

光駆動プロトンポンプBRにおける伸縮振動とその倍音成分の振動解析

¹名工大院工, ²University of Valencia

○伊藤 奨太¹, Víctor A. Lórenz-Fonfría², 神取 秀樹¹

Vibrational analysis of stretching vibration and its overtone signals in light-driven proton pumping rhodopsin BR

○Shota Ito¹, Víctor A. Lórenz-Fonfría², Hideki Kandori¹

¹ Department of Life and Materials Engineering, Nagoya Institute of Technology, Japan

² The institute of Molecular Science, University of Valencia, Spain

【Abstract】

Bacteriorhodopsin (BR) is a light-driven proton pumping membrane protein. For its proton pumping, light energy first converted to the retinal isomerization, followed by pKa changes of amino acids and protein structural changes. The sensitivity of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to molecular vibration allows to monitor such changes.

In this study, we investigated the first overtone of retinal C-C stretching vibration and C-H out-of plane bending vibration in BR as a model system of biomolecules and they were compared with their fundamental vibrations. Experimental anharmonicities for C-C stretching vibration and C-H out-of plane bending vibration were estimated to $\sim 1.5 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$, respectively. Based on our FTIR difference spectra, anharmonicity of retinal vibrational modes in protein and in solvent will be discussed.

【序】光駆動外向きプロトンポンプの一種であるバクテリオロドプシン(BR)は、発色団レチナールの光異性を初期反応として、カルボン酸を経由した一方向のプロトン移動を実現している(Fig.1)。BRにおけるレチナールの化学構造は同位体試料を用いた赤外分光法やラマン分光法により明らかにされ、all-trans型からK中間体への13-cis型への光異性をトリガーとして、M中間体でのシッフ塩基の脱プロトン化、N中間体での再プロトン化を経由して、最終的にO中間体でall-trans型に熱異性化する光サイクルが知られている。これらレチナールの化学構造の変化とタンパク質内に存在するカルボン酸のpKaが精密に制御されることにより、一方向性のプロトン輸送が実現される[1]。このようにBRは、光反応サイクルとその機能メカニズムの理解が最も進んでいる膜タンパク質であり、またその熱安定性や光反応性の高さから新規測定手法を行う上での生体系のモデルタンパク質として良く知られている。

今回、我々はBRの光反応性の高さを利用して、光反応中におけるレチナール

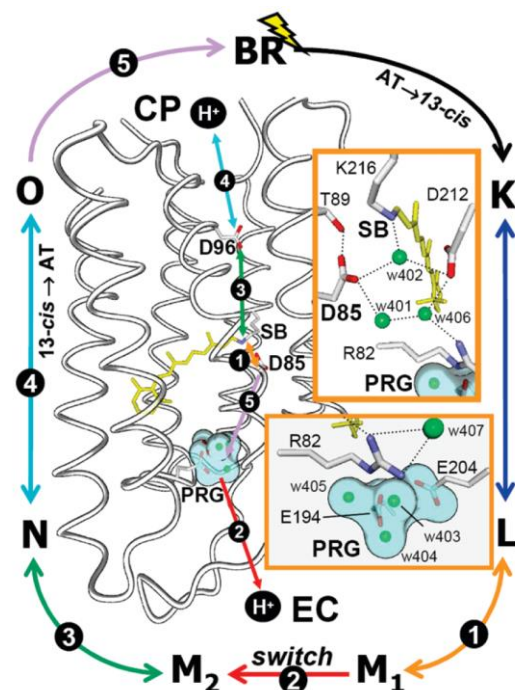


Fig.1 Schematic representation of the BR photocycle (Lórenz-Fonfría et al., 2009 *J. Am. Chem. Soc.*)

分子の振動モードの非調和性の解析を試みた。赤外分光法によって、レチナール分子の C-C 伸縮振動、C-H 面外偏角振動とその倍音成分を測定し、その振動数と強度を比較した。

【方法】 *Halobacterium. Salinarum.* より単離・精製した BR を含む紫膜を 2 mM NaCl, 3 mM MES-NaOH pH6.5 に懸濁し、赤外分光法用の乾燥フィルムを作成した。20% グリセロール水を 2 μ L 用いて BR を水和させた後、>500 nm の光で BR を明順応させた。その後、各光反応中間体の蓄積する測定温度(77, 190K, 230 K)まで冷却し、光照射により各光反応中間体を形成させた。光照射後と光照射前の赤外スペクトルを MCT デテクターを用いて測定し、両者を引き算することにより、各中間体と暗状態との光反応差スペクトルを解析した。

【結果・考察】 BR の暗状態と K 中間体との光反応差スペクトルを Fig.2 に示す。レチナールの C-C 伸縮振動と C-H 面外偏角振動はそれぞれ、1250-1150 cm^{-1} と 1000-900 cm^{-1} に表れることが知られており、1203 cm^{-1} は C14-15 伸縮振動、1194 cm^{-1} は C10-11 と C14-15 伸縮振動、957 cm^{-1} は C15-H 面外偏角振動に由来される [2]。それらの倍音領域にあたる 2500-1800 cm^{-1} 領域を拡大すると、基音の振動モードと同様のスペクトル形状をした信号モードが検出されたために、これらの信号にレチナール分子の振動モードの倍音成分が含まれていると考えられた(Fig.2: 黒線)。次に赤外光の干渉や MCT デテクターの非線形性などの赤外分光器に由来するアーティファクトを除去するために、1700 cm^{-1} 以下の赤外光をカットするサファイヤフィルターを用いた測定を行った(Fig.2: 赤線)。この条件で観測された 2404/2386 cm^{-1} や 1906 cm^{-1} のバンドは、C10-11, C14-15 伸縮振動と C15-H 面外偏角振動の倍音成分と考えられ、それぞれ $\sim 1.5 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$ の非調和性を受けていることが分かった。また 2149 cm^{-1} は 1194 cm^{-1} と 957 cm^{-1} の結合音成分と考えられ、 $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$ の非調和性を受けていることが観測された。またそれぞれの信号の強度は基音より ~ 170 倍小さくなっていった。これらの振動数変化(非調和性)は X-H 伸縮振動 ($\sim 80 \text{ cm}^{-1}$) や N-O 伸縮振動 ($\sim 10 \text{ cm}^{-1}$) よりも小さく、レチナールの C-C 伸縮振動、C-H 面外偏角振動の特徴だと思われる [3]。本発表では、BR に含まれるレチナールの振動モードとその倍音成分、また溶液中のレチナールとの振動モードとの比較を行い、生体分子の振動構造とその非調和性について議論したい。

【参考文献】

- [1] Lórenz-Fonfría, V. A. et al., (2009) *J. Am. Chem. Soc*
- [2] Smith, S. O. et al., (1985) *J. Membr. Biol.*
- [3] Struve, W. S. (1989) *Fundamentals of molecular spectroscopy, John Wiley & Sons, Inc.,*

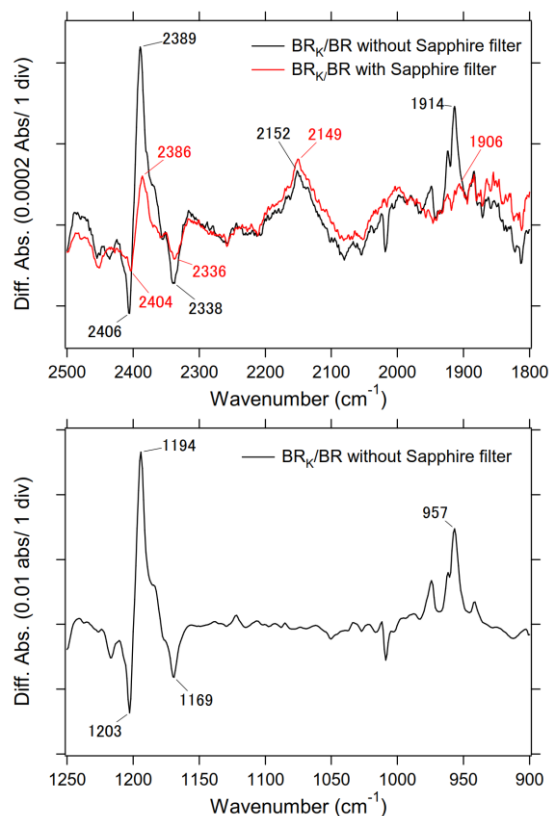


Fig.2 FTIR difference spectra of BR_K/BR in 2500-1800 and 1250- 900 cm^{-1} region.