プロトンポンプとしてのバクテリオロドプシン

京都大学理学部生物物理学教室 前田章夫

Known facts on the interactions of the protonated Schiff base portion of the retinal chromophore of bacteriorhodopsin with the charge-carrying residues of the protein, and their changes in the light-induced intermediates were summarized and discussed in terms of a possible mechanism of the proton transport. Structural differences from halorhodopsin, a chloride pump, were also taken into considerations.

bacteriorhodopsin / halorhodopsin / proton pumping / Schiff base / charged residue

1. チャンネルとポンプ

きわめてオーガナイズされた生物の営みのひとつに、細胞間、あるいは細胞とその外部環境とのコミュニケーションがある。光もその信号の一つである。細胞膜にあるリセプターは外からの信号を受け取り、細胞に二次的な信号を出す。膜電位の変化はその一つの現れである。膜電位の変化を起こす装置には大きくみて二つの種類がある。チャンネルのイオン透過性の変化に基づく膜電位の変化は、その中で最も普遍的である。もう一つはエネルギーを使ってイオンを動かすことによる。前者では、予めイオンの濃度勾配がついていることが必要であるが、ポンプとも呼ばれる後者ではイオンの濃度勾配を作る方向に作用する。

チャンネルでは濃度勾配に従ってイオンを動かすということから、イオンの透過生を決めるゲートの機構に興味もたれる。一方ポンプとは、エネルギーの供給にカップルしてイオンを運搬する系である。ここで主題としてとりあげたバクテリオロドプシン（以下BRと略する）はその一つ、光のエネルギーを使ってプロトンを一方向に運搬する蛋白質である¹⁾。図1の示すように、N末端を細胞外にC末端側を細胞内に向け、その間を七回折りまげて各々を膜を貫通させた構造は、その後続々と見つかったロドプシン、エビネフリンリセプターなど同種の蛋白質の原形をなしたものである¹⁾。光によって励起されるのは、Lys216とプロトン化 Schiff 塩基（以下PSBと略する）を形成して結合するレチナールである（図2）。そのエネルギーを使ってプロトンを一方向に運搬するチャンネ

ルと共に、分子量にして26,000の蛋白質の中に組み込まれている。

チャンネルについてはその特異性、透過性、感度調節などの面から最も広く研究されてきたのが、多分ニコチン性のアセチルコリンリセプターと神経のナトリウムチャンネルであろう。ポンプのメカニズムを研究する時に、最も深い所まで研究される材料となるのがBRである。

2. BRの光化学反応サイクルとプロトン移動

BRが示す鮮やかな紫色は、PSB部分を持ったレチナールに由来する。全トランス型のレチナールを持つBRの暗状態での極大吸収波長（以下 $\lambda_{\max}$ と略する）は570nmにある。BRが光ポンプ機構の解明にとって有利というときの最大の根拠は、PSBを持つレチナールが、可視部領域に示す吸収スペクトルや、それに基づく共鳴ラマンスペクトルを与えることにある。BRの活性中心とでもいうべきレチナールの形や電子状態、さらにはその近くに位置するアミノ酸残基の修飾や解離性アミノ酸残基のpH滴定に伴う変化といったものが、これらのスペクトルを解析することによって明らかにされて来る。大まかにいい方ではあるが、プラスの電荷をもつPSBからマイナスの電荷が離れるほど $\lambda_{\max}$ は長波長側にシフトしてくるといわれる。

レチナールが光を吸収すると、図3に示すように、励起状態といわれるIについて、Jからはじまるアルファベットの名前をつけた基底状態の中間体が順次現れてくる。BRの光によるプロトンポンプは、マイクロ秒段階でおこるN末端がある外側へのプロトンの放出と、ミリ秒段階でおこる内側からのプロトンの取り込みよりなる。これらの二つの過程に挟まれた中間体、M、Pとそれに先行するLの構造の解明が、その

Bacteriorhodopsin as a Proton-Pumping Protein
Akio MAEDA

Department of Biophysics, Faculty of Science,
Kyoto University

図1. BRの推定構造²⁾. 7本のセグメントの内、本文に関係するc, d, f, gのセグメントについてのみ示した。また、HR³⁾についてはBRと異なるところをその下の小さい字で示した。A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Yはそれぞれアラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニールアラニン、グリシン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファン、チロシンを示す。N, CはそれぞれN末端、C末端を、OUT, INはそれぞれ図に示したような配置を取った時の細胞の外、内を示す。——は静電的相互作用を、·····は水素結合による相互作用を示す。レチナールが結合したリジンは○で囲んだK216であるが、ここで問題にするPSBがどの位置に来るのかは分からない。

ままプロトンポンプ機構の解明に連なってくることになる。L, PとBRでは各々の吸収スペクトルは殆ど変わりはない。それぞれに特徴的な共鳴ラマンスペクトル、フーリエ変換赤外スペクトルに現れる振動バンドの意味の解明が急がれる課題になっている。

3. 暗状態でのBR

酵素反応というものを一般的な図式でとらえることは不可能としても、多くの例からみて、その解媒作用を行う活性中心にはいくつかの解離性アミノ酸残基があり、そのあるものの pK_a は溶液中でのそれとは著しくことになっていて、いわば電気的に歪んだ状態にあることは、かなりの一般性を持っていえそうである。活性中心に包みこまれた基質は、いわゆるミカエリス複合体の状態から、蛋白質側の電荷により安定化された遷移状態の構造に移る⁵⁾。この二つの状態を区別する最大のポイントは形の変化ではなく、電荷による相互作用である。電荷間の相互作用に基づく遷移状態の構造こそが、酵素蛋白の機能発現のための原動力とい

われる。BRの場合には、プラスの電荷をもったPSBとその周辺にある解離性アミノ酸残基との、静電的な相互作用を問題としてとりあげるべきであろう。広く信じられているBRの推定立体構造(図1)をみると、PSBの存在する膜の内部には、いくつかの解離性アミノ酸残基がある。暗状態でのPSBはそのプロトンによる水素結合を通じて、マイナスの電荷をもった蛋白質の残基と弱く相互作用している。

光反応によって形成される中間体における相互作用を考える前に、暗状態では他にどのような解離性アミノ酸残基がPSBの周りに配置して、静電的に相互作用をしているかを調べてみる。BRを酸性の溶媒に移すと、 λ_{max} にして610nm付近へのレッドシフトを起こし、色が紫から青に変わる。PSBと相互作用して λ_{max} を570nmに保っていた $pK_a = 3$ の残基のマイナスの電荷(A^-)がプロトン化して失くなったためである。(図3b)。この残基はまた、プラスの電荷をもつリジン(KH^+)と膜の中で静電的な相互作用を

図2. 全トランス型レチナルを持つBRの、プロトン化シッフ塩基とその周辺にある解離性アミノ酸残基。——は13,15ダイシス型を取った時の構造、-----は静電的相互作用を示す。AH, BH はいずれもカルボキシル基, ^+HK はプロトン化したリジン残基を示す。

図3. 全トランス型BRの中性における一連の光化学反応中間体と、そのレチナルPSBの推定構造及び解離性アミノ酸残基との相互作用の模式図。(a) 中性暗状態のBR。(b) J, K, KL。(c) L。(d) M。酸性での光反応については、(b') 酸性暗状態のBRと(c') 酸性での光反応生成物である9シス型BRについてのみ示す。

している(図2)。

暗状態では、全トランス型BRと13,15-ダイシス型BRとが熱平衡の状態で存在している。後者はプロトンポンプを行ない得ない。リジンからプロトンが解離するようなアルカリ性領域での分光滴定の結果は、全トランス型BRのPSBは、レチナルを結合しているLys216とは別の $pK_a=9.6$ のプロトン化リジン残基によって影響されているが、13,15-ダイシス型では影響を受けていないことを示す⁶¹。プロトン化リジンアニオンの双極子は、異性化によって場所の大きく変わるPSBの近くにあり、全トランス型のときにのみ相互作用していることになる。

pH12以上の強いアルカリ性になると、BRの吸収スペクトルは大きくブルーシフトして、その λ_{max} は480nm付近にくる。同じようなブルーシフトは、レチナルの環部分をフェニール基に代えて蛋白質部分

との相互作用を減少させたBRのアナログではpH7付近、ホスホリビドをなくしたBRではpH2付近で起こる⁷¹。ブルーシフトに関与する残基は、中性でもプロトンがついているカルボキシル基($-\text{COOH}$)を持ったアスパラギン酸(後出)と想定される。そうとすれば、中性でも解離している A^- とは別の、BHとして現した残基が解離することによってブルーシフトが起こったことになる。このように異常に高いアスパラギン酸の pK_a (後出)は、リビド、レチナルを加えた疎水性環境によって維持されている。

4. 光反応とプロトンの放出

光はレチナルを13-シス型に異性化させる。その結果PSBと A^- との静電的な相互作用(図3a)が切られ、PSBは孤立したカチオンとして、もとのBRに対して大きくレッドシフトしたスペクトルを示すようになる(図3b)。ピコ秒からナノ秒に至る中間体J, K, KLがこれにあたると考えられる。

BRを酸性にしていられる青色のBR誘導体は、Kなどのブルーシフトした中間体と同じように蛋白質部分との電気的な相互作用を失っている(図3b')。これを赤色光で照射するとレチナルの異性化が起こり、560nmに λ_{max} をもつ11シス型、495nmに λ_{max} をもつ9シス型のレチナルをもつBR誘導体に変わる(図3c')。これらの異性体では $C=N$ 結合がシン型のコンフィギュレーションをとらないかぎり、N-Hは元と逆の方向を向くことになる。レチナルの電子状態に関する理論計算を適用すると、この結果はPSBが、 A^- とは別の位置にある B^- というマイナスの電荷と相互作用しているためと解釈される。 B^- は光による異性化の前にはプロトン化してBHの形になっていたか、レチナルに影響を及ぼさない位置になったもので、一応前者と解釈しておく、このBHというのは、前章で提示したBHと同じか、異常に高い pK_a をもつという点では似たものと考えている。

中性での光反応サイクルで、蛋白質側の残基との電気的な相互作用を通じて作られる遷移状態にあたる中間体としては、もとのBRの λ_{max} に近い550nmに λ_{max} をもち、マイクロ秒オーダーの時間領域で存在するLが最初であろう。1985年に、Engelhardらはフーリエ変換赤外スペクトルを使って、光反応に伴うアスパラギン酸の解離状態の変化に基づき、Lの生成はアスパラギン酸の $-\text{COOH}$ からのプロトンの解離を伴うことを示した(図3c)。解離したプロトンは別のアミノ酸残基にリレイされ、膜の外に出て行くものとされている。解離したアスパラギン酸のカルボキシル

基はプロトンに対する強い親和性を持ち、直ちに PSB のプロトンを奪って -COOH の形に戻る。これが **M** である (図 3b)。

5. プロトンの取り込み

BR の光反応産物の共鳴ラマンスペクトルを測定すると、極めて寿命の長い、**L** とよく似た振動バンドを含むスペクトルを与える中間体が、アルカリ性で生じることが観察される⁹⁾。ただ、この中間体の $\text{C}=\text{C}$ の伸縮振動の波数はもとの BR のそれと極めて近く、**L** のそれではない。その意味でこの中間体は **L'** と名付けられた。レチナル蛋白では $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動の波数の増加と λ_{max} の減少が直線的な相関関係をもっていることは、本誌でも既に論じられている⁹⁾。従って、**L'** の吸収スペクトルはもとの BR のそれとあまり変わらないことが期待される。**L'** はアルカリ性で極めて長い寿命を持つものに対して、**L** の寿命はアルカリ性で逆に短くなることも大きな違いである。pH に依存した吸収スペクトル、共鳴ラマンスペクトルの解析から、**L'** は **L** と同じようにアスパラギン酸のカルボキシル基と相互作用していると考えられる。

1986年に Drachev らは、プロトンを外から取り込んでもとの BR に戻る直前の中間体は、BR に極めて近い λ_{max} をもつことを示し、**P** と名付けた。Kouyama ら¹⁰⁾はさらに、この中間体はアルカリ性できわめて安定化されることを示した。いろいろの証拠から、上述の **L'** もこの **P** にあたるものと思われる。**P** というものはプロトンを取り込むための準備の整った中間体である。BR の共鳴ラマンスペクトルに現れる数多くの振動バンドの解析は、Mathies らのグループ¹¹⁾によりほぼ完全に解明されたが、**L** や **L'** に特徴的に現れる幾つかのバンドについては未解決のままである。現在分子研の北川禎三教授らとの共同で研究を進めている。

6. ハロロドプシンとの比較

好塩菌には BR によく似たレチノイド蛋白質で、BR の場合のプロトンとは逆に外側から内側へマイナスの電荷をもつ塩素イオンを運ぶハロロドプシン (以下 HR と略する) がある。これについては本誌でも解説されているが¹²⁾、相補的な意味で BR のプロトンポンプの解明にも資することがあるので、ここでもその点からふれてみたい。BR では、プラスの電荷を持つ PSB との電気的な相互作用によって、カルボキシル基 (図 2 の BH) にマイナスの電荷 (B^-) をもたらしように解離させることが、プロトンポンプの一番に重要な点として提示された。HR の場合には基質であ

る塩素イオン自身がマイナスの電荷を持っている。HR の光反応サイクルは塩素イオンの有無により著しく変わり、塩素イオンのある時にのみ、BR の **L** に似た共鳴ラマンスペクトルを与える HR520 が生成する⁸⁾。既に述べたように、BR の **L** では、PSB がアスパラギン酸残基の脱プロトンしたカルボキシル基 (-COO^-) と相互作用をしている。HR520 の生成に際しては、13 シス型に反転した PSB と相互作用し得る位置に、新たに塩素イオン (Cl^-) が固定されたと考えられる。

一方暗中での HR には、塩素イオンを特異的に結合するサイトがある。ここに塩素イオンが結合すると、10nm ほどの長波長側への可視部の吸収スペクトルのシフトが起こる。このシフトは HR が全トランス型をとるときに限られている。HR における塩素イオンの結合をプラス電荷が 1 個減少したという意味でとらなれば、BR でのアルカリ性におけるリジン残基からのプロトンの脱離と、それに伴うレッドシフトと同じ状況になる。BR の場合のカルボキシル基 (A^-) (図 2) はリジン残基との相互作用を失うことによって、レチナル部分の吸収スペクトルに影響を与える。HR の場合には、結合した塩素イオンが BR の A^- にあたる役割を演じていると考えている。共鳴ラマンスペクトルでの $\text{C}=\text{N}$ 伸縮振動の波数の解析から、暗状態での塩素イオンに特異的な結合は、PSB との水素結合によるものではないことが示されている。BR においては解離したチロシンが PSB と水素結合で結ばれており、PSB の異性化と共にプロトン化される。図 1 に示した BR の模型図で、f セグメントにある 2 個のトリプトファンに挟まれ、かつプロリンの隣に位置する Tyr185 は、フェニールアラニンに代えるとプロトンポンプ活性が減少する²⁾。同じようなチロシンは HR にもある。これらのことは PSB と水素結合で結ばれた残基は、 A^- であらわされたカルボキシル基 (-COO^-) ではないことを示唆する。

図 1 に示した BR と HR のアミノ酸配列を眺めると、c セグメント、d セグメント共に疎水性アミノ酸が多く、しかも互いにきわめてよく似ている。その中で c セグメントにある 2 個の Asp は BR に特異的で、HR ではいずれも電荷のないアミノ酸残基に変わっている。このうち Asp96 は隣の d セグメントにある Asp115 とカルボキシル基同士で水素結合を作るのに都合のよい位置にあり、異常に高い pK_a を持ったアスパラギン酸の一つに相当すると思われる。HR の Asp96 にあたる場所はより小さく電荷もない Ala に変わっていて、すぐ近くにある Gly と共に、光で異性

化した PSB に誘導されて、塩素イオンの填まるポケットである可能性を示唆している。また Asp82 (HR では Thr) は、隣の d セグメントにあるやはり BR に特異的な Lys129 (HR では Thr) とあわせて、上に述べてきたリジン-カルボキシル基のカップルを作っていると考えられる。

このようにみえてくると Asp96 がプロトン放出をにない、Asp85 を囲むシステムがプロトンのとりこみに関与するようにみえる。これはプロトンが放出されるのが N 末端を含む側であるということと一見反しているようにみえるが、位置的な関係だけで議論してよいものかどうかは分からない。

7. ペクトル性機構

これまでのべてきたのはプロトンの放出と取り込みについてである。これを一方向に定める機構について、アミノ酸残基間の橋渡しだけを考えるメカニスティックな立場だけではなく、熱力学的な立場からの考察も必要であろう。ペクトル性を持った BR のプロトンポンプ機能は、pH9 以上ではなく、代わりに方向性を持たないいわゆるボーアプロトンの放出がおこるようになるといわれる^[3]。よく似た共鳴ラマンスペクトルを示す L, L' (P) という二つの中間体が、シッフ塩基からプロトンがはずれた M を挟んで現れることと共に、 pK_s を 9 付近にもつ残基の役割がポイントのように思われる。その意味で今のところ図 3 に示した L, M には書き込んでいない $pK_a=9.6$ のリジンのもつ役割の解明が必要である。

プロトン輸送の機構解明には未だ道が遠く、今はその装置の一部をかいまみたということと思われる。プロトンポンプとしては、ATP の加水分解の自由エネルギーにカップルする H^+ -ATPase によるもの、酸化還元電位を使うものなどがあり、光の場合と併せて何か共通な機構があるはずである。どのような意味で共通性を持つかが楽しみなことである。またポンプではないがプロトンのとりこみを伴うロドプシンのようなリセプターの機構の解明にも、連なって来ると考え

る。

以上の研究に当たってお力添えを頂いた京大吉澤透教授をはじめ分子研北川禎三教授、早大鈴木英雄教授、ハワイ大 R. S. H. Liu 教授、及び各研究室の皆様方に感謝します。なお本研究の一部は、文部省の科学研究費 (62470151) によっていることを付記する。

文 献

- 1) BR についてのより一般的な解説は、a) を、やや専門的な解説は b), c) を参照されたい。これらに含まれる文献は本誌の性格から省いている。
a) 前田章夫 (1986) 視覚。化学同人。
b) Maeda, A. (1987) *Primary Processes in Photobiology* (ed. by Kobayashi, T.) pp. 203. Springer.
c) Smith, S. O., Lugtenburg, J. & Mathies, R. A. (1985) *J. Membrane Biol.* 85, 95.
- 2) Mogi, T., Stern, L. J., Hackett, N. R. & Khorana, H. G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84, 5595.
- 3) Blanck, A. & Oesterhelt, D. (1987) *EMBO J.*, 6, 265.
- 4) Dohlman, H. G., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1987) *Biochemistry*, 26, 2657.
- 5) Kraut, J. (1977) *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 331.
- 6) Maeda, A., Nakagawa, M. & Kitagawa, T. submitted.
- 7) Baribeau, J. & Boucher, F. (1987) *Biochem. Biophys. Acta*, 890, 275.
- 8) Ogura, T., Maeda, A., Nakagawa, M. & Kitagawa, T. (1987) *Primary Processes in Photobiology* (ed. by Kobayashi, Y.) Springer, pp. 233.
- 9) 垣谷宏子 (1984) 生物物理 24, 36.
- 10) 神山 勉, 神山 (那須田) 明生, 池上 明 (1987) 生物物理 27, S122.
- 11) Smith, S. O., Braiman, M. S., Myers, A. B., Pardo, J. A., Courtin, J. M. L., Winkel, C., Lugtenburg, J. & Mathies, R. (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3108.
- 12) 向畑孝男 (1987) 生物物理 27, 13.
- 13) Li, Q., Govindjee, R. & Ebrey, T. G. (1986) *Photochem. Photobiol.*, 44, 515.

まえだ あきお

阪大理・化学1956年卒。修士は赤堀研。博士は名大上研でそれぞれ蛋白、核酸の化学を学んだ。名大時代は生物物理、分子生物学の発生期でもあり、大沢研の方から感化を受けた。東大今堀研助手を経て、1969年より現職。吉沢教授のもとでロドプシンの分野に入り、ぴったりしたものを見つけた感じがします。貧乏暇なしで趣味を培う余裕はなく、バッハの受難曲をききながら想を練ることのできる職を感謝しています。

☎075-751-2111 内線4211