

## 業績紹介：バクテリオロドプシンの発色団光異性化に連動したタンパク質初期応答

水野 操 (阪大院理・A03 班計画研究分担者)  
水谷泰久 (阪大院理・A03 班計画研究代表者)  
神取秀樹 (名工大院工・総括班研究協力者)

論文題目: "Picosecond Time-Resolved Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy of Bacteriorhodopsin: Primary Protein Response to the Photoisomerization of Retinal"

著者: Misao Mizuno, Mikihiro Shibata, Junya Yamada, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani

雑誌巻号: *J. Phys. Chem. B* **113**, 12121-12128 (2009)

バクテリオロドプシン (BR) は、好塩菌紫膜上にある光駆動プロトンポンプタンパク質である。BR の発色団はレチナルであり、光吸収により全トランス型から 13 シス型に異性化する。これが引き金となって、タンパク質部分の構造変化が誘起され、タンパク質内をプロトンが輸送される。ポンプ機構を明らかにするためには、光に応答する発色団および周辺のタンパク質構造が、どのように連動して変化していくのかダイナミクス観測が必要不可欠である。我々は、共鳴ラマン効果を利用して、タンパク質部分に含まれているトリプトファン (Trp) やチロシン (Tyr) 側鎖に由来する振動スペクトルを、ピコ秒の時間分解能で観測し、タンパク質の初期構造ダイナミクスを調べている。本研究では、BR の光サイクル初期過程における、レチナル発色団の構造変化に連動した、発色団周辺構造変化をピコ秒領域で捉えた。

試料は、BR を含む紫膜を緩衝液に懸濁し、超音波破碎した溶液をもちいた。室温にて、BR の光反応を開始させるための可視ポンプ光パルス (565 nm) と、タンパク質構造変化を検出するための紫外プローブ光パルス (225 nm、238 nm) をもちいて時間分解共鳴ラマン測定を行った。

225 nm のプローブ光を使用して測定した時間分解スペクトルには、Trp 側鎖の振動バンドの強度変化が明確に観測された。一方、プローブ光波長 238 nm で測定した時間分解スペクトルには、Trp、Tyr 側鎖それぞれの振動バンドの変化が観測された。双方の条件において、装置応答時間内でおこるスペクトル変化と、時定数 30 ps で起こるスペクトル変化があることが明らかになった。また、Trp および Tyr 側鎖の振動バン

ドのスペクトル変化には、異なる時間挙動を示すものがあることがわかった。これは、少なくとも 2 つの Trp 残基と少なくとも 2 つの Tyr 残基の構造変化がスペクトル変化に寄与していることを示唆している。

ピコ秒時間領域において、光励起した発色団は、J、K、および KL と呼ばれる初期中間体へ段階的に緩和する。光励起直後のスペクトル変化は、発色団の異性化により生成する J 中間体から K 中間体におけるタンパク質構造変化に由来し、30 ps の時定数をもつスペクトル変化は、KL 中間体の生成に起因すると考えられる。これらの中間体において、レチナル発色団は、ポリエーテル鎖部分およびタンパク質と結合しているシッフ塩基部分に構造変化が起こることが報告されている。このため、観測されたスペクトル変化は、J、K、および KL 中間体におけるレチナル発色団のポリエーテル鎖およびシッフ塩基周辺に位置する Trp 残基 (Trp86、Trp182) および Tyr 残基 (Tyr57、Tyr185) の構造変化に起因すると考えられる。K 中間体におけるタンパク質構造を表す 5 ps の時間分解スペクトルには、Trp 残基のインドール環の配向角変化、および Tyr 残基の水素結合強度、プロトン供与性の増加を示すスペクトル変化が観測された。これらは、レチナルの異性化に伴う Trp182 残基の環の配向変化と Tyr57、Tyr185 残基の水素結合変化と帰属した。KL 中間体のタンパク質構造を表す 100 ps の時間分解スペクトルには、Trp 残基周辺の疎水性相互作用の減少と、Tyr 残基の水素結合弱体化に由来するスペクトル変化が観測された。これらは、発色団周辺の水素結合ネットワークにより引き起こされた Trp86 残基の疎水性減少と Tyr57 または Tyr185 残基の水素結合強度の変化と帰属した。

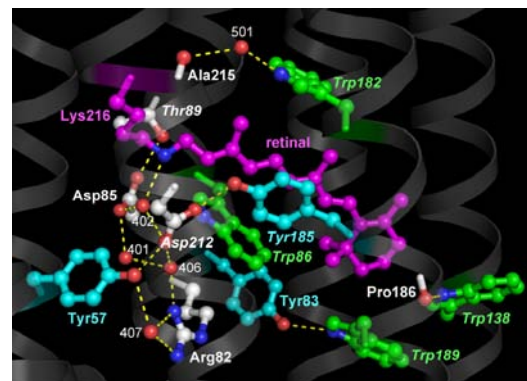


図 レチナル発色団周辺の BR の結晶構造

## 第 7 回ミニ公開シンポジウム 報告

清水啓史 (福井大学・医・分子生理・A03 班)

本特定領域研究の第 7 回ミニ公開シンポジウム「イオンチャネルの構造ダイナミクス II」が、平成 21 年 8 月 31 日、9 月 1 日に、越前町生涯学習センター越前分館(福井県丹生郡越前町)で開催された。本シンポジウムは、本特定領域研究内での班員間の共同研究を促進することを目的として、昨年度開催された第 3 回ミニ公開シンポジウム「イオンチャネルの構造ダイナミクス」の後をうけて開催されたものである。

最初に、老木成稔(福井大)氏から、イオンチャネル研究における未解決問題、イオン透過と開閉機構についての説明が行われ、共同研究の方向性が示された。次に古谷祐詞氏(A01 班)より全反射赤外分光法の原理と応用例、実際に KcsA チャネルに適用したデータについて説明がなされた。楯真一氏(A03 班)からは NMR 法によるドメイン配向計測の具体例とその原理が説明され、編田宏一氏より KcsA チャネルのサンプル調製と NMR スペクトルデータの解説があった。炭竈享司(分子研)氏からは開構造カリウムチャネルを用いたイオン透過 MD シミュレーションの結果について説明された。休憩をはさんで、高田彰二(京都大)氏から、F1-ATPase や myosin V といった蛋白質についての、粗視化モデルを用いた計算機シミュレーションの応用例が解説された。浜田省吾(東工大)氏からは T 字型分岐モチーフを用いた DNA ナノ構造の作製法について解説があり、活発な質疑応答がなされた。最後に水谷泰久(A03 班班長)より、共鳴ラマン分光法の原理、主鎖構造ダイナミクス測定への応用例と KcsA チャネルに対する応用の可能性について説明が行われ、1 日目を終了した。

2 日目の始めに出羽剛久(A02 班)氏よりつなぎとめ脂質二重膜の形成法、適用例、KcsA チャネルを導入した AFM 像と、形成された脂質二重膜の性質の計測



データが示された。次に山口祥一(A02 班)氏よりヘテロダイン検出二次非線形分光法の原理が説明され、界面の荷電状態と水の配向の相関についての計測データが示された。また、細井晴子(A02 班)氏より蛍光蛋白質(KAEDE)における蛍光エネルギー移動に関する研究データ、およびヘテロダイン検出二次非線形分光法を用いた KcsA チャネルのトポロジー計測データについて解説があった。最後に清水啓史(A03 班)氏より、KcsA チャネルを中心とした構造ダイナミクス研究の動向について、および石橋孝章(A02 班)氏、山方啓(A02 班)氏との共同研究進捗状況の報告があり、意見交換のあとシンポジウムは終了した。

全般に活発な質疑応答がなされ、実験を担当する学生さんの参加が増えたことで活気のある研究会となりました。また、宿泊所を共にし、深夜までゆっくり議論する時間が得られたことは大変有意義でした。ご支援いただきました藤井先生、水谷先生、特定領域事務局、および福井大学の関係者に感謝いたします。

8 月 31 日(月)	座長: 神取秀樹(名工大院工)
14:30	「KcsA チャネルの透過—ゲーティング機構研究の展望と戦略」○老木成稔、清水啓史、岩本真幸、松木悠佳、今野卓(福井大学・医・分子生理)
15:00	「“KcsA チャネルに対する赤外分光の狙い”は達成されたであろうか?」○古谷 祐詞、清水啓史、浅井祐介、老木成稔、神取 秀樹(名工大院工・分子研・福井大医)
15:30	「NMR を用いた KcsA イオンチャネル開閉に伴う分子形態変化観測・試料調製の最適化と NMR スペクトル解析」編田宏一、○楯 真一(広島大・理・数理)
16:00	「K <sup>+</sup> チャネルにおけるイオン透過の微視的機構」○炭竈享司(分子研)
16:30	休憩
16:45	「計算機実験による蛋白質構造変化と分子機械作動原理の探求」○高田彰二(京都大学・理・生物物理)
17:15	「T 字型核酸分岐を用いた各種 DNA ナノ構造の作製」○浜田省吾、村田智(東工大・院・知能システム科学)
17:45	「紫外共鳴ラマン分光法によるタンパク質の構造解析」○水谷泰久(大阪大学)
9 月 1 日(火)	座長: 南後守(名工大・未来材料)
9:00	「膜タンパク質を再構成した平面脂質二分子膜の構築と原子間力顕微鏡観察」○出羽剛久、南後守(名工大・未来材料)
9:30	「新しい界面選択的ヘテロダイン検出二次非線形分光」○山口祥一(理化学研究所)
10:00	「ヘテロダイン検出二次非線形分光法の膜タンパク質トポロジー決定への適用」○細井晴子(東邦大・理学部)
10:30	「KcsA カリウムイオンチャネルの構造ダイナミクス研究の現状」○清水啓史、岩本真幸、今野卓、老木成稔(福井大学・医・分子生理)
11:00	ディスカッション