2P277

クロライドイオンをポンプする
バクテリオロドプシン変異体の低温赤外分光○柴田 幹大¹、井原 邦夫²、神取 秀樹¹ (¹名工大院工、²名大遺伝子)

ある種の古細菌は2種類の光駆動イオンポンプにより光エネルギー変換を実現する。バクテリオロドプシン (BR) はプロトン細胞質側から細胞外側へとポンプし、ハロロドプシン (HR) はクロライドイオンを細胞外側から細胞質側へとポンプする。両者のアミノ酸残基の一致度は25%であるものの、BRのAsp85をThrやSerに置換したBR変異体D85T、D85Sはクロライドイオンポンプになることが知られている。一方、逆の置換をしても、HR変異体はプロトンをポンプしない。この事実は、アミノ酸残基以外の何らかの要因がポンプの性質を決定することを示唆する。

我々はこれまでに、BR、HRに対して低温赤外分光測定を行い、活性中心に存在する水分子の水素結合変化からBR中のプロトン移動機構^{1,2}を、シッフ塩基のN-H基とハライドとの水素結合変化からHR中のクロライドイオン移動機構³を提唱している。本研究ではクロライドイオンをポンプするBR変異体D85Sに対して低温赤外分光を適用し、BR、HRのデータと比較することでそのメカニズムを考察した。その結果、このBR変異体にはHRと同様、強い水素結合を形成した水分子は存在しないことがわかった。さらにシッフ塩基のN-H基とハライドとの水素結合はHRとよく似た変化を示した。プロトンポンプからクロライドイオンポンプへの機能転換に対応した今回の結果は、クロライドイオンに対する共通の輸送機構を強く支持している。活性中心に存在するシッフ塩基と水分子の特異的な水素結合変化が、プロトンポンプ、クロライドイオンポンプのそれぞれに重要であると結論できる。

1. Tanimoto et al. (2003) *Biochemistry* 42, 2300.
2. 柴田 幹大, 神取 秀樹 (2004) 生物物理, 44, 3.
3. Shibata et al. (2005) *Biochemistry* in press.

M. Shibata, K. Ihara and H. Kandori : Low-temperature FTIR spectroscopy of the D85S mutant of bacteriorhodopsin that pumps chloride ions.

2P279

低温赤外分光法による暗順応型バクテリオロドプシンの構造解析

○水出 紀子¹、柴田 幹大¹、Mordechai Sheves²、神取 秀樹¹ (¹名工大院工、²The Weizmann Institute of Science, Israel)

高度好塩菌の細胞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蛋白質である。暗順応型BRは、発色団レチナールのall-trans型と13-cis,15-syn型が約1:1の割合で存在し、明順応型はall-trans型が100%となる。プロトンポンプ機能をもつall-trans型については、ポンプメカニズムに関連して活発な研究が行われている。我々のグループでは、all-trans型に対する赤外分光により特異的な水素結合を形成した水分子を観測した¹。この水分子は活性中心でシッフ塩基とAsp85をブリッジしており、プロトンポンプ機能をもつ他のロドプシンにも観測されることからポンプに必須であると考えている^{2,3}。一方、ポンプ機能をもたない13-cis型の構造や構造変化についてはあまり理解されていない。

本研究では、低温赤外分光法を用いて13-cis型BRの構造及び異性化による構造変化を捉えることを試みた。暗順応させた野生型および同位体標識試料のK中間体差スペクトルを測定し、all-trans型のスペクトルを引き算することによって得た13-cis型のスペクトルをall-trans型と比較した。その結果、レチナールの異性化の際に構造変化する部位がall-trans型とは異なり中央部であること、異性化によってシッフ塩基のN-D基の水素結合の強さはall-trans型ほど弱くならないこと、all-trans型と同様、基底状態で強い水素結合を形成する水分子が存在することなどがわかった。これらの結果をふまえて、13-cis型BRの異性化に伴う構造変化について議論したい。

1. Shibata et al. (2005) *Biochemistry* 44, 7406.
2. Furutani et al. (2005) *Photochem. Photobiol. Sci.* in press
3. 神取秀樹 (2005) 現代化学9月号

N. Mizuide, M. Shibata, M. Sheves and H. Kandori : FTIR study of dark-adapted bacteriorhodopsin

2P278

Room Temperature FTIR difference spectra of L and M intermediates of bacteriorhodopsin at 5000-800 cm⁻¹

○Lorenz-Fonfria Victor、神取 秀樹 (名工大院工)

Most vibrational studies on bacteriorhodopsin (bR) are focused on the 1800-800 cm⁻¹ region, where skeletal vibrations of retinal and protein are observed. Nevertheless, analysis of the 3700-3000 cm⁻¹ region in H₂O and 2750-2000 cm⁻¹ region in D₂O also provide important information for understanding the proton-pumping mechanism of bR, specially for the characterization of internal water molecules. Interestingly, it has been shown that only retinal proteins with a proton-pump function have strongly hydrogen-bonded internal water molecules, which supports their important role in the pump switch machinery. In addition, studying bR in the high frequency range provided information on the role of important residues, such as Arg82, Thr89, Trp182 or Lys216.

Previous FTIR studies of waters in bR have been performed at cryogenic temperatures.¹ However, it is conceivable that such low temperatures could perturb intermediates structure and dynamics, yielding artifactual bands (or lack on bands) in the IR spectrum. An alternative procedure avoiding low temperature is time resolved acquisition.

In this study we will present the L and M spectra obtained at room temperature, using time-resolved step-scan FTIR. For the first time we will present the data demonstrating that internal water molecules are not a low temperature artifact but are also observed at room temperature. We will also compare low and room temperature spectra.

1. H. Kandori (2000) *BBA*, 1460:177-191; (2004) *BBA*, 1658:72-79

V.A. Lorenz Fonfria and H. Kandori : Room Temperature FTIR difference spectra of L and M intermediates of bacteriorhodopsin at 5000-800 cm⁻¹

2P280

ロドプシンがプロトンをポンプするためには強い水素結合を形成した内部結合水が必要である

○神取 秀樹¹、古谷 祐詞¹、柴田 幹大¹、住井 昌代¹、水出 紀子¹、宗田 法和¹、池田 大亮¹、川鍋 陽¹、加茂 直樹²、出村 誠³、井原 邦夫⁴、Jung K.-H.⁵、Brown L. S.⁶ (¹名工大院工、²北大院薬、³北大院理、⁴名大遺伝子、⁵Sogang Univ., Korea、⁶Univ. Guelph, Canada)

光駆動プロトンポンプとして光合成を行うバクテリオロドプシン (BR) のポンプ機構は、活発な研究にも関わらず解明されたとは言いがたい。加えて、ゲノム解析により最近、発見された古細菌型ロドプシンの存在がメカニズムの理解をより複雑にしている。例えば、真核生物のアカバシカビに発見された古細菌型のロドプシンは、BRのプロトン輸送経路のアミノ酸を同様にもつにも関わらず、プロトンポンプ活性をもたない。さらにBRは1アミノ酸の置換でクロライドイオンポンプになるが、同様の置換でハロロドプシンはプロトンポンプにはならない (プロトンポンプの方が上等?)。光でプロトンをポンプするためには、いったい何が必要なのだろうか? 我々は低温赤外分光を用いてBRなどが機能発現する際の水分子の水素結合変化を研究している。これまでBRにおいて、水の伸縮振動としては「異常に」低い振動数を観測し、これがレチナールシッフ塩基とAsp85をブリッジする水に由来することを明らかにした。同様の解析をBRの変異体や種々のロドプシンに対して行う中で、興味深い事実が浮かび上がってきた。すなわち、我々が発見した水素結合の強い水分子は、プロトンポンプ活性をもつロドプシンだけに存在することが明らかになってきたのである。プロトンポンプ活性と強い水素結合を形成した水分子の正の相関に従えば、ロドプシンのポンプ活性は1個の水の水素結合によって決まることになるのかもしれない。光エネルギーが入力されるシッフ塩基部位の重要性を考えればもったいなくもするが、ナノメータサイズで機能する分子機械にほんとうに当てはまるのだろうか? ポンプ機構に関する我々の作業仮説は研究分野の中でも大きな関心を集めており、さらに検証を進めるべく様々なロドプシンの解析を行っている。本発表では、最新のデータと併せて両者の相関がもつ意味について議論したい。

H.Kandori, Y. Furutani, M. Shibata, M. Sumii, N. Mizuide, N. Muneda, D. Ikeda, A. Kawanabe, N. Kamo, M. Demura, K. Ihara, K.-H. Jung, L. S. Brown : Strongly hydrogen-bonded water molecule present in the rhodopsins with proton-pump activity