1D1330

レチナール蛋白質にみられるゆらぎ

○水上 卓、辻本 和雄（北陸先端科学技術大学院大学・材料科学研究科）

蛋白質が生理的条件下で大きくゆらいでいることは、以前から多くの理論的研究で示されてきた。実験的には、X線結晶回折や最近では一分子測定などで次第に明らかになりつつある。このゆらぎは、蛋白質の生理的機能の発現を理解する上で大きな鍵になると考えられている。

レチナール蛋白質は、光吸収後、フェムト秒から秒の広い時間領域にわたって数種類の間接体をシーケンシャルに遷移し、機能発現する。古くからこの過程は吸収スペクトルによって詳細に研究されてきたが、データに一次反応スキームでは説明のつかない成分が存在することは、実験家の間で（暗に）知られていた。多くの場合、その成分で新たな中間状態の存在を示唆するに留まったのは、解析の困難さに原因する。

我々は、レチナール蛋白質イカリチノクロムを用い、その光異性化過程を、低温分光法によって研究してきた。レチノクロムにはBatho中間体の存在は確認されていなかったが、我々はスペクトルデータをSVD（特異値分解）法で解析することにより、スペクトル変化に見られる最小成分数（次元）を確定して中間体の数を決定し、長波長に吸収を持つBatho中間体の存在を示した。

SVD解析の過程で、1) 中間体の個数が決定し、2) それによって可能な一次反応スキームのバリエーションが決定する。しかし実験データに、これで解析できないケースがあった。我々は、ガウシアン型に分布した速度定数を仮定することによって、これらのケースを説明することが出来た。この分布した速度定数は、蛋白質の揺らぎに起因すると考えられる。また最大エントロピー法を用いて実験データから一意的に速度定数の分布を求める試みをおこなったので講演ではあわせて報告する予定である。

T.Mizukami, K.Tsujimoto : Fluctuation of retinal protein

1D1400

プロトン化 Schiff base レチナールの安定性に対するロドプシン中のアミノ酸残基の寄与

○山田 篤志¹、垣谷 俊昭¹、山本 茂義²、倭 剛久¹（¹ 名大・理・物理、² 中京大）

ロドプシンは視覚に於ける光受容蛋白質であり、発色団としてプロトン化 Schiff base (PSB) レチナールを含む。PSB レチナールは溶液中では安定化しないが、ロドプシン環境下では負電荷を帯びたカウンターイオン (Glu113) の存在がPSBの安定化に大きく寄与し、電荷分離状態を保持させていることが分かっている。

量子化学計算によると、真空中でのこのカンターイオン単体ではPSBを安定化させるには不十分であることがわかっている。PSB レチナールが電荷分離状態として安定化するには、カウンターイオンに加えレチナールをとり囲むタンパク質や水、脂肪環境による実効的な誘電率を取り入れることが必要であることが示されている。

我々はPSB レチナールとカウンターイオンの電荷分離状態に対して周辺のアミノ酸が安定性に及ぼす効果をab initio分子軌道法を用いて調べた。今回の計算ではレチナール周辺の構造を連続誘電体に近似せず、X線結晶解析構造の原子座標を用いた。計算の結果、PSB レチナールと9個のアミノ酸残基 (Thr94, Glu113, Gly114, Ala117, Thr118, Ser186, Cys187, Ala292, Phe293) の分子モデルでは、電荷分離状態が中性状態よりも約0.56 eV安定であるという結果を得た。特にレチナール共役鎖のC12とC14付近に存在しているSer186とCys187がPSBの安定化に大きく寄与していることがわかった。この結果より水分子の存在しない構造でも電荷分離状態は中性状態よりもエネルギー的に有利であることが言える。

A.Yamada, T.Kakitani, S.Yamamoto and T.Yamato : Contribution of amino acids to the stability of protonated Schiff base of retinal in rhodopsin

1D1345

ロドプシンのオプシシフトに関する量子化学的研究

○齊藤 紫野、川村 修平、北條 博彦、井上 義夫、櫻井 実（東工大・生命理工）

ロドプシンは桿体外節に存在し、明暗視を司る光受容タンパク質である。発色団であるプロトン化11-cis レチナール Schiff 塩基はエタノール中で440nmに吸収極大を示すが、オプシンに結合することで吸収波長は幅広くシフトする。この発色団とオプシンの相互作用による波長シフトはオプシシフトとして知られている。本研究では、このオプシシフトの分子メカニズムを理論的に説明することを目的とし、QM/MM-CI法を用いた吸収波長計算を行った。本研究の吸収波長計算では、発色団をINDO/S法で解き、オプシンをPMM(*)で近似した。PMMはタンパク質の各結合をシリンドラ状の誘電体として扱うことで、励起に伴う分極の効果と、電荷の3次元的な構造の効果の両方を取り入れることができる近似法である。PMM近似を用いた吸収波長計算の結果、PDBコード1F88をもとにしたモデルではロドプシンの吸収波長の絶対値を良く再現した。Glu181については、プロトン化・非プロトン化の両状態について計算したところ、Glu181の脱プロトン化によって、約35nmもの長波長シフトが観測された。そこで、励起エネルギーを各成分にわけて原因を調べた結果、この長波長シフトはオプシン内の電荷同士の相互作用に起因することが分かった。さらに、いくつかの1残基変異体に対する計算において、置換に伴う波長シフトの向きは実験値と傾向が一致したが、一部の変異体ではシフト方向を再現しなかった。これらの変異体は、オプシンに存在する電荷同士の相互作用の寄与を取り除いて計算すると、実験結果からのずれが減少する。このことは、PMM近似を用いた吸収波長計算においては構造依存性が存在することを示唆しており、構造の熱ゆらぎ平均をとるなどの必要性が考えられる。* Houjou, H.; Inoue, Y.; Sakurai, M.; (2001) J.Phys.Chem.B., 105(4), 867-879

S.Saito, S.Kawamura, H.Houjou, Y.Inoue, and M.Sakurai : Theoretical Study On The Molecular Mechanism Of Opsin Shift Of Rhodopsin

1D1415

視物質ロドプシンの活性化過程における水分子の水素結合変化

○古谷 祐詞^{1,2,3}、七田 芳則^{1,3}、神取 秀樹^{2,3}（¹ 京大院・理・生物物理、² 名工大・工・応用化学、³ CREST・JST）

ロドプシンの内部結合水は、発色団部位における電荷対の安定化やイオンの輸送に重要な役割を担うと考えられている。我々は赤外分光法を用いて、ロドプシンの機能発現過程における水分子の構造変化を研究している。最近になってD₂OとD₂¹⁸O水和によるスペクトル比較から、これまで測定が不可能であった負電荷に水和した（水素結合のきわめて強い）水分子の振動バンドを捉えることに成功し、古細菌ロドプシンにおける特異な水分子の水素結合構造を明らかにした^{1,2}。

本研究では、同様の手法を視物質ロドプシンに発展的に適用し、様々な水素結合環境における水分子の構造変化を解析した。ウシロドプシンのX線結晶構造によると、レチナール Schiff 塩基を構成する窒素原子から5 Å以内の距離に2つの水分子が存在し、Glu113とプロトン化 Schiff 塩基を含む水素結合ネットワークが存在する³。しかしながら、バソ、ルミ、メタI、メタII中間体における低温赤外分光の結果、水素結合の強い水分子のスペクトル変化は全く観測されなかった。従って、視物質ロドプシンにおける Schiff 塩基とGlu113のイオン対構造は、古細菌ロドプシンとは異なった機構で安定化されていることがわかった。さらにメタII形成時における Schiff 塩基からGlu113へのプロトン移動に、強く水和した水分子は関与しないことが示唆された。講演では以上の結果をもとに、視物質ロドプシンにおける内部結合水の役割について議論したい。

1. Kandori & Shichida, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 11745 (2000).
2. Furutani & Kandori, *Mol. Membr. Biol.* In press.
3. Okada et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 5982 (2002).

Y. Furutani, Y. Shichida and H. Kandori : Hydrogen bonding strength change of water in Rhodopsin studied by low temperature FTIR spectroscopy