

1F04

光駆動塩化物イオンポンプとそのプロトンポンプへ機能転換した 変異体の光反応における発色団構造の違い

(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

Differences of the photointermediate chromophore structures between
a light-driven chloride ion pump and its functionally converted proton pump analog
(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輸送タンパク質である。FR は全トランス形レチナールを発色団としてもち、その光異性化がイオン輸送のトリガーとなる。最近、FR のアミノ酸残基のうち3つを置換した変異体 (N110D、Q121E、S255F) がプロトン輸送活性を示すことが報告された[1]。野生型と変異体はほとんど同じ配列を持ちつつ機能だけが異なることから、輸送するイオンを決定する要所のみ違いがあると考えられる。その候補のひとつである発色団構造を比較することで塩化物イオン輸送とプロトン輸送の機能発現の仕組みが明らかになると期待できる。そこで我々は、これらのタンパク質の始状態、反応初期中間体における発色団構造を時間分解共鳴ラマン分光法によって調べ、両者の特徴を比較した。

【実験】大腸菌で発現させた FR の野生型と変異体を精製し、界面活性剤を含むバッファー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、ナノ秒パルスを用いたポンププローブ法 (ポンプ光 532 nm、プローブ光 475 nm) により行った。中間体のスペクトルの測定は、野生型では遅延時間 50 μs において、変異体では 1 μs において行った。

【結果】図 1A に軽水中と重水中での野生型の時間分解共鳴ラマンスペクトル (1600 – 1660 cm^{-1} の領域) を示す。青・緑のカーブは軽水中のスペクトル、紫・黄緑のカーブは重水中のスペクトルを表す。この領域には発色団に含まれるプロトン化シッフ塩基 (PSB) の C=N 伸縮振動バンドが観測された。軽水中の野生型のスペクトルにおいて、始状態では 1629 cm^{-1} に、中間体では 1645 cm^{-1} にバンドが観測された。これらのバンドは重水中ではそれぞれ 13 cm^{-1} 、26 cm^{-1} の低波数シフトを示した。また、バンドの幅について解析したところ、始状態、中間体ともに軽水中 – 重水中間で有意な差はなかった。次に変異体の共鳴ラマンスペクトルを図 1B に示す。変異体の C=N 伸縮振動バンドは、始状態では

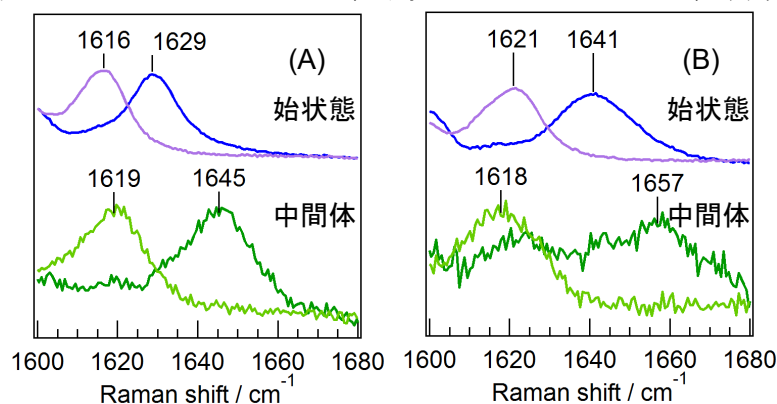


図 1. FR の野生型 (A) と変異体 (B) の共鳴ラマンスペクトル。カーブはそれぞれ軽水中の始状態 (青)、重水中の始状態 (紫)、軽水中の中間体 (緑)、重水中の中間体 (黄緑)。中間体のスペクトルは、野生型では 50 μs 、変異体では 1 μs の時間分解スペクトルである。

1641 cm^{-1} 、中間体では 1657 cm^{-1} にみられた。重水中でのバンドはそれぞれ 19 cm^{-1} 、39 cm^{-1} の低波数シフトを示した。野生型とは異なり、変異体では始状態におけるバンド幅が重水中よりも軽水中の方が広がった。一方、中間体ではほとんどバンド幅に違いはみられなかった。

【考察】はじめに始状態における野生型と変異体の PSB について議論する。PSB の C=N 伸縮振動バンドの重水中における低波数シフトの大きさは、PSB がつくる水素結合強度に依存することが知られている[2]。始状態ではこのシフトの大きさは、野生型の 13 cm^{-1} と比較して変異体では 19 cm^{-1} と大きかった。このことは、変異体の PSB が、野生型よりも強い水素結合を形成していることを示唆する。また、重水中と比べたときの軽水中での C=N 伸縮振動バンド幅の広がり、PSB が水分子と水素結合を形成していることを示すマーカーである[3]。野生型では軽水中と重水中の C=N 伸縮振動バンドの幅に違いはみられなかったが、変異体では軽水中の方が幅広がった。このことは、始状態において、野生型では PSB と水素結合している水分子が存在しないのに対し、変異体では PSB と水素結合する水分子が存在することを示唆する。

次に、光反応後数マイクロ秒で生成する中間体の PSB について議論する。この中間体は、過渡吸収の結果から、光駆動イオン輸送タンパク質のイオン輸送過程で一般的にみられる L 中間体に帰属できる。今回観測された L 中間体の C=N 伸縮振動バンドでは、重水中での低波数シフトの大きさは、野生型では 26 cm^{-1} 、変異体では 39 cm^{-1} であった。この結果は、PSB の形成する水素結合は L 中間体においても野生型より変異体の方が強いことを示唆する。一方でそれぞれの始状態と比較すると、野生型、変異体ともに L 中間体の方がシフトの大きさが大きかった。これは、野生型と変異体の両方で、始状態よりも L 中間体の方が強い水素結合を形成していることを示唆する。また、C=N 伸縮振動バンド幅の軽水中－重水中間の違いが野生型、変異体ともにみられなかったことから、L 中間体における PSB は水分子との水素結合を形成していないと考えられる。

以上の議論から、野生型の PSB は弱い水素結合を水以外の化学種（先行研究では塩化物イオンが示唆されている[4]）と形成しているのに対し、変異体の PSB は水分子と強い水素結合を形成していると考えられる。バクテリオロドプシンの PSB は、始状態で強い水素結合を形成しており[3]、水分子と相互作用していることが報告されている[5]。この特徴は FR の変異体にも観測された。共通した特徴が見られることは、水分子と強い水素結合を形成することがプロトンの輸送を実現する必要条件であることを示唆する。また、野生型、変異体の L 中間体において PSB の水素結合アクセプターが水分子ではないことが示唆された。この結果は、別の塩化物イオン輸送タンパク質であるハロロドプシンの L 中間体で PSB が水分子と水素結合しているという結果と異なっている[6]。この水素結合の違いとイオン輸送タンパク質の機能転換の可能性について議論する。

【参考文献】

[1] K. Inoue et al., *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 9883. [2] T. Baasov et al., *Biochemistry* **1987**, 26, 3210. [3] P. Hilderbrandt and M. Stockburger, *Biochemistry* **1984**, 23, 5539. [4] K. Inoue et al., *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 11190. [5] H. Luecke et al., *J. Mol. Biol.* **1999**, 291, 899. [6] 水野ら, 第 10 回分子科学討論会 **2016**, 1F03

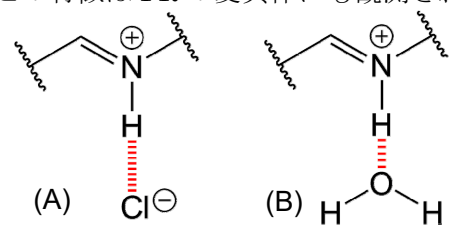


図 2. FR 野生型 (A) と変異体 (B) の始状態における PSB の水素結合構造モデル。図の向かって右側にタンパク質が結合している。向かって左側へレチナールのポリエーテル鎖が延びている。