1E1630

バクテリオロドプシン Y185F 突然変異体を使った紫膜および青膜の紫外共鳴ラマン法による蛋白構造変化の研究

○紙中 庄司¹, Lanyi J.K.², Mathies R.A.¹ (¹カリフォルニア大バークレー校化学,²カリフォルニア大アーヴィン校生物物理)

我々は先にナノ秒時間分解紫外共鳴ラマン法を使って、バクテリオロドプシン (BR) のKLからM中間体までの蛋白中のチロシン (Tyr) やトリプトファン (Trp) 残基の動的構造変化を追跡した [1]。その結果、M2 中間体で 13-cis レチナールと Tyr185 のステリックな相互作用と、Asp212 と水素結合しながら大きく向きを変える Tyr185 の OH グループを見出した。この所見を確かめるために、暗所でリラックスした 13-cis レチナールを持つ acidic blue membrane (BM) に我々は関心を持った。本研究では、BM 中のレチナールと Tyr185 の相互作用を調べるため、Native と Y185F 突然変異体の BM と PM の紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した。Y185F は PM 中で BR 570 の他に O-like な光反応生成物を安定に持つ。そこで上記二成分の比が KCl 濃度に依存して大きく変化するのを利用し、Y185F の PM 中でも BR 570 だけのスペクトルを得ることに成功した。その結果、BR 570 で Tyr185 と Trp86 がステリックな相互作用を持っていること、BM 中では M2 と同じ様式で Tyr185 と Asp212 が水素結合しているばかりではなく、Tyr185 はレチナールとステリックな相互作用を持っていることを突き止めた。この意味で、M2 中間体では、レチナールは BM と同じようにリラックスした 13-cis 状態を持っており、Tyr185 との位置関係も酷似していることが明らかになった。さらに Native での PM と BM の大きな紫外共鳴ラマンスペクトルの違いは主に蛋白表面にある Tyr や Trp 残基の環境変化に起因することも分かった。参考文献 [1] S. Kaminaka, J. K. Lanyi, and R. A. Mathies, *Biochemistry* submitted (2000)

S.Kaminaka, J.K.Lanyi and R.A.Mathies : UVRR Examination of Protein Structural Changes in Bacteriorhodopsin's PM and BM Using the Y185F Mutant

1E1700

バクテリオロドプシンの光反応過程で生じる G ヘリックスの変化 (II)

○上久保 裕生¹, 富田 篤², 岡 俊彦³, Lanyi J.K.⁴, Needleman R.⁵, 今元 泰², 片岡 幹雄² (¹高エネ機構・物構研,²奈良先端大・物質創成,³理研播磨研究所,⁴U. C. Irvine, ⁵Wayne State Univ.)

光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (bR) は、一分子で機能が完結した蛋白質であり、蛋白質の特徴でもある反応の高効率性を理解する上で、極めて有効なモデル蛋白質である。最近になり、暗状態と光反応中間体の高分解能構造が X 線結晶構造解析によって明らかにされ、bR の一方向プロトン輸送機構をアミノ酸残基レベルで理解するための下地ができつつある。一方で、我々の紫膜を用いた X 線回折測定の結果から、光反応過程には M-type 構造と N-type 構造の少なくとも 2 種類の構造が存在し、M-type 構造から N-type 構造への転移は一方方向プロトン輸送の本質を担っていることが示唆されている。また、これら 2 つの状態の構造安定性は試料の条件に敏感であり、分光学的に同一の中間体でも異なった構造が存在し得ることが示されている。従って、結晶構造解析で得られた高分解能構造を正確に解釈するためには、結晶中で蓄積された中間体が M-type 構造であるのか、N-type 構造であるのかを構造学的に明らかにする必要がある。紫膜を用いた X 線回折測定は、天然状態に近い条件での測定が可能であり、得られる結果は結晶構造解析による構造を分類する上で重要な役割を担うと考えられる。我々は過去に G ヘリックスの細胞質側にある I222 を Cys に置換した変異体を用い、水銀によって部位特異的に重元素ラベルすることで、紫膜を用いた X 線回折測定でもアミノ酸残基レベルで変化を同定することができることを示してきた。そこで我々は、さらに L223 と S226 を Cys に置換した変異体に対して同様の測定を行い、3 つのアミノ酸残基の位置変化から、特に N-type 構造 (MN 中間体) での G ヘリックスの変化を同定を試みた。本年会では、ここで得られた結果と結晶構造解析で得られた結果を比較し議論する予定である。

H.Kamikubo, A.Tomita, T.Oka, J.K.Lanyi, R.Needleman, Y.Imamoto, and M.Kataoka : Characterization of conformational changes on helix G during the photo-reaction of bacteriorhodopsin (II).

1E1645

バクテリオロドプシンの光異性化からプロトン移動にいたる過程における Thr89 の構造変化

○神取 秀樹¹, 山崎 洋一¹, 七田 芳則¹, Raap J.², Lugtenburg J.², Belenky M.³, Herzfeld J.³ (¹京大・院理・生物物理,²University of Leiden, ³Brandeis University)

バクテリオロドプシンのプロトンポンプは、レチナールシッフ塩基から Asp85 へのプロトン移動によって開始する。負の電荷をもった Asp85 の 2 つの酸素原子のうち、一方は水分子と、他方は Thr89 と水素結合を形成しているが、レチナールの異性化反応からプロトン移動にいたる過程で、これらの水素結合はどのように変化するのであろうか? 分子ポンプの動作には、スイッチという方向性を決定する部分が必要であり、この間にはスイッチ機構を考える上でも重要である。K、L、M といった中間体におけるこれらの O-H 伸縮振動が水素結合に関する直接的な情報を与えるが、バルクの水の大きな赤外吸収のため、これまで特定の伸縮振動の検出は不可能であった。我々は最近、光異性化によって生成する K 中間体に対して、低温偏光赤外分光を用いた高い精度の測定系を構築し [1]、18O で標識した試料の測定からスレオニン側鎖の伸縮振動の検出に成功した [2,3]。その結果によれば、Thr89 と Asp85 との強い水素結合は、異性化によって文献にないほど「異常に」強くなることがわかった [2]。初期中間体の高エネルギー状態を反映すると考えられるこの結合は、K 中間体の緩和に際してどのように変化するのであろうか? 今回、我々は高精度低温偏光赤外分光を L、M 中間体に対して適用し、Thr89 の水素結合変化を追跡した。その結果、全く予想外だったことに、「異常に」強い水素結合は L、M 中間体においても保たれていた。以上の結果をもとに、Thr89 近傍で起こる構造変化について、スイッチ機構、X 線結晶構造解析との不一致なども含めて議論したい。[1] Kandori et al. (1998) *J. Phys. Chem.* B102, 7899-7905. [2] Kandori et al. (1999) *Biochemistry* 38, 9676-9683. [3] Kandori et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4643-4648.

H. Kandori, Y. Yamazaki, Y. Shichida, J. Raap, J. Lugtenburg, M. Belenky and J. Herzfeld : Structural changes of Thr89 during the functional processes of bacteriorhodopsin

1E1715

時分割 X 線回折を用いたバクテリオロドプシンの M-N 中間体遷移過程の研究

○岡 俊彦¹, 八木 直人², 藤沢 哲朗¹, 井上 勝晶², 徳永 史生³, 片岡 幹雄⁴ (¹理研・播磨,²JASRI,³阪大・院理,⁴奈良先端大)

膜蛋白質バクテリオロドプシン (BR) は光子を吸収し、水素イオンを細胞質側から細胞外側に、いくつかの中間状態を経て、輸送する。この光反応過程の M 中間体から N 中間体への遷移において、大きな構造変化が起きるかという点で相反する結果が報告されている (Kamikubo et al. (1997) *Biochemistry* 36, 12282-12287; Subramaniam et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 287, 145-161)。このため、我々はこの遷移過程での構造変化を調べるために、SPRING8 の BL45XU-A において時分割 X 線回折実験を行った。まずフラッシュランプ照射により開始される野生型 BR (pH9, 10 °C) の光反応過程で、570nm と 410nm の吸光度変化を測定し M 中間体から N 中間体の存在を確認した。次に同条件下の紫膜を用い、光反応過程での構造変化を X 線回折実験 (時間分解能 244ms) により測定した。この X 線回折データを特異値分解法をもちいて成分分解すると、M_iN_jBR という反応過程で 3 つの構造状態が存在することを明らかにした。これは BR 状態の構造とともに、M 中間体、N 中間体が固有の構造を持つことに由来すると考えられた。また、このデータを用いて 2 次元投影差電子密度図を作成したところ、N 中間体が主要と考えられる遅い成分のものは、F、G ヘリックス近傍が大きく変化しているのに対し、M 中間体が主要な遅い成分のものは G ヘリックスが大きく変化していた。これは M-N 遷移で F ヘリックスが大きく変化することによると考えられる。

T. Oka, N. Yagi, T. Fujisawa, K. Inoue, F. Tokunaga, M. Kataoka : Time-resolved X-ray diffraction reveals the multiple conformations in the M-N transition of bacteriorhodopsin photocycle.