3P081

バクテリオロドプシンにおける活性中心のpKa制御に関する量子化学的研究

○中島 佐和子¹、大野 一樹¹、神谷 成敏²、井上 義夫¹、櫻井 実¹ (¹東工大院生命理工、²生物)

バクテリオロドプシン (bR) は光反応エネルギーを利用してプロトン輸送を行うレチナールタンパク質である。本研究ではpKaという視点からプロトン輸送メカニズムの解明を行うことを目的とし、具体的にはbR基底状態におけるレチナールシッフ塩基のpKa制御機構について研究した。まずX線結晶構造解析により得られた構造(1C3W)をもとに半経験的分子軌道法(AM1)で構造最適化を行い、さらに当研究室で開発したintegrated(MOZYME+DFT)法を利用したタンパク質全体を量子化学的に考慮したエネルギー計算を行った。その結果プロトン授与残基と考えられるAsp85に対するレチナールシッフ塩基の相対pKaは6.24となり、実験の傾向($\Delta\epsilon$ 10.5)をよく再現することができた。ここではさらに詳しい計算を行い、プロトン化レチナールシッフ塩基の安定化に対するタンパク場の効果を検討した。bRではレチナールシッフ塩基周辺に水素結合ネットワークが存在し、プロトンはこれを介して移動すると考えられている。構造最適化により得られたbRに対しタンパク場をいくつかの領域に分けることでタンパク場の効果を評価した。タンパク場を量子化学的に考慮した今回の計算では、従来言われてきた水分子やThr89などを含むレチナールシッフ塩基近傍の水素結合ネットワーク(Asp85, Asp212, Arg82, Thr89, 3つのHOH)の効果だけではなく、その周囲のタンパク場の効果もレチナールシッフ塩基のプロトン化状態の安定化に大きく寄与している(8.54kcal/mol)ことが示された。さらにbRではレチナールシッフ塩基はねじれた構造をとっていることがわかった。今回はレチナールシッフ塩基のねじれによるpKa制御にも着目し、プロトン化レチナールシッフ塩基の安定化に対しねじれが優位に働くことがわかった。

S Nakajima, K Ono, N Kamiya, Y Inoue, M Sakurai : Quantum Chemical Study of the pKa control for the active site residues in bacteriorhodopsin

3P083

バクテリオロドプシンにおける表面電荷の細胞質側複合体形成への寄与；固体高分解能NMRによる解析

○荒川 規、米林 香華、山口 悟、谷生 道一、辻 暁、斉藤 肇 (姫路工大・理)

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の紫膜中に存在する光駆動プロトンポンプである。このタンパク質は種々の受容体の最も単純な構造モデルとしても考えられており、これまでに行われた多くの研究から、その機能や構造について原子レベルでの理解がなされてきた。本研究室では生理状態に近い条件下での構造と運動に関する情報が得られる固体高分解能NMRを用いて解析を進め、膜タンパク質全体が柔軟な動的構造をとることを示した。特に、C末端膜表面部位に存在する α -helixを含めた高次構造がpH、温度、脂質、金属イオンなど様々な因子で変化することを明らかにし、これらとの相互作用によって形成される表面構造(細胞質側複合体)の存在を示唆してきた。

本研究ではさらにこの表面構造の性質を知ることを目的とし、細胞質側表面に存在するAspやGluといった酸性残基を部位特異的変異により中性残基に置換することで、表面負電荷の立体構造への寄与を調べた。[1-¹³C]Val標識したbRの固体高分解能NMRスペクトルにおいて、野生型紫膜と脱カチオン青膜との比較から、表面負電荷の消失による影響—helixおよびloop領域の構造や運動性の変化—が見られた。また、紫膜表面に局在する2価カチオンをNMR緩和試薬であるMn²⁺に置換することで、親水表面の残基からの信号を消去して膜貫通部位の残基を選択的に観測したところ、電荷消失による変化は見られなくなった。このことから、電荷の有無が表面の構造および運動性を変化させていることがわかり、細胞質側複合体形成に電荷の寄与も重要であることを示唆した。さらに、表面電荷の消失によるプロトンの取り込み効率低下をふまえ [Checover et al., (2001) Biochemistry 40, 4281-4292]、この表面複合体とプロトンポンプの関係について考察する。

T. Arakawa, K. Yonebayashi, S. Yamaguchi, M. Tanio, S. Tuzi, H. Saito : A High-resolution Solid-state NMR Study on cytoplasmic surface complex of bacteriorhodopsin modified by negative charge

3P082

バクテリオロドプシンの膜貫通ヘリックス間相互作用と揺らぎの相関；固体高分解能¹³C NMRによる解析

○谷生 道一、宮田 和彦、辻 暁、斉藤 肇 (姫路工大・理)

高度好塩菌の紫膜に存在するバクテリオロドプシン (bR) は、光駆動プロトンポンプとして働く膜蛋白質で、発色団のレチナールがLys216側鎖とプロトン化シッフ塩基(SB)結合を形成している。SB近傍には、酸性残基のAsp85とAsp212が存在しており、プロトン輸送過程に置いて重要な働きをしている。昨年の年会では、これらのAspがSBに対してほぼ等価な位置に存在しているにも関わらず、bR高次構造と揺らぎへの寄与が異なることを示した。本研究では、さらにこの荷電性残基の揺らぎ誘起の機構について解析を行った。[1-¹³C]Ala標識野生株(WT)、D85NおよびD212N変異株の交差分極マジック角回転法(CP-MAS)NMRスペクトルでは、D85N変異株のみが膜貫通 α ヘリックス領域の信号強度上昇を起こした(図1)。これはD85N変異株の膜貫通 α ヘリックスに存在するAla主鎖カルボニル炭素の揺らぎが、MAS周波数の10⁴ Hzよりも上昇していることを意味しており、Asp212よりもAsp85が蛋白質の揺らぎに関与しているというこれまでの結果と一致する。このヘリックスの揺らぎとSBのpKa値との関係について考察をする。

M. Tanio, K. Miyata, S. Tuzi, H. Saito : Conformational fluctuation of transmembrane alpha helices in bacteriorhodopsin as observed by ¹³C solid state NMR

3P084

固体高分解能NMRによるバクテリオロドプシンのシッフ塩基の荷電状態の変化とBヘリックスの揺らぎの観測

○吉良 敦史、谷生 道一、辻 暁、斉藤 肇 (姫路工大・理)

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌の紫膜に存在する膜タンパク質で光駆動プロトンポンプ活性を有する。このタンパク質は、アミノ酸248残基からなり7本膜貫通型構造をとっており、発色団であるretinalがLys 216とシッフ塩基結合を形成している。光サイクルではretinalが異性化を起こし、シッフ塩基のプロトンがAsp 85にプロトン移動し、M中間体構造を形成する。この時点で、シッフ塩基とAsp 85の電荷が消失し、retinal pocketといわれる部分の荷電状態が大きく変化する。

シッフ塩基のpKaは野生株(WT)においては12以上と高い値を示すが、Asp 85をAsnに変異させ電荷を消失させると8.5にまで低下する事が知られており、このことを利用しシッフ塩基の荷電状態が及ぼす高次構造への寄与を解析することが可能である。去年の年会において[1-¹³C]ValプローブのD85NおよびD85N/D96N変異株のpH滴定実験を発表した。

今回の発表では、D85N変異株のpH滴定NMR測定で得られたVal 49の信号の挙動を、[1-¹³C]Val-V49A/D85N変異株を用いて明らかにすると同時に、新たに[1-¹³C]ProプローブにおけるpH滴定実験を行った。これらの結果から、Val 49の信号はpH上昇にともなって、マジック角回転との干渉が起きる10⁴Hzの周波数成分を有する揺らぎのために消失していく事が分かった。これに対し、[1-¹³C]Proラベルで得られたPro 50残基はAsp 85およびシッフ塩基の荷電状態に対しても変化を示さなかった。このことはM中間体構造では、BヘリックスにおいてもPro 50を境に細胞質側残基の構造および運動性の変化があることが明らかになった。

A. Kira, M. Tanio, S. Tuzi, H. Saito : ¹³C NMR observation on charge-dependent fluctuation of cytoplasmic site of B helix in M-like state