1PB017

バクテリオロドプシンのタンパク内部水分子の
ダイナミクス；低温FTIR分光法による研究
○前田章夫, F. L. Tomson, R. B. Gennis,
T. G. Ebrey, S. P. Balashov (Univ. of Illinois)

バクテリオロドプシンの光により駆動されるプロトンポンプは、そのレチナルがオールドランス型であるバクテリオロドプシン (BR) に吸収された後、マイクロ秒の時間帯の間、LからMに移るときに、正の電荷のレチナルプロトン化シッフ塩基 (PSB) から、負の電荷の Asp85 へのプロトン移動によって誘導される。この電荷対は BR では、水分子 (Wat-85) を仲介した相互作用をしているが、光によるレチナルの異性化により、L では歪んだ構造で相互作用している。L を 80K で光照射すると、L' という部分的に BR の状態になる。FTIR 法を使って L' と BR の構造の違いを調べ、L の特異な構造の解明をめざした。BR では PSB とは直接水素結合では繋がっていない Asp96-Thr46 のそばにある水分子 (Wat-46) は他の場所にあった水分子とともに、L の生成にともなって同じ水素結合のクラスターを形成して PSB の近くにきたことを示す結果がえられた。L では PSB と Asp85 は、他の場所から動員された Wat-46 を含む水分子によって作られていると考えられる。内部水分子は、機能発現に関与する movable mediator である。

(1) Maeda et al. (1999) Biochemistry in press.

A. Maeda, F. L. Tomson, R. B. Gennis, T. G. Ebrey, S. P. Balashov: Dynamics of Internal water molecules of bacteriorhodopsin; a low temperature FTIR study.

1PB019

バクテリオロドプシンのプロトン放出経路における
構造と機能の相関
○河南るり子、辻暁、内藤晶、Richard Needleman
¹, Janos K. Lanyi², 齊藤肇 (姫路工大・理、¹ウェイ
ン州立大、²カリフォルニア大)

バクテリオロドプシンは光プロトンポンプ活性を持つ膜蛋白質である。本研究ではこれまでに固体高分解能NMRを用いた解析により、バクテリオロドプシン内部に位置するAsp85の荷電状態の変化が、遠隔的にタンパク質表面の高次構造変化を誘起することを示してきた。ここでは、プロトン放出に関与する残基の状態を部位特異的変異導入により変化させ、シッフ塩基周辺を中心とするタンパク質内部の立体構造への影響を解析した。NMR緩和試験の利用によりタンパク質中心の構造を選択的に観測すると、プロトン放出経路のArg82のGlnへの変異 (R82Q) により、膜貫通ヘリックスに対応する16.15 ppmの信号の15.86および15.61 ppmへのシフトが見られ、シッフ塩基周辺を含む膜貫通部位の構造に大きな変化が誘起されることが分かった。

(図) 同様の方法で、プロトン放出基であるGlu194、Glu204の変異による立体構造変化を解析し、機能との相関を議論する。

R. Kawaminami, S. Tuzi, A. Naito, R. Needleman, J. K. Lanyi, H. Saito: Structure-function relationship of the proton release pathway in Bacteriorhodopsin

図 Mn²⁺処理[3-¹³C]Ala標識野生株 (WT) およびR82Q変異株bRのCP-MAS NMRスペクトル

1PB018

バクテリオロドプシンの光異性化反応における
Thr89の構造変化

○神取秀樹、木下紀道、山崎洋一、前田章夫、七田芳則、
R. Needleman¹, J. K. Lanyi², M. Bizounok³, J. Herzfeld³, J. Raap⁴,
J. Lugtenburg⁴ (京大・院理、¹Wayne State University、²University of
California, Irvine、³Brandeis University、⁴University of Leiden)

バクテリオロドプシンの光異性化反応が、どのようにして一方向のプロトン輸送をもたらすのか、立体構造の決定は新たな問題を提起した。特に、シッフ塩基近傍の水素結合構造の変化は、異性化とプロトン移動という時間軸の異なる2つの反応をつなぐものとして重要である。我々は最近、偏光赤外分光を用いた高精度の測定系を構築し、水素結合の情報を直接もたらす高波数領域 (> 1800 cm⁻¹) について異性化に伴う振動バンドの変化を新たに見出した[1]。さらに水素結合プローブとしてThr89の部位にシステインを導入した実験を行い、異性化が起こると Asp85 との間の水素結合が「異常に」強くなることが示唆された[2]。しかしながらこのような変化は、野生型の蛋白質で調べる必要があり、実際に Rothschild のグループが報告した Thr89 の水素結合構造は、その強さという点で我々の報告とは異なっている[3]。

そこで今回、我々はスレオニン側鎖の酸素原子を¹⁸Oで標識したバクテリオロドプシンに対して偏光赤外分光を適用し、異性化によって変化するスレオニンの構造解析を行った[4]。その結果、18個のスレオニンのうち、数個のスレオニンがその構造を変化させたが、そのうち重水置換されるものは1個だけであった。さらに変異蛋白質に対して測定を行ったところ、T46, T90, T142, T178, T205 の変異体では野生型と同様の振動バンドが観測された一方で、T89A, T89C ではバンドが消失し、T89S では低波数シフトして現れた。これらの結果から、異性化で水素結合を変化させる重水置換可能なスレオニンは Thr89 であることがわかった。O-H 基の双極子モーメントは膜法線に対して 21°の角度をもち、BR の状態で Asp85 と強い水素結合を形成する。この水素結合は、システイン置換蛋白質の結果[2]から示唆されていたように、異性化によってさらに強くなった。その程度は、モデル化合物であるアルコール溶液中の水素結合よりも強いことがわかった。

以上の結果をもとに、Thr89 近傍で起こる構造変化について、フェムト秒で起こる異性化やマイクロ秒で起こるプロトン移動の機構と併せて議論したい。

[1] Kandori et al. (1998) JPC B102, 7899. [2] Kandori et al. (1998) JACS 120, 5828. [3] Liu et al. (1998) BBA 1365, 363. [4] Kandori et al. (1999) Biochem. in press.

H. Kandori, N. Kinoshita, Y. Yamazaki, A. Maeda, Y. Shichida, R. Needleman, J. K. Lanyi, M. Bizounok, J. Herzfeld, J. Raap, J. Lugtenburg: Structural Change of Threonine 89 upon Photoisomerization in Bacteriorhodopsin as Revealed by Polarized FTIR Spectroscopy.

1PB020

バクテリオロドプシンの Dark-N に見られる高次構造変化
○上久保 裕生(高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所)、今元 泰、片岡 幹雄(奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科)

バクテリオロドプシンの一方向プロトン輸送機構を明らかにするためには、プロトン輸送を構成する個々の局所的なプロトン移動の一方向性を保証するアクセスサイドのスイッチ機構を解明することが重要である。我々はこれらのスイッチ機構に、蛋白質の立体構造変化が関与していると考え、プロトン輸送過程の、特にプロトン移動がおきる時点 (分光学的には M 中間体および N 中間体) で生じる高次構造変化に注目し研究を行った。その結果、シッフ塩基の細胞外側チャネルへの脱プロトン化をトリガーとして、主として細胞質側のチャネルで高次構造変化が生じることを明らかにし、この高次構造変化自身がシッフ塩基のアクセスサイドの (細胞外側 <-> 細胞質側) 変化に関与していることを示してきた。一昨年の年会では、シッフ塩基の脱プロトン化以降に見られる高次構造変化は、暗状態での構造から G・B ヘリックス周辺に変化が見られる M-type 構造への転移と、M-type 構造から G・F ヘリックス周辺に顕著な変化が見られる N-type 構造への転移の2段階で構成されていることを明らかにした。また、M-type 構造と N-type 構造では試料の水和に依存して、その安定性が異なることから、N-type 構造では M-type 構造に比べよりチャネルが開き細胞質側のチャネル内が蛋白質の外側の水にさらされやすい状態になっていることを示した。我々は、この2段階の転移によって Asp96 からシッフ塩基への高効率のプロトンが移動が実現していると考えている。

ここで示したように N-type 構造と細胞質側のチャネル内の水和の間に相関があるとなれば、細胞質側のチャネルにける摂動は結合する水分子に影響を与え N-type 構造の安定化に変化を促すと推測される。事実、細胞質側のチャネルに水銀をラベルすることを目的として作製されたシステイン導入変異体では、一様に N 中間体が安定化されることがわかっていく。特に F171C 変異体では、光反応過程で N 中間体を安定化するだけでなく、暗状態で pH 依存的にアルカリ条件下で N 中間体様の吸収スペクトルを持つ成分が蓄積されることがわかった。本年会では、この暗状態で観測される N 中間体様の成分の構造を X 線回折測定によって明らかにしたので、その結果を報告する。

H. Kamikubo, Y. Imamoto, M. Kataoka: Structural characterization of Dark-N state of bacteriorhodopsin.