ置き換わると提案されている。その結果、塩化物イオン周辺の極性が低下し、シッフ塩基近傍における塩化物イオンの移動が起きると考えられている。本研究により得られた結果はこの考えを支持する。また、これまで明らかでなかった N 中間体の発色団構造を明らかにし、水分子との水素結合は L 中間体のみで見られることを示した。

本研究では、*pHR* のレチナール発色団の構造の時間発展を観測した結果、イオン輸送の鍵となる過程におけるプロトン化シッフ塩基と水分子との水素結合形成を直接結論づけた。

参考文献 [1] Baasov, et al., *Biochemistry* **26**, 3210 (1987). [2] Hildebrandt and Stockburger, *Biochemistry* **23**, 5539 (1984). [3] Shibata, et al., *Biochemistry* **44**, 12279 (2005).