B665

バクテリオロドプシンの二次元配列と動的構造

○山本 和俊、山口 悟、辻 暁、斉藤 肇（姫路工大・院理）

バクテリオロドプシン (bR) は7回膜貫通ヘリックス構造を持つ膜蛋白質である。天然状態では三量体を構成単位とした二次元結晶 (PM) を形成している。そのプロトンポンプ機能をはじめ、最も研究されてきた膜蛋白質の一つである。本研究は ^{13}C NMR 信号の帰属がおこなわれている $[3-^{13}\text{C}]$ Ala および $[1-^{13}\text{C}]$ Val 標識 bR をもちいて、脂質二重膜における単量体および二次元配列条件下での動的構造の解析と ^{13}C 標識部位から NMR 信号を得るための最適条件を検索することを目的とした。

$[3-^{13}\text{C}]$ Ala および $[1-^{13}\text{C}]$ Val 標識 bR を egg PC、DMPC、DPPC 脂質二重膜にそれぞれ再構成を行った。20℃において egg PC 中の $[3-^{13}\text{C}]$ Ala 標識単量体 bR はヘリックス部位においては分離の良いスペクトルが観測された。しかし、ループおよび α -ヘリックス由来の信号の一部が消失していた。これは単量体の bR は周波数成分が 10^4 - 10^5 Hz 程度のゆらぎをもっており、このゆらぎとプロトンデカップリングの周波数が干渉を起こすためであると考えられる。また、DMPC、DPPC の相転移点以下の 0℃で測定したとき ^{13}C NMR 信号は PM の信号と類似していた。これは PM 由来の極性脂質の存在に加え脂質二重膜がゲル相をとることによって DMPC、DPPC 中の bR が二次元配列を形成し、 ^{13}C NMR 観測のための最適なダイナミクスを実現したためと考えられる。

K. Yamamoto, S. Yamaguchi, S. Tuzi and H. Saito : The effect of two dimensional array formation as revealed by site-directed solid-state ^{13}C NMR on bacteriorhodopsin

B667

バクテリオロドプシン変異体による負電荷に水和した水分子の構造解析

○柴田 幹大、谷本 太郎、神取 秀樹（名工大院）

バクテリオロドプシン (BR) 内部にはレチナール近傍に3つの水分子と2つのアスパラギン酸の酸素原子によって形成される平面的なベンタゴンクラスター構造が存在する。これらの水分子は、疎水的なタンパク質内部で電荷の安定化と共に、能動輸送のためのプロトン移動反応に重要であると考えられる^{1,2}。我々は低温赤外分光法による K/BR 差スペクトルの測定によって、重水中で水分子としては極めて低い振動数領域に O-D 伸縮振動を観測し³、これらは BR 内部で負電荷に水和した水分子と考えた。さらに、L, M, N 中間体に対する同様の測定をもとに、シッフ塩基から Asp85 へのプロトン移動機構として水分子の水和スイッチが起こるというモデルを提唱した⁴。このように BR の内部結合水の振動解析は BR のメカニズム研究に重要な知見を与えたが、それらが実際に負電荷に水和した水分子に由来するか実験的に確かめられてはいない。そこで、これらの水分子の部位を決定するため、ベンタゴンクラスター近傍のアミノ酸残基を変異させた試料に対する低温赤外分光を行った。様々な変異体 (D85, D212, T89, Y185, R82 など) の K/BR 差スペクトル測定の結果、低波数領域の水分子はベンタゴンクラスター中の水分子に由来すると結論した。さらに、最も強い水素結合を形成する水分子の O-D 伸縮振動は理論計算の報告通り⁵、W402 が Asp85 と水素結合を形成する O-D 伸縮振動に由来することが強く示唆された。これらの結果をもとに BR 内部の水分子の構造や構造変化について議論する。

1. 神取秀樹 日本物理学会誌, 56, 75-82 (2001).
2. H. Kandori, *Biochim. Biophys. Acta*, 1460, 177-191(2000).
3. H. Kandori & Y. Shichida, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 11745-11746(2000).
4. T. Tanimoto et al. *Biochemistry*, 42, 2300-2306 (2003).
5. S. Hayashi & I. Ohmine, *J. Phys. Chem. B* 104, 10678-10691(2000).

M. Shibata, T. Tanimoto and H. Kandori : FTIR study of internal water molecules by use of Bacteriorhodopsin mutants

B666

バクテリオロドプシンのプロトンポンプにおける Thr89 の役割

○谷本 太郎¹、Johan Lugtenburg²、Judith Herzfeld³、神取 秀樹¹ (¹名工大院、²University of Leiden、³Brandeis University)

バクテリオロドプシン (BR) は光駆動プロトンポンプ機能をもつ膜タンパク質であり、そのポンプ機構を解明するため、世界各地で活発な研究が行われている。BR のプロトンポンプは M 中間体生成時におけるシッフ塩基から Asp85 へのプロトン移動によって開始する¹。Asp85 の側鎖は Thr89 の O-H 基と水素結合を形成しており、この水素結合変化がプロトン移動やスイッチ機構に関与すると考えられた。そこで我々は水素結合変化を伸縮振動の振動数や角度変化として捉えることができる低温偏光赤外分光法²により、Thr の同位体標識試料と部位特異的変異体試料を用いた測定を行った。その結果、Thr89-Asp85 の強い水素結合はレチナールの異性化に伴ってさらに強くなることがわかった^{3,4}。さらに後続する L 中間体、プロトン移動によって Asp85 の負電荷がなくなった M 中間体においても強い水素結合は保たれ、水素結合が切れると結論した X 線結晶構造解析の問題点を指摘した⁵。一方これらの矛盾点は我々の観測した M 中間体がスイッチとしてはたらく前の M1 であるという指摘があったため、今回 230~273 K の範囲で M、N 中間体の測定を試みた。その結果、Thr89-Asp85 の水素結合は K 中間体から N 中間体に至るまで同様の変化をすることがわかった。両者の間の水素結合はプロトン移動やスイッチ機構に関わるというよりは、強い水素結合の形成によって Asp85 の側鎖を固定するようにはたらくものと考えられる。

1. Tanimoto et al. *Biochemistry*, 42, 2300-2306 (2003).
2. Kandori et al. *J. Phys. Chem. B*, 102, 7899-7905 (1998).
3. Kandori et al. *Biochemistry*, 38, 9676-9683 (1999).
4. Kandori et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4643-4648 (2000).
5. Kandori et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 1571-1576 (2001).

T. Tanimoto, J. Lugtenburg, J. Herzfeld and H. Kandori : Role of Thr89 in the proton pump of bacteriorhodopsin

B668

バクテリオロドプシンの L/M 反応中間体の X 線結晶構造解析

奥村 英夫、西川 太一、○神山 勉（名大院・理・物理）

三次元結晶を用いたバクテリオロドプシンの M 反応中間体の X 線構造解析を行う場合、M 中間体の捕獲には二つの方法が考えられる。すなわち室温で光を照射し M 中間体が蓄積されたところで液体窒素温度に急速冷却してトラップする方法 (方法 I) と、明順応状態の結晶を液体窒素温度にて凍結した後、180K に昇温し光照射することで M 中間体を蓄積させる方法 (方法 II) である。方法 I によりトラップした室温型 M 中間体についてはすでに松井らが報告している [1]。この結果によると M 中間体の形成に伴い G ヘリックスが膜外方向に滑り、これと連動してプロトン放出チャネルにおける水素結合網の構造が大きく変化することが示唆されている。今回、方法 II を用いてトラップした低温型 M 中間体の X 線結晶構造解析の結果を報告する。

[結果] 顕微分光装置を用いた測定から、方法 II で作成した結晶中には、M:L:bR=3:1:6 の割合で存在する。このようにして得られた状態を室温型 M 中間体と区別するために、L/M 反応中間体と名付ける。180K まで昇温すると結晶の質が不可逆的に低下し、回折データの積分は 2.7 Å で行った。このデータと基底状態の回折データ (2.4 Å 分解能) を比較し、電子密度の差マップを求めたところ、L/M 状態の形成に由来する構造変化はレチナール及びその細胞質側 (Trp182 及び Leu93) で顕著であった。一方、細胞外側での大きな構造変化は認められなかった。すなわち、L/M 状態の構造はむしろ 160K で蓄積した L 中間体と似ており、室温型 M 中間体とは大きく異なることが示唆される。

[1] 松井ほか:「バクテリオロドプシンの反応中間体の X 線結晶構造解析」、第 38 回生物物理学会年会

H. Okumura, T. Nishikawa and T. Kouyama : X-ray crystallographic analysis of the L/M intermediate of bacteriorhodopsin