

4B16

蛋白内プロトン化レチナールシッフ塩基の微弱蛍光

(東工大 生命理工) 大谷弘之

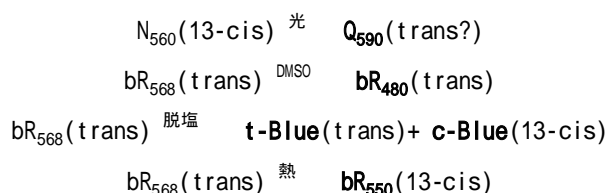
【序】バクテリオロドプシン(bR_{568} , 数字は吸収極大/nm)は高度好塩菌 *H. Salinarum* の体表に合成されるレチナール蛋白であり、光によって駆動される水素イオンポンプ活性を持つ。その初期過程は蛋白のアミノ基と共有結合した発色団(プロトン化レチナールシッフ塩基)の励起状態における全トランス 13-シス異性化反応である。この反応は量子収率も高く(0.64)、極めて速い(0.5 ps)ばかりでなく、 $C_{13}=C_{14}$ だけが異性化するという高い選択性が注目される(他の3カ所、すなわち $C_7=C_8$, $C_9=C_{10}$, $C_{11}=C_{12}$ の異性化は皆無)。一方、溶液中のプロトン化レチナールシッフ塩基の異性化は $C_9=C_{10}$, $C_{11}=C_{12}$ など共役系の中央でおき、反応量子収率の総和でも0.3未満である。副反応を全く抑えてしまう蛋白の制御機構を探る目的で、今回は bR_{568} ならびに複数のプロトン化レチナールシッフ塩基をもつ蛋白の蛍光測定を行い、励起状態の緩和過程を比較した。

【実験】蛍光励起光源には連続発振 He-Ne および Ar-Kr イオンレーザー(それぞれ 633, 614, 606, 596 nm および 568, 488, 476 nm)、さらには Q-sw. Nd:YAG レーザーの第2高調波(532 nm, 10 Hz)を magic angle で用いた。蛍光スペクトルの測定には CCD カメラを検出器とするマルチチャンネル測光システム(浜松ホトニクス PMA C7473 ならびに C5966)を用いた。

微弱蛍光測定において溶媒のラマン散乱や光源のプラズマ発光と思われる背景光を差し引くために、試料の蛋白、脂質部分と同じ散乱を示す標準物質として NH_2OH で脱色した紫膜を採用した。蛍光量子収率は適当な既知標準物質(cresil violet, 青膜、亜鉛 phthalocyanine)を同じ幾何学配置で測定することによって得た。

試料は、*H. Salinarum* の ET1001 株の細胞膜から精製して得た紫膜の懸濁液である。 bR_{568} の蛍光測定では、蛍光性中間体の最も蓄積の少ない pH8.0 の試料を十分に明順応(13-シス成分の除去)させた後、 $<50 \mu W$ の低強度励起を行った。他の全トランス型の試料には、紫膜を脱塩(または pH<2)して得た青膜の主成分 t-Blue (bR_{617})、紫膜にリン酸イオン存在下で DMSO を添加して変性させた bR_{480} 、 bR_{568} の光化学サイクルにおける最後の中間体 O_{627} 、および最後から2番目の中間体 N_{560} の光生成物である Q_{590} を用いた。13-シス型の試料には、紫膜を暗所に放置することによって生じる bR_{550} 、 bR_{568} の光化学サイクルにおける中間体 K_{600} と N_{560} 、および青膜中の13-シス成分である c-Blue を用いた。以下にスキームをまとめる(太字は測定した試料)。





【結果と考察】今回は全て bR_{568} と同じくプロトン化レチナールシッフ塩基を発色団としてもつレチナール蛋白について報告する。古細菌由来のレチナール蛋白内では全トランス型レチナールをアミノ酸残基とシッフ塩基結合させるとプロトン化($C=NH^+$)するのが一般的である。溶液中(MeOH)のプロトン化レチナールシッフ塩基については、シス/トランスであまり寿命が変わらない(3 ps 程度、蛍光収率 2×10^{-4})ことが知られており、結果をこれとも比較する。

(1) 全トランス型発色団をもつレチナール蛋白

bR_{568} 以外の全トランス型の蛍光量子収率は、概して、 10^{-3} 程度(寿命 10 ps 程度)であった。 Q_{627} や bR_{614} では蛍光量子収率 1×10^{-3} (寿命 9 ps)、 bR_{480} では蛍光量子収率 0.9×10^{-3} (寿命 3.5 ps)、bR 類似レチナール蛋白のハロロドプシンや ppR では蛍光量子収率 $(0.8\text{-}0.9) \times 10^{-3}$ (寿命 3-5 ps) であり、蛋白内では遊離の場合に比べて一般的に蛍光性になることがわかった。特に高量子収率 6×10^{-3} (長寿命 62 ps) を示すものとして Q_{590} 中間体がある。興味の対象である bR_{568} ではレチナールは蛋白内で特に無蛍光性 ($< 5 \times 10^{-5}$, 短寿命 0.5 ps) になっており、振動分光の結果を比べてみると PSB の対イオンとして解離型のカルボキシル基を有するアスパラギン酸(Asp85)が存在する。一方、 Q_{627} や bR_{614} では Asp85 のカルボキシル基が非解離型となっており、電子状態の緩和や反応を制御する鍵がここにあると蛍光測定からも結論できる。

スペクトルに関しては、 bR_{568} 以外のトランス型蛋白は通常の色素の蛍光のように 0-0 バンドが最も強いが、 bR_{568} ではむしろ 0-1 バンドが強くなっており、見かけ上 Stokes シフトが大きく見え、蛍光量子収率が低いことと共にむしろシス体を思わせる。

2) 13-シス型発色団をもつレチナール蛋白

シス体はトランス体に比べ蛍光量子収率が低いことは光化学の世界では常識である。そこで典型的な 13-シス体の蛍光を測定した。その結果、シス体は先に紹介した多くのトランス体と比べて、蛍光量子収率が低いことがわかった。 bR_{550} では 0.8×10^{-4} (0.6 ps)、 N_{560} では 2.4×10^{-4} (1.8 ps)、青膜中のシス体では 4.5×10^{-4} (< 4 ps) であった。しかしながら、 bR_{568} はトランス体でありながらどのシス体とくらべても無蛍光性の度合いが強かった。