

ハロロドプシン光反応中間体のタンパク質構造ダイナミクス観測

水野 操¹, 下尾 祐未¹, 神取 秀樹², 水谷 泰久¹

阪大院理¹, 名工大院工²

【序論】 ハロロドプシン (HR) は、光駆動イオンポンプである。レチナール発色団の光異性化がトリガーとなり、さまざまな中間体を経由するサイクル反応[1]の間に、塩化物イオンを細胞外から細胞内へポンプする。レチナールは、タンパク質中に含まれるリジン残基とプロトン化シッフ塩基を介して結合している。HR では、シッフ塩基近傍にアニオン結合サイトがある。この結合サイトには、塩化物イオンの他にもさまざまなアニオンが結合する。レチナール発色団の電子状態は、結合するアニオンの影響を受け、吸収スペクトルの吸収極大波長や C=C 伸縮振動の振動数が変化する。われわれは、これまでに、塩化物イオンの移動開始前のピコ秒時間領域では、レチナールの異性化に対するタンパク質部分の応答速度が、結合サイトにあるアニオンの影響を受けないことを明らかにした[2]。本研究では、HR 内を塩化物イオンが移動するナノ秒からマイクロ秒領域において時間分解共鳴ラマン測定を行い、タンパク質構造ダイナミクスについて、結合サイトにおけるアニオン依存性を調べた。

【実験】 測定試料には、*N. pharaonis* 由来の HR をバッファー (pH 7.0) に可溶化させたものを用いた。塩化物イオン結合形 (purple 形、 $\lambda_{\max} = 578$ nm)、アニオン非結合形 (blue 形、 $\lambda_{\max} = 602$ nm)、およびギ酸イオン結合形 ($\lambda_{\max} = 563$ nm) の 3 種類の試料溶液をバッファー調製により作製した。時間分解共鳴ラマン測定は、円筒状セルに試料溶液をフローさせ、ポンププローブ法 (ポンプ光 532 nm、プローブ光 475 nm、パルス幅約 20 ns) により行った。

【結果と考察】 図 1 に purple 形 HR の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。一番上のスペクトルは、プローブ光のみで測定したスペクトルで、未反応状態の HR におけるレチナール発色団のスペクトルに対応する。その他のスペクトルは、ポンプ光照射により現れる光反応中間体における発色団の時間分解共鳴ラマンスペクトルである。ポンプ光照射直後の 50 ns のスペクトルでは、972, 1198, 1532 および 1622 cm^{-1} にバンドが現れた。これらのバンドは時間とともに減衰し、代わりに 1012, 1166, 1188, 1200, 1550 および 1651 cm^{-1} にバンドが出現し、その強度が増大した。

はじめに現れたバンドは、出現の時間帯から K 中間体 ($\lambda_{\max} = 570$ nm [1]) のバンドであると考えられる。K 中間体のスペクトルは、HR と同じ微生物型ロドプシンであるバクテリオロドプシン (BR) において観測されている[3, 4]。BR では、K 中間体

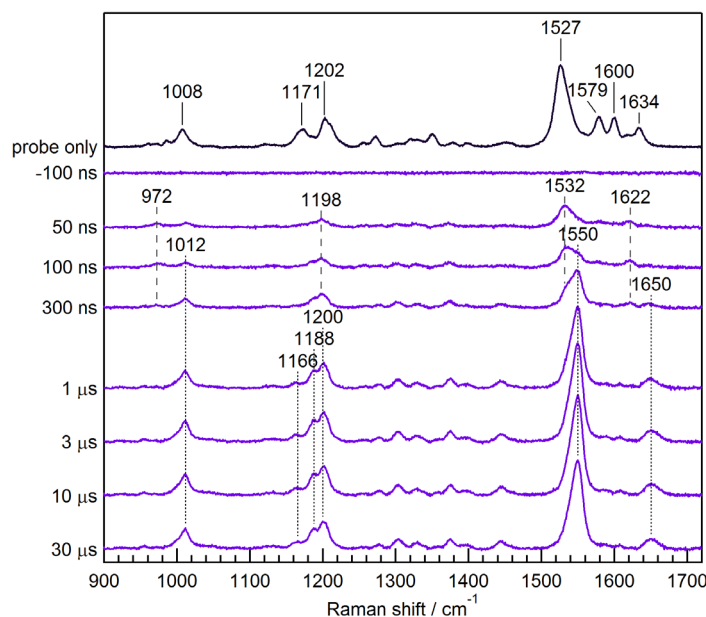


図 1. purple 形 HR の時間分解共鳴ラマンスペクトル。

の C=C 伸縮振動バンドは 1517 cm^{-1} に観測され、未反応状態のバンド (1528 cm^{-1}) よりも低波数側に現れる。今回、HR では発色団の C=C 伸縮振動バンドが、未反応状態では 1527 cm^{-1} に、K 中間体では高波数側の 1532 cm^{-1} に観測され、BR とは逆の関係がみられた。K 中間体の吸収極大波長は、未反応状態のそれと比較して、BR では長波長側 ($570 \rightarrow 590\text{ nm}$) に、HR では短波長側 ($578 \rightarrow 570\text{ nm}$) にシフトする。したがって、今回の観測結果は、レチナールタンパク質について知られている C=C 伸縮振動の振動数と吸収極大波長の相関関係を満たしていることがわかる。

図 1 のマイクロ秒領域で観測されたスペクトルは、既報のスペクトル[5, 6]との比較から purple 形 HR の L 中間体 ($\lambda_{\text{max}} = 520\text{ nm}$ [1]) に帰属できる。そこで時間分解ラマンスペクトルから、L 中間体の生成ダイナミクスやレチナール発色団周辺の構造を議論する。図 2 に、結合するアニオンの種類の異なる HR の時間分解共鳴ラマンスペクトルの C=C および C=N 伸縮振動バンド領域の拡大図を示す。図 2(a) の purple 形と比較して、(b) の blue 形および(c) のギ酸イオン結合形では、異なるスペクトル変化を示すことがわかった。blue 形では、purple 形で観測されるような K 中間体のバンドは観測されなかった。また L 中間体では、過去の報告[6]どおりに 2 本の C=C 伸縮振動バンドが観測された。これらは、結合サイトにアニオンがないことで、発色団の構造が purple 形とは異なっていることを示唆している。ギ酸イオン結合形では、K および L 中間体のスペクトル形状は、purple 形のものとよく一致していた。しかしながら、 $10\text{ }\mu\text{s}$ 以降の遅延時間では、 1562 cm^{-1} に新たに C=C 伸縮振動バンドが出現した。ギ酸イオン結合形 HR には、purple 形 HR では現れない M 中間体が生成する[7]ため、 1562 cm^{-1} のバンドは M 中間体のバンドと帰属した。この C=C 伸縮振動バンドの振動数は、BR の M 中間体 [4]ともよく一致していた。バンド強度の時間変化から、L 中間体の生成時間は、purple 形、blue 形およびギ酸イオン結合形で、それぞれ 650 , 750 および 390 ns と求められた。結合サイトにあるアニオンの効果は、ピコ秒領域でのレチナールの異性化に対するタンパク質の応答速度に現れなかった[2]が、ナノ秒以降の塩化物イオンの移動が起こる L 中間体の生成過程の速度に影響を与えることがわかった。

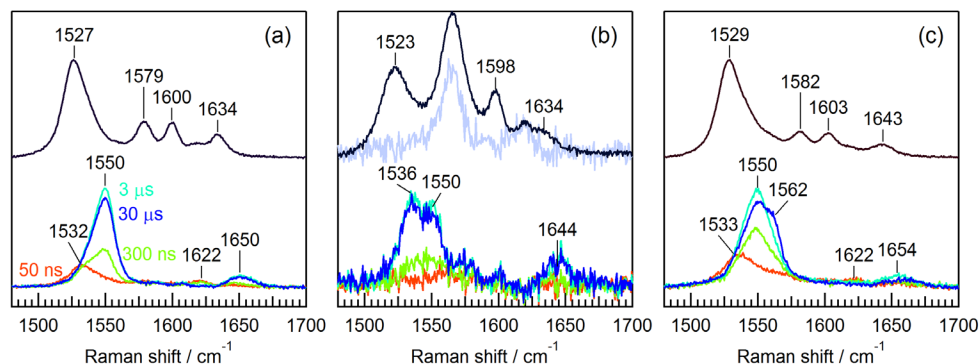


図 2. HR の時間分解共鳴ラマンスペクトルの結合アニオンの影響. (a) purple 形, (b) blue 形, (c) ギ酸イオン結合形. 各スペクトルの上段が未反応状態のスペクトル, 下段が時間分解スペクトル (遅延時間: 橙 50 ns , 緑 300 ns , 水色 $3\text{ }\mu\text{s}$, 青 $30\text{ }\mu\text{s}$). (b) 上段、 1565 cm^{-1} 付近のバンドは、遊離したレチナール (薄青色) のバンドである.

【参考文献】

- [1] I. Chizhov and M. Engelhard, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1600.
- [2] 下尾ら, 第 6 回分子科学討論会, 2012, 4A05.
- [3] R. Lohrmann and M. Stockburger, *J. Ramam Spectrosc.* **1992**, *23*, 575.
- [4] S. Smith, et al., *J. Membr. Biol.* **1985**, *85*, 95.
- [5] J. B. Ames, et al., *Biochemistry* **1992**, *31*, 12546.
- [6] S. Gerscher, et al., *Biochemistry* **1997**, *36*, 11012.
- [7] K. Mevorat-Kaplan, et al. *Biochemistry* **2005**, *44*, 14231.

共鳴ラマン分光法による蛍光タンパク質 Dronpa の

発色団構造の研究

東野飛鳥¹, 水野操¹, 水谷泰久¹

阪大院理¹

【序】 蛍光タンパク質 Dronpa は、蛍光を発する明状態 B state と発しない暗状態 A₂ state との間でフォトクロミズムを示す (図 1)。また、これらに加えて無蛍光性の A₁ state の存在も報告されている[1]。A₁ state は中性条件で B state と共にわずかに存在し、酸性条件で存在比が増す。各状態での発色団の幾何構造は、B state ではシス形、A₂ state ではトランス形であるとわ

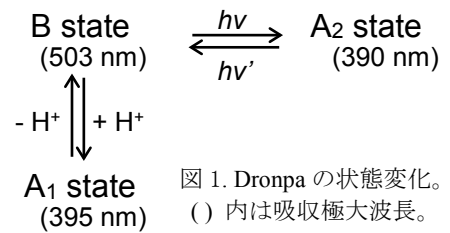


図 1. Dronpa の状態変化。
() 内は吸収極大波長。

かっており、A₁ state の発色団はシス形であると推測されている。発色団のフェノール部分は、B state では脱プロトン化、A₁ state と A₂ state ではプロトン化していると考えられている。光変換機構を明らかにするためには溶液試料での詳細な構造解析が必要である。共鳴ラマン分光法はタンパク質中の発色団構造を調べるのに適しているが、Dronpa は強い蛍光を発するため、可視共鳴ラマンスペクトルの測定は難しく、これまでに報告例はなかった。本研究では、Dronpa の発色団構造に関する議論をするために、適切なプローブ光の波長を探索し、かつ蛍光のバックグラウンドをスペクトル解析により除去することでラマンスペクトルの観測を試みた。

【実験】 Dronpa は大腸菌中で発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。B state から A₂ state への光変換にはアルゴンイオンレーザーの波長 514.5 nm の光を用いた。可視共鳴ラマンスペクトルの測定には波長 400 nm および 561 nm の光を用いた。蛍光によるバックグラウンドは波長のべき関数を用いて除去した。

【結果と考察】 波長 400 nm のプローブ光を使用することで、その波長付近に吸収極大波長をもつ、Dronpa の A₁ state と A₂ state の可視共鳴ラマンスペクトルを観測した。その結果を図 2 に示す。二つの状態のスペクトルには、発色団構造の違いを反映する差が見られた。特に、A₂ state においてのみ 1145 cm⁻¹ にバンドが見られた。発色団モデル化合物に関する研究では、トランス形のラマンスペクトルでのみ 1125 cm⁻¹ 付近にバンドが現れることが報告されている[2]。これらの結果から、A₁ state がシス形の発色団を持つという推定を裏付けると共に、タンパク質 Dronpa 中の発色団についても、1145

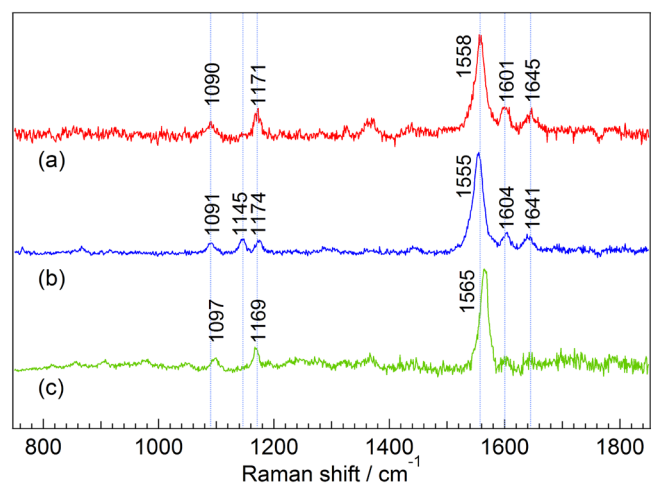


図 2. Dronpa の A₁ state(a)及び A₂ state(b)と GFP(c)の可視共鳴ラマンスペクトル (プローブ光の波長は 400 nm)。ベースライン補正を行い蛍光の寄与を除いた。

cm^{-1} のバンドがそのシス形/トランス形を区別するマーカーバンドとして利用できることが明らかになった。また、軽水緩衝液から重水緩衝液に置換することによって、両スペクトルの $\text{C}=\text{N}$ 伸縮振動バンドは共に低波数側にシフトした。これは、 A_1 state、 A_2 state が共に発色団中に交換しうるプロトンをもつことを示唆する。さらに A_1 state と B state との酸塩基平衡を pH 4-10 において調べたところ、pH に依存した A_1 state のスペクトル変化は一段階で起こり、 pK_a は 5.0 と求められた。この値は GFP について求められている値 (8.3) [3] とは大きく異なり、発色団の周辺環境の違いを反映している。

波長 561 nm のプローブ光を用いて B state Dronpa および GFP の前期共鳴ラマンスペクトルを測定した。その結果を図 3 に示す。B state Dronpa と GFP のスペクトルを比較すると、 1500 cm^{-1} までの波数領域のスペクトルは互いによく似ていた。一方、 $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ の波数領域は、相対強度が大きく異なっていた。特に、 1540 cm^{-1} と 1570 cm^{-1} 付近のバンドの強度比が大きく異なっていた。B state のこの特徴は、GFP-S65T 変異体のスペクトル[4]とよく似ている。GFP-S65T 変異体は脱プロトン化した発色団を持つことが知られており、このスペクトルの類似性は B state の発色団が脱プロトン化していることを示唆している。また、図 3(a) のスペクトルには 1145 cm^{-1} 付近に幾何構造を反映するマーカーバンドが観測されなかったことから、B state の発色団はシス形であることが明らかになった。

本研究では、蛍光タンパク質 Dronpa の共鳴ラマンスペクトルの観測に初めて成功し、それをもとに各状態における発色団の構造について議論した。

【参考文献】

- [1] Fron, E. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4870.
- [2] Luin, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 96.
- [3] Ward, W. W. et al. *Photochem. Photobiol.* **1982**, *35*, 803.
- [4] Bell, A. F. et al. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4423.

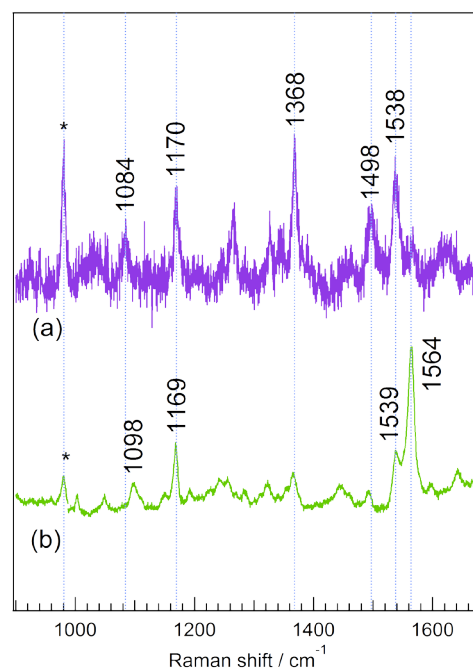


図 3. 蛍光タンパク質の可視前期共鳴ラマンスペクトル (プローブ光の波長は 561 nm)。(a)は B state Dronpa、(b)は GFP のスペクトル。