

研究業績の紹介：プロトンポンプの方向性を決定する内部結合水の構造解析

神取秀樹（名工大、計画研究代表者）

論文 1：Structural changes of water in the Schiff base region of bacteriorhodopsin: Proposal of a hydration switch model.

著者：Taro Tanimoto, Yuji Furutani, and Hideki Kandori.

雑誌巻号：Biochemistry 42, 2300-2306 (2003).

論文 2：Water molecules in the Schiff base region of bacteriorhodopsin.

著者：Mikihiro Shibata, Taro Tanimoto, and Hideki Kandori.

雑誌巻号：J. Am. Chem. Soc. 125, 13312-13313 (2003).

蛋白質は一般に疎水部を水から避ける形で折り畳まれるが、疎水的な内部に水分子が存在する場合もある。これら内部結合水の中には単に空間を充填するだけでなく、機能に重要な役割を演ずる水分子の存在が考えられている。例えば、蛋白質内部の電荷対構造を安定化する水分子や、蛋白質内部でのイオン輸送を補助する水分子がそれである。しかしながら、これらの内部結合水が蛋白質の機能発現過程において具体的にどのような役割を担っているのか、実験的に示された例は皆無である。蛋白質という複雑系において、個々の水分子の変化を実験的に捉えるのが如何に困難かは容易に想像できるだろう。

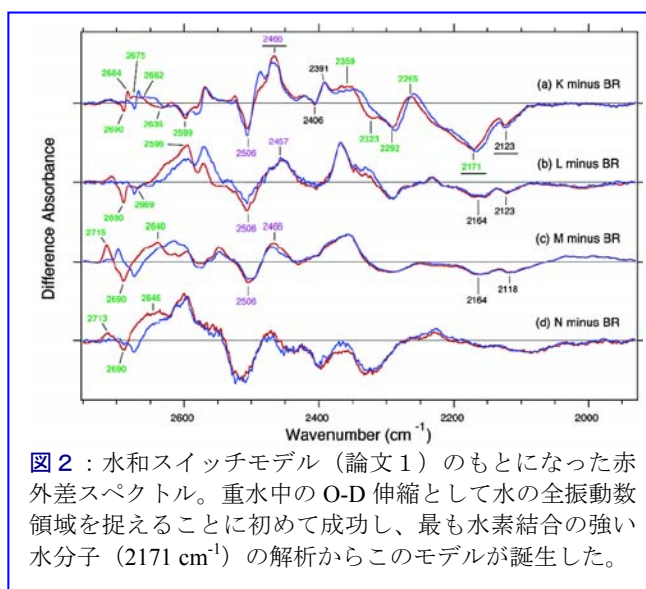


図 2：水和スイッチモデル（論文 1）のもとになった赤外差スペクトル。重水中の O-D 伸縮として水の全振動数領域を捉えることに初めて成功し、最も水素結合の強い水分子（2171 cm<sup>-1</sup>）の解析からこのモデルが誕生した。

内部結合水の役割を考えると、特に興味深いのは濃度勾配に逆らってイオンを輸送する分子ポンプ蛋白質である。能動輸送というエントロピーを減少させるポンプのはたらきに、水分子はどのように関わるのであろうか？ 2003 年のノーベル化学賞が示す通り、膜蛋白質は生命科学の重要な研究対象となっているが、分子ポンプ機構に関わる水分子のはたらきにはほとんど手がつけられていない。

このような現状の中で、著者らはポンプ蛋白質のトップランナーであるバクテリオロドプシン（光駆動プロトンポンプ）を対象として、低温赤外分光を用いた研究を行っている。これまでに、ポンプの方向性を決定するスイッチはレチナルシッフ塩基の部位に局在することを見出し、X線結晶構造解析に先駆けて水分子の水素結合変化を捉えることに成功した。さらに最近では、きわめて強い水素結合を形成する水分子がレチナルの対イオンである Asp85 に水和した水分子の振動であることを明らかにした（論文 2）。そして、プロトン移動前後でのスペクトル解析から 1 個の水分子が水和構造を（Asp85 から Asp212 へ）スイッチさせることでプロトン移動が実現するという「水和スイッチモデル」を提唱している（論文 1）。Grotthus タイプの玉突き的なプロトン移動機構は、バクテリオロドプシンにおいても疎水的な細胞質側で実現していると考えられるが、これだけではプロトンの方向性を説明できない。エネルギー共役部で起こる特異なプロトン移動機構は、物理化学の問題としても実に興味深いものがある。

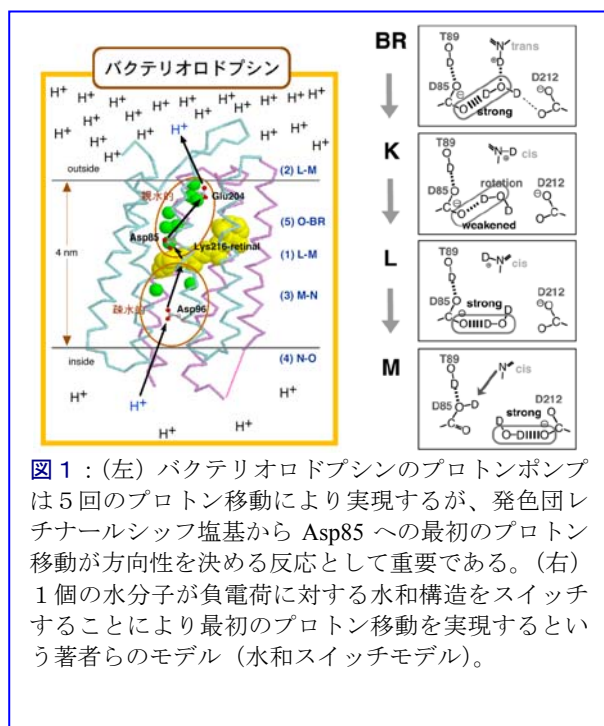


図 1：(左) バクテリオロドプシンのプロトンポンプは 5 回のプロトン移動により実現するが、発色団レチナルシッフ塩基から Asp85 への最初のプロトン移動が方向性を決める反応として重要である。(右) 1 個の水分子が負電荷に対する水和構造をスイッチすることにより最初のプロトン移動を実現するという著者らのモデル（水和スイッチモデル）。

## 研究業績の紹介：視物質ロドプシンの内部結合水

神取秀樹（名工大・工、計画研究代表者）

論文名：Structural changes of water molecules during the photoactivation processes in bovine rhodopsin.

著者：Yuji Furutani, Yoshinori Shichida, and Hideki Kandori.

雑誌巻号：Biochemistry 42, 9619-9625 (2003).

**蛋**白質は一般に疎水部を水から避ける形で折り畳まれ、電荷をもった部分は表面に現れる。疎水的な内部に電荷が存在するときは、酵素の活性中心のように機能に重要な役割を果たすことが多い。このとき、蛋白質の内部結合水が存在すると、内部の誘電率を高め、電荷（対）を安定化できるだろう。このような水分子は、機能発現のための構造変化にも深く関わる可能性がある。その1つの例が我々の視覚や古細菌の光合成にはたらくロドプシン分子である。いずれもレチナールがリシン残基とプロトン化シッフ塩基を形成し、この正電荷を安定化するために対イオン（古細菌の場合アスパラギン酸、視物質ではグルタミン酸）が存在する（図1）。このようなイオン対構造を安定化するため、両者をブリッジする水分子が考えられてきたが、実際に古細菌のバクテリオロドプシンでは1個の水分子がブリッジするだけでなく、さらに2個の水分子が加わってユニークな水素結合構造を形成している。プロトン移動における水分子のはたらきについては、著者がこのニュースレター No. 2 で紹介している。

それでは視物質ロドプシンも同様のブリッジ水をもつのであろうか？ 最近の研究によれば、シッフ塩基の窒素原子と対イオンの酸素原子との距離が固体NMR測定によって4 Å以上と推定された。これは1個の水がイオン対をブリッジするのに適当な距離である。一方、X線結晶構造解析の結果によれば、イオン対の間に水分子の電子密度は観測されなかった

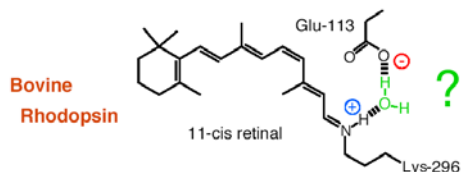


図1：視物質ロドプシンは吸収波長に関係なく同一の発色団をもつ。対イオンが遠ざかるとレチナールの電子励起状態が安定化して、長波長側に吸収が現れることが知られている。蛋白質がイオン対の実効的な距離を制御することで、我々の豊かな色覚が実現しているのだ。

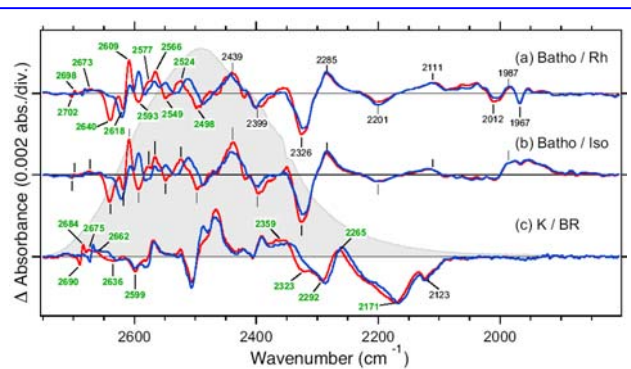


図2：ウシロドプシン(a, b)とバクテリオロドプシン(c)の赤外差スペクトル。液体窒素温度でレチナールの光異性化反応に伴うO-D伸縮振動の領域を、重水中で測定した。赤がD<sub>2</sub>O中、青がD<sub>2</sub><sup>18</sup>O中のスペクトルで、水の同位体効果が示された振動バンドを緑色のタグで示す。灰色の重水のスペクトルと比較して、バクテリオロドプシンが（水素結合の強い）低波数領域に水分子のO-D伸縮振動をもつものに対して、ウシロドプシンでは高い波数領域にしか水分子の信号が観測されなかった。

（窒素と酸素の距離は3.1 Å）。はたして、どちらの結果が正しいのだろうか？

著者らは自らが開拓した振動数領域の低温赤外分光測定によって、この問題を検討した。その結果、図2のようにバクテリオロドプシンの場合と異なり、水素結合の強い領域の水分子は全く観測されなかった。図2は極低温でのバソ中間体に対する結果であるが、ルミ、メタ1、メタ2といった後期中間体においても水素結合の強い水は現れなかった。従って、古細菌ロドプシンのように正負の電荷対をブリッジする水分子は、視物質ロドプシンには存在せず、活性中心でのイオン対構造は異なるメカニズムで安定化されることが示唆された。最新のX線結晶構造解析によれば、対イオンであるGlu113の近傍にはシッフ塩基を橋渡ししない形で水分子の電子密度が観測されている。しかし、この水がGlu113の負電荷と強い相互作用を形成するのであれば、赤外分光において低波数領域に水の信号が観測されるはずである。視物質ロドプシンの活性中心でイオン対がどのように安定化されているのか、そこに水分子がどのように関与するのかといった問題は、さらに検討を要する課題である。著者らはバクテリオロドプシンの場合と同様、変異蛋白質を駆使することで活性中心の水のはたらきをより詳細に解析しようと考えている。

## 研究業績の紹介：塩素イオンポンプの活性中心に存在する内部結合水

神取秀樹（名工大、工・計画研究代表者）

（コア研究：蛋白質のダイナミクス、機能と水和）

論文名： Internal water molecules of light-driven chloride pump proteins.

著者： Mikihiro Shibata, Norikazu Muneda, Kunio Ihara, Takanori Sasaki, Makoto Demura, and Hideki Kandori.

雑誌巻号： *Chem. Phys. Lett.* **392**, 330-333 (2004).

蛋

白質は一般に疎水部を水から避ける形で折り畳まれ、電荷をもった部分は表面に現れる。疎水的な内部に電荷が存在するときは、酵素の活性中心のように機能に重要な役割を果たすことが考えられる。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）の場合、2個の正電荷、負電荷を安定化するように3個の水分子がシッフ塩基領域に存在する（図1）。我々は低温赤外分光を用いた構造解析によって、これらの水分子が極めて強い水素結合環境にあることを見出し、水分子の水和のスイッチがプロトン移動をもたらすモデルを提唱している<sup>1,2</sup>。

古細菌には光駆動塩素イオンポンプとして光エネルギー変換を行うハロロドプシン（HR）も存在する。BRのわずかに1個のアミノ酸置換によって塩素イオンポンプになることから、これまで2つのポンプの構造の類似性が示唆されてきた<sup>3</sup>。実際に最近の結晶構造解析によれば、3個の水分子を含む類似の構造がHRに見出されている（図1）。それでは塩素イオンポンプの水分子はどのような水素結合構造を持ち、機能にどのように関わるのであろうか？我々は今回、BRと同様の赤外分光解析をHRに対して試みた。HRはBRより信号が1桁小さいが、十分な積算を行うことによって高い精度のスペクトルを得ることができた（図2）。

結果はプロトンポンプであるBRとは異なり、水素結合の強い領域に水分子の負の信号は全く観測されなかった。溶液中での中性子回折実験によれば、

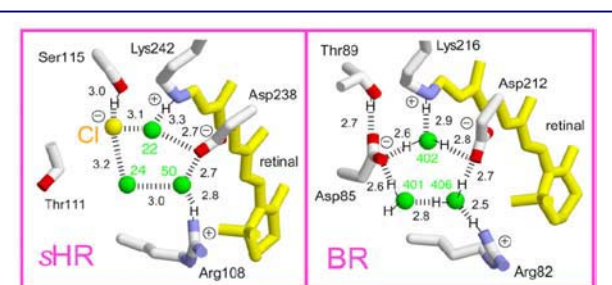


図1：ハロロドプシン（左）とバクテリオロドプシン（右）の活性中心の構造。塩素イオンポンプではプロトン受容体のAsp85がThrに換わって塩素イオンがこの部位に結合する一方、3個の水分子を含んだクラスター構造は両者に共通である。

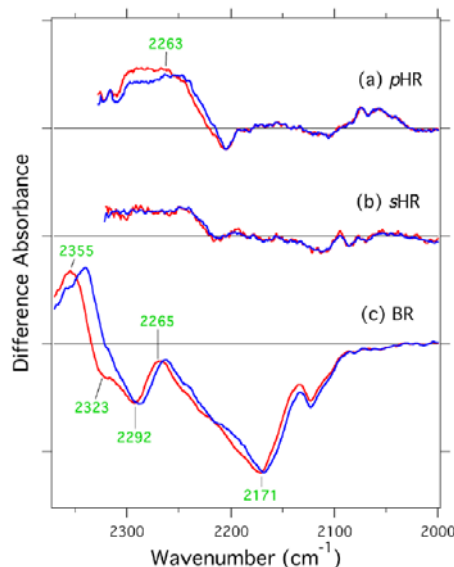


図2：2種類のハロロドプシン(a, b)とバクテリオロドプシン(c)の赤外差スペクトル。極低温でレチナールの光異性化反応に伴うO-D伸縮振動の領域を、重水中で測定した。赤がD<sub>2</sub>O中、青がD<sub>2</sub><sup>18</sup>O中のスペクトルで、水の同位体効果を示された振動バンドを緑色のタグで示す。（水素結合の強い）低波数領域に水分子のO-D伸縮振動が観測されたバクテリオロドプシンとは異なり、ハロロドプシンには水分子の負のバンドが存在しない。一方、ある種のハロロドプシン（pHR）には正のバンドが観測された。

塩素イオンは水分子の2つのO-H基に挟まれるように水和していることから、カルボン酸に対する直線的な水分子の水和とは異なる構造がHR中でも実現しているものと考えられる。一方、ある種のHRで水分子の正のバンドが観測されたという事実は、光吸収によって塩素イオンが水分子と強い水素結合を形成することを示唆する。現在、我々はこのような水分子と塩素イオンとの過渡的な強い水素結合形成が、塩素イオンポンプのための駆動力をもたらすものと考えている。このような作業仮説のもと、シッフ塩基の同位体標識や変異体、異なる陰イオン試料を用いて、HRの後期中間体に対する赤外分光計測を行っているところである。

## 参考文献

1. Tanimoto et al. (2003) *Biochemistry* 42, 2300.
2. Kandori (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 72.
3. Sasaki et al. (1995) *Science* 269, 73.

## 水と生体分子ニュースレター

編集人 後藤祐児； 発行人 桑島邦博

## 発行所 特定領域研究

「水と生体分子が織り成す生命現象の化学」事務局

〒565-0871 吹田市山田丘3-2 大阪大学蛋白質研究所

Tel: 06-6879-8614 Fax: 06-6879-8616

E-mail: ygoto@protein.osaka-u.ac.jp

URL: <http://gagliano.phys.s.u-tokyo.ac.jp:8000/tokutei/index.html>

## 研究業績の紹介：植物の光センサー蛋白質の構造変化をプローブする水分子

神取秀樹（名工大、計画研究代表者）

（コア研究：蛋白質のダイナミクス、機能と水和）

論文 1 : Reactive cysteine is protonated in the triplet excited state of the LOV2 domain in *Adiantum* phytochrome3

著者 : Yoshiaki Sato, Tatsuya Iwata, Satoru Tokutomi, and Hideki Kandori.

雑誌巻号 : *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1088-1089 (2005).論文 2 : Water structural changes in the activation process of the LOV2 domain of *Adiantum* phytochrome3

著者 : Dai Nozaki, Tatsuya Iwata, Satoru Tokutomi, and Hideki Kandori.

雑誌巻号 : *J. Mol. Struct.* **735**, 259-265 (2005).

我々は、「プロトンポンプの方向性を決定する内部結合水の構造解析」という研究課題のもと、バクテリオロドプシン等に対する研究を行っている。膜蛋白質内部の特異な水分子を低温赤外分光法によって捉え、これらが機能に決定的な役割を演じていることを明らかにしつつある<sup>1,2</sup>。一方、蛋白質一般に存在する内部結合水の多くは空間を充填する役割を担っていると考えられるが、我々はこういった水分子が、蛋白質の機能発現における構造変化のプローブになることを同様の手法により示してきた。例えば、細菌の青色光センサーである Photoactive Yellow Protein (PYP) の内部結合水を解析することにより、PYP の光活性化に伴って起こる大域的な構造変化の存在を報告している<sup>3</sup>。

ここでは PYP と同様の蛋白質フォールドをもつ植物の青色光センサー、フォトトロピンの研究を紹介する（図1）。フォトトロピンの光反応は、発色団である FMN (Flavin MonoNucleotide) の励起三重項状態において近傍のシステインと共有結合を形成す

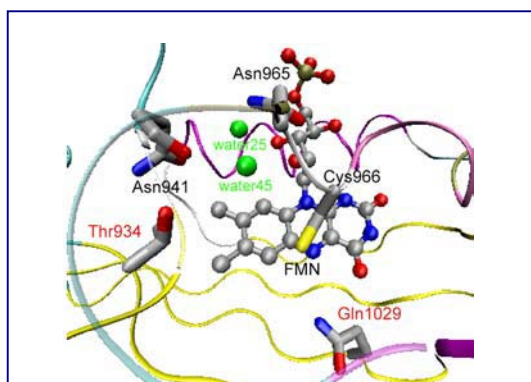


図 1 : フォトトロピンにおけるフラビン (FMN) 発色団結合部位の構造。共有結合を形成する FMN とシステインの近傍に 2 個の内部結合水が存在する。



図 2 : 励起三重項状態におけるシステインの化学構造として種々のモデルが提案され、共有結合形成反応を駆動する機構が考えられている。一方、我々は最近、励起三重項状態におけるシステインの S-H 伸縮を観測した。

ることである。この事実は、講演などで生物の光センサー機能は必ず異性化により始まると強調してきた筆者にとって驚きであり、我々がこの蛋白質を研究するきっかけとなった。研究を始めた当時、システインがプロトン化しているか、解離しているか、大きな論争となっていたが、我々はシステインの S-H 伸縮振動を直接、捉えることによって論争に終止符を打った<sup>4</sup>。その後、励起三重項状態ではシステインから、プロトン移動、水素原子移動、あるいは電子移動が起こるモデルがこれまでに提唱された（図2）。我々は最近、励起三重項状態の赤外スペクトルを捉えることに成功し、ここでもシステインはプロトン化していることを明らかにした（論文1）。従って、少なくとも励起三重項状態におけるプロトン移動説や水素原子移動説は否定できる。

一方、フォトトロピンの水分子に対する振動解析の結果、バクテリオロドプシンに見出されたような水素結合の強い水分子は観測されなかった（論文2）。変異体を用いた解析から、観測された信号は図1に示す2個の水分子に由来することがわかった。我々は低温赤外分光を用いた解析によって活性中間体が温度依存的に構造を変化させることを報告し、ほとんど表面構造を変化させない活性中間体のX線構造が結晶中のアーティファクトである可能性を示唆している<sup>5,6</sup>。今回の水分子の構造解析によれば、水分子の変化は後期の大域的な構造変化ではなく、より局所的な構造変化をプローブしていることが明らかになった。2個の内部結合水は、システインが FMN と共有結合を形成する際の局所構造変化を感知して最適位置に再配置されるものと考えられる。

## 参考文献

1. Kandori (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 72.
2. 柴田、神取 (2004) *生物物理* 44, 113.
3. Kandori et al. (2000) *Biochemistry* 39, 7902.
4. Iwata et al. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11840.
5. Iwata et al. (2003) *Biochemistry* 42, 8183.
6. Nozaki et al. (2004) *Biochemistry* 43, 8373.

## 研究業績の紹介：プロトンポンプの活性中心に存在する水分子の非対称な水和構造

神取 秀樹 (名工大・工、計画研究代表者)

(コア研究：蛋白質のダイナミクス、機能と水和)

論文名：FTIR studies of internal water molecules in the Schiff base region of bacteriorhodopsin.

著者：Mikihiro Shibata, and Hideki Kandori.

雑誌巻号：Biochemistry 44, 7406-7413 (2005).

蛋白質は一般に疎水部を水から避ける形で折り畳まれるが、疎水の内部に水分子が存在する場合がある。これら内部結合水の中には単に空間を充填するだけでなく、機能に重要な役割を演ずる水分子の存在が考えられている。光駆動プロトンポンプ機能を持つバクテリオロドプシン (BR) は、活性中心に存在する 2 個の正負電荷を安定化するように 3 個の水分子が存在する (図 1)。我々は、低温赤外分光法を用いた構造解析をもとに、このような水分子の水素結合変化が機能に重要な役割を演じていることを明らかにしてきた<sup>1-3</sup>。

BR 中の発色団レチナールは光を吸収すると、all-trans から 13-cis へ異性化し、それに伴って初期中間体 K が生成される。構造変化が発色団近傍に限られる K 中間体との赤外差スペクトル (重水中)には BR 側に 6 個、K 中間体の側に 5 個の水分子の O-D 伸縮振動が観測されている<sup>4</sup> (図 2)。<math>2400\text{ cm}^{-1}</math>に現れる水分子は強い水素結合環境下に存在するが、我々はこれまでに Schiff 塩基近傍の部位特異的の変異体を用いた研究から、最も低波数に現れる  $2171\text{ cm}^{-1}$  の水分子のバンドが water402 の Asp85 と水素結合を形成している方の O-D 伸縮振動であることを報告している<sup>5</sup>。しかしながら、K 中間体との赤外差スペクトルに現れる水分子のバンドは他の波数にも観測されており、BR の内部結合水は Schiff 塩基近傍以外にも存在する。そこで本研究においては、より系統的な変異体を用いて、すべての水分子の振動バンドを帰属することを試みた。

十種類を超える変異体を用いて調べたところ、細胞質側の変異は水分子の振動バンドに影響を与えないが、シ

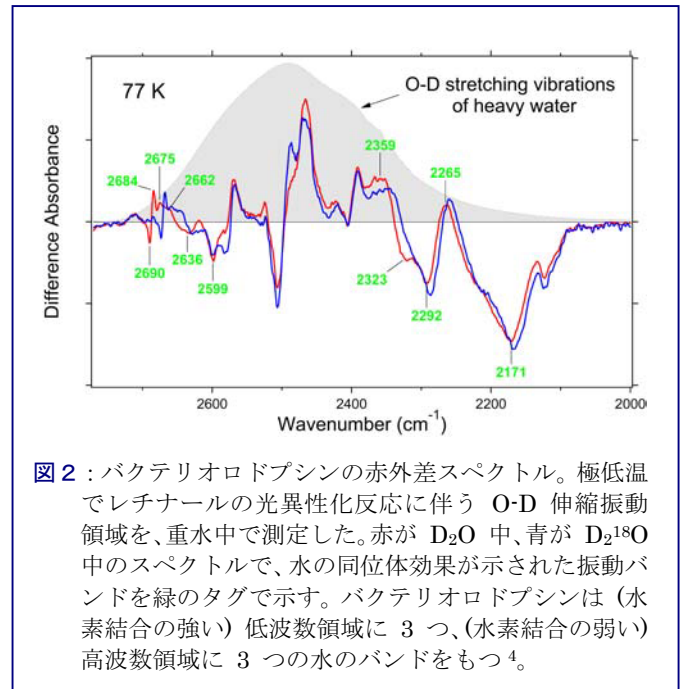


図 2：バクテリオロドプシンの赤外差スペクトル。極低温でレチナールの光異性化反応に伴う O-D 伸縮振動領域を、重水中で測定した。赤が  $\text{D}_2\text{O}$  中、青が  $\text{D}_2^{18}\text{O}$  中のスペクトルで、水の同位体効果が示された振動バンドを緑のタグで示す。バクテリオロドプシンは (水素結合の強い) 低波数領域に 3 つ、(水素結合の弱い) 高波数領域に 3 つの水のバンドをもつ<sup>4</sup>。

ッフ塩基近傍、細胞外側の変異は水分子のバンドに大きく影響することがわかった。これらの結果を総合し、我々は K 中間体との赤外差スペクトルに現れる全ての水分子の O-D 伸縮振動は Schiff 塩基近傍の 3 つの水分子 (water401, 402, 406) に由来すると結論した (図 1)。興味深いことに、いずれの水分子も 2 つの伸縮振動数が大きく分離していた。このことは、振動カップリングによって対称と非対称の 2 つの振動モードを示すフリーな水分子とは全く異なる環境に BR の内部結合水が存在することを意味している。特に、Schiff 塩基の水素結合アクセプターとなる水分子が Asp212 ではなく、Asp85 と強く水素結合するという結論は、Schiff 塩基から (Asp212 ではなく) Asp85 へプロトンが移動するという事実に対応しているように思える。

ロドプシンの分野ではこれまで、光のエネルギーをレチナール分子のねじれによって貯えるという考えが主流であったが、理論計算からも示唆されているとおり<sup>6</sup>、実際には水分子を含む水素結合相互作用が大きく寄与するようだ。BR において強い水素結合を形成する水分子の発見は、この分子ポンプのトップランナーに、新しい知見と認識、さらには新たな問題提起をもたらすことになった。

## 参考文献

1. Tanimoto et al. (2003) *Biochemistry* 42, 2300.
2. Kandori (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 72.
3. 柴田、神取 (2004) *生物物理* 44, 113.
4. Kandori et al. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, 11745.
5. Shibata et al. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125, 13312.
6. Hayashi et al. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126, 10516.

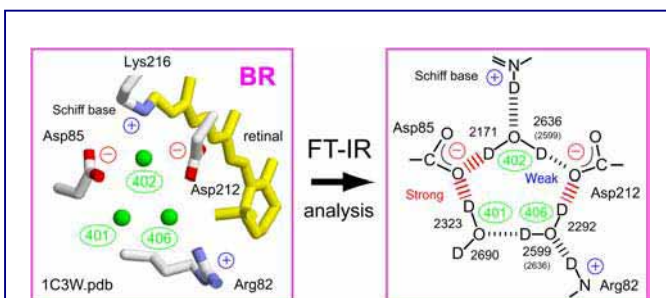


図 1：バクテリオロドプシンの活性中心である Schiff 塩基近傍の構造。二つの負電荷からほぼ等距離に水分子 (water402) が存在する (左図) が、赤外分光法による解析 (右図) によって非対称な水和構造をとることが明らかとなった。

研究業績の紹介：光プロトンポンプ活性は1個の水の水素結合で決まる？

神取 秀樹 (名工大・工、計画研究代表者)

(コア研究: 蛋白質のダイナミクス、機能と水和)

論文名: Strongly hydrogen-bonded water molecules in the Schiff base region of rhodopsins [Review article]

著者: Yuji Furutani, Mikihiro Shibata, & Hideki Kandori

雑誌巻号: *Photochem. Photobiol. Sci.*, in press (2005).

イオンを能動輸送することで細胞内外の濃度勾配を形成する分子ポンプ蛋白質は、生命活動に不可欠の存在である。膜蛋白質であるため長い間その構造情報が得られなかったが、この10年ほどの間に、バクテリオロドプシン (BR) やオキシデース、カルシウムポンプの立体構造が次々に解かれ、機構解明への期待が高まっている。イオンを輸送するためには蛋白質内部の親水性を高める必要があるが、逆流を防ぐためにはイオンの経路は繋がってはいならない。「スイッチ」と呼ばれる方向制御機構はどのように実現するのだろうか？

トップランナーである BR の場合、この数年で様々な中間体の結晶構造が報告されたが、グループごとに構造が異なる上に、新たに水酸イオンポンプ説や水イオンポンプ説が登場し、かえって混乱しているのが現状である。さらに事情を複雑にしているのは、ゲノム解析により発見された古細菌型ロドプシンの存在である。例えば、真核生物のアカパン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。変異蛋白質を用いた研究によれば、1 アミノ酸の置換でプロトンポンプは塩素イオンポンプになるが、塩素イオンポンプ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?)。光でプロトンポンプするためには、いったい何が必要なのだろうか？

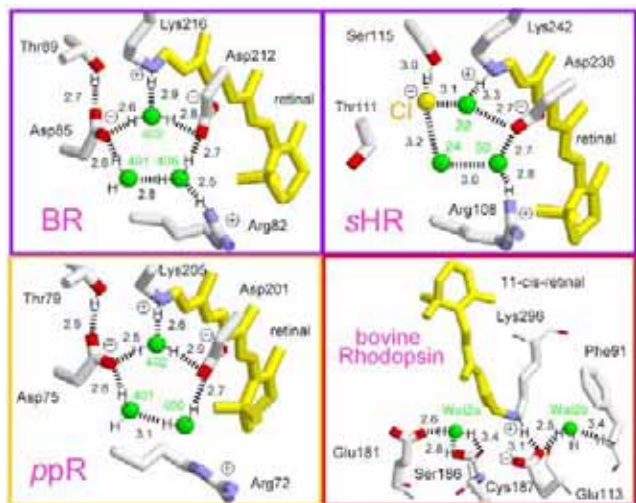


図1: 古細菌ロドプシンのレチナル Schiff 塩基部分では、3 個の水分子が2 個の負電荷とペンタゴンクラスターを構成している。

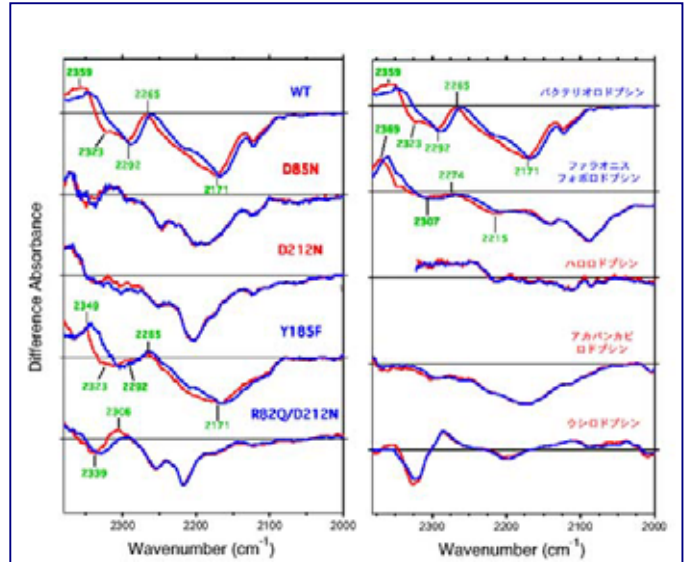


図2: 重水中で強い水素結合を形成した水分子の O-D 伸縮振動領域。<sup>18</sup>O (青のスペクトル) でシフトする振動が水分子に由来する (緑色のタグ)。>2400 cm<sup>-1</sup> にはすべての試料で水の信号が観測されるが、この領域に水の信号をもつものは、プロトンポンプ活性をもった BR やその変異体と ppR だけ (青字で示したもの) である。

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、水伸縮振動としては「異常に」低い振動数をもった水を観測し、これがレチナル Schiff 塩基と Asp85 をブリッジする水に由来することを示した<sup>1,2</sup>。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、興味深い事実が明らかになってきた (本総説)。すなわち、図2のように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存在との間に正の相関が見出されたのである。現在、我々は「プロトンポンプするためには、古細菌ロドプシンという蛋白質鑄型内に強い水素結合を形成した水を配置すればよい」という作業仮説の元、研究を進めている。この仮説に従えば、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。光エネルギーが入れられる Schiff 塩基部位の重要性を考えればもっともな気もするが、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であろうか？ 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ところである。

雑誌巻号

1. Kandori (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 72.
2. 柴田、神取 (2004) *生物物理* 44, 113.

## 研究業績の紹介：光駆動クロライドイオンポンプの新しい作動メカニズム

神取 秀樹 (名工大・工、計画研究代表者)

(コア研究：蛋白質のダイナミクス、機能と水和)

論文名：Hydrogen-bonding alterations of the protonated Schiff base and water molecule in the chloride pump of *Natronobacterium pharaonis*.

著者：Mikihiro Shibata, Norikazu Muneda, Takanori Sasaki, Kazumi Shimono, Naoki Kamo, Makoto Demura, and Hideki Kandori.

雑誌巻号：Biochemistry 44, 12279-12286 (2005).

**高**度好塩菌はバクテリオロドプシン (BR)、ハロロドプシン (HR) という 2 種類の光駆動イオンポンプによって光エネルギー変換を実現している。BR は細胞質側から細胞外側へとプロトン、HR はその逆方向に塩化物イオンをポンプする。我々のグループを含め<sup>1-3</sup>、活発な研究が BR に対して行われている一方、HR の研究は遅れている。BR がわずか 1 個のアミノ酸置換によってクロライドポンプになる事実<sup>4</sup>や、結晶構造の類似性が指摘されているが、HR のクロライドポンプ機構に関して、十分な実験的証拠に基づくモデルは皆無といってよかった。その理由としては、BR のプロトン輸送経路がカルボン酸などの振動解析によって決定された一方、クロライドの輸送経路を分光データから決定するのは難しいという事実がある。最も期待されるのは、クロライドの位置決めが可能な中間体の結晶構造解析であるが、未だにその報告はない。

そのような現状のもと、これまでに受け入れられてきたモデルを 図 1 に示す。このモデルによれば、光反応前にプロトン化シッフ塩基の水素結合アクセプターであるクロライドは、レチナールの異性化によってシッフ塩基が向きを変えるのに従い移動する。水素結合を介したイオン対構造の安定性を考えると理にかなったモデルではあるが、唯一の実験データと言えるものが、共鳴ラマン散乱によって L 中間体のシッフ塩基が強い水素結合を形成するというものであった。

我々は BR に対する重水中での赤外分光解析において、シッフ塩基の N-D 伸縮や水分子の O-D 伸縮振動を直接観測することに成功している<sup>1-3</sup>。そこで本研究では、特にシッフ塩基の N-D 伸縮振動に着目し、従来型のモデル

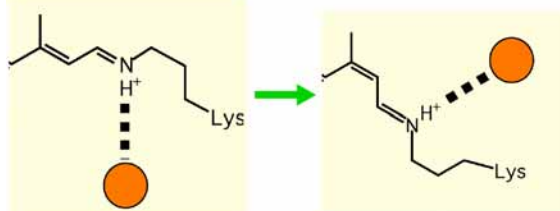


図 1：従来からのハロロドプシンのクロライド輸送モデル。光反応前においても、反応中間体 (L 中間体) においても、プロトン化シッフ塩基とクロライドが直線的に水素結合するという構造を仮定している。

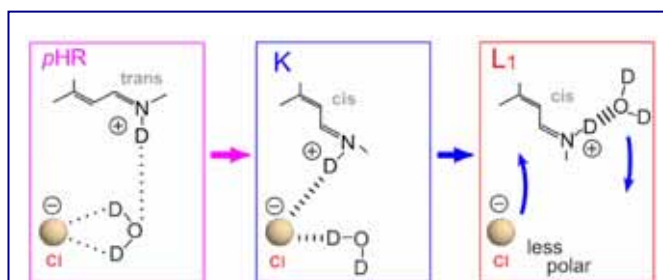


図 2：赤外分光法の結果より提唱したクロライドポンプ機構。図の上側が細胞質側、下側は細胞外側を示す。クロライドはこの図の下から上へと運ばれる。シッフ塩基の伸縮振動のハライド依存性から、K 中間体においてのみシッフ塩基とハライドとの水素結合が形成される。ハライドを水和する水分子の脱水がクロライドに駆動力を与える (L<sub>1</sub> 中間体の青矢印)。

が正しいかどうかを検討することにした。シッフ塩基とハライドが直線的に水素結合を形成していると考えられる溶液中では、ハライドが小さくなると振動数が低くなる (= 水素結合が強くなる) という相関が報告されており、このようなハライド依存性が観測されたときに図 1 のような直接的な相互作用を考えた。

Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> を結合した HR の光誘起赤外スペクトル変化を測定し、<sup>15</sup>N-Lys 標識試料を用いることでシッフ塩基の N-D 伸縮振動を帰属したところ、予想した相関は HR にも L 中間体にも見られなかった。さらに驚いたことに、L 中間体では N-D 伸縮振動そのものは最も低波数に現れ、強い水素結合形成を示していたものの、ハライド依存性が全く観測されなかったのである。ハライドがシッフ塩基の水素結合アクセプターでなければ、いったい何が候補となるのだろうか？ 我々は水分子の O-D 伸縮も測定しているが、シッフ塩基と同様にハライド依存性がなくなったことからシッフ塩基は水と水素結合すると結論した。図 2 に示す我々のモデルによれば、クロライドに駆動力を与えるのは水素結合相互作用ではなく、シッフ塩基や水の脱離による疎水性の上昇と解釈できる。なぜ (下向きでなく) 上向きの駆動力が与えられるのかについては今後の課題であるが、水分子を直接捉えることのできる赤外分光計測の実現により、クロライドポンプの解明に向けた重要な研究成果が得られたとすることができるだろう。

なお、本論文は米国化学会 (ACS) の Hot Article に選定されている。

## 参考文献

1. Kandori (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 72.
2. 柴田、神取 (2004) *生物物理* 44, 113.
3. 神取 (2005) *現代化学* 414, 51.
4. Sasaki et al. (1995) *Science* 269, 73.

## 研究業績の紹介：真正細菌に発見された古細菌型ロドプシンの内部結合水

神取 秀樹 (名工大・工、計画研究代表者)

(コア研究：蛋白質のダイナミクス、機能と水和)

論文名：FTIR spectroscopy of the all-trans form of *Anabaena* Sensory Rhodopsin at 77 K: Hydrogen bond of a water between the Schiff base and Asp75

著者：Yuji Furutani, Akira Kawanabe, Kwang-Hwan Jung and Hideki Kandori

雑誌巻号：Biochemistry 44, 12287-12296 (2005).

古細菌型ロドプシンは、有名なバクテリオロドプシン (BR) のように光駆動イオンポンプとして光をエネルギーに変換するか、伝達蛋白質を活性化することで光を情報へと変換する<sup>1,2</sup>。その名の通り、その存在は古細菌に限定されると考えられてきた。しかしながら、最近のゲノム科学の進展により、古細菌型ロドプシンが真正細菌にも、真核生物にも存在することが明らかになり、構造と機能における多様性や共通性が興味をもたれている。ここでは、真正細菌のラン藻で発見されたアナベナ・センサリーロドプシン (ASR) の内部結合水に関する我々の研究について紹介したい。

ASR は大腸菌で発現できるため、ラン藻中における機能解析を追い越す形で蛋白質レベルでの研究が進んでいる。すでに高分解能の結晶構造解析が行われ、BR と同様にレチナールのプロトン化 Schiff 塩基とその対イオン (Asp75) を橋渡しする水分子の存在が明らかになった (図 1)。この水分子は、BR の場合と同様に蛋白質内部でのイオン対構造を安定化するのであろう。ASR において興味深いのは、レチナールが光を吸収した後の光反応サイクルの過程で、Schiff 塩基のプロトンが Asp75 へ移動して M 中間体が生成するにも関わらず、プロトンポンプ活性が見られないことである。BR の場合、M 中間体が生成すればプロトンポンプが実現するので、ASR の結果は、プロトンポンプのためには何が必要であるのかという問いを投げかけることとなった。

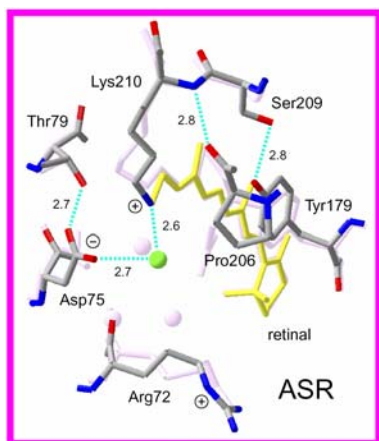


図 1：ASR における活性中心の構造。BR (薄い図で示す) と同様、プロトン化 Schiff 塩基および対イオンの Asp75 から水素結合できる距離に 1 個の水が存在する。

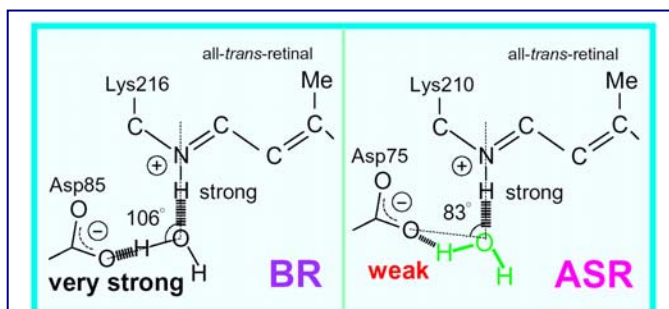


図 2：赤外分光測定の結果、ASR の Schiff 塩基は BR と同様の強い水素結合を形成する一方、水素結合の強い水分子は存在しないことがわかった。結晶構造において N-O-O の角度は、BR で 106°、ASR で 83° となる。Schiff 塩基と対イオンの相対的な配置の違いが、相異なるブリッジ水の水素結合強度につながるものと解釈できる。

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」低い振動数をもった水を観測し、これがレチナール Schiff 塩基と対イオンをブリッジする水に由来することを示した<sup>1</sup>。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、強い水素結合を形成した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事実を発見した<sup>1</sup>。そこで本論文において、ASR の低温赤外分光を行ったところ、これまでの経験則通り、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。強い水素結合を形成した水とプロトンポンプ活性の正の相関は、真正細菌の古細菌型ロドプシンにもあてはまっていたのである。

それでは BR のようなブリッジ水を持ちながら、ASR の水はなぜ強い水素結合を形成しないのであろうか？ 図 2 における結晶構造の比較は、水分子の微妙な配置の違いがその水素結合強度を決定することを示唆している。このようなわずかな水素結合構造の違いが、ほんとうにプロトンポンプ活性という機能を決定しているとしたら面白い。水素結合のエネルギーは小さいというのが常識であるが、このような形で蛋白質の機能を左右している可能性がある。

ASR はブリッジ水の水素結合以外にも興味ある性質を有する。例えば、これまで知られているすべての古細菌型ロドプシンにおいて、全トランス型レチナールだけが機能をもつに対して、ASR は 13 シス型とのフォトクロミズムが光センサー機能をもたらしていると提案されている。さらに、古細菌型ロドプシンの伝達蛋白質は 2 回膜貫通型であるのに対して<sup>2</sup>、オペロンを形成する ASR の伝達蛋白質は水溶性である。この点では、G 蛋白質を活性化する視物質ロドプシンの方に近いとも考えられる。興味の尽きない新しいロドプシンの仲間である。

## 雑誌巻号

1. 神取 (2005) 現代化学 414, 51.
2. 神取、加茂 (2002) 蛋白質核酸酵素 47, 620.



## 研究業績の紹介：真核生物に発見された2種類の古細菌型ロドプシンの内部結合水

神取 秀樹（名工大・工、計画研究代表者）

（コア研究：蛋白質のダイナミクス、機能と水和）

論文 1 : FTIR spectroscopy of the K photointermediate of *Neurospora* rhodopsin: Structural changes of the retinal, protein, and water molecules after photoisomerization

著者 : Yuji Furutani, Arandi G. Bezerra Jr., Stephen Waschuk, Masayo Sumii, Leonid S. Brown, and Hideki Kandori.

雑誌巻号 : *Biochemistry* **43**, 9636-9646 (2004).

論文 2 : Strongly hydrogen-bonded water molecule present near the retinal chromophore of *Leptosphaeria* rhodopsin, the bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote

著者 : Masayo Sumii, Yuji Furutani, Stephen Waschuk, Leonid S. Brown, and Hideki Kandori.

雑誌巻号 : *Biochemistry* **44**, 15159-15166 (2005).

**古**細菌型ロドプシンは、有名なバクテリオロドプシン (BR) のように光駆動イオンポンプとして光をエネルギーに変換するか、伝達蛋白質を活性化することで光を情報へと変換する<sup>1-3</sup>。その名の通り、その存在は古細菌に限定されると考えられてきた。しかしながら、最近のゲノム科学の進展により、古細菌型ロドプシンが真正細菌にも真核生物にも存在することが明らかとなり、構造と機能における多様性や共通性が興味をもたれている。真核生物であるカビ類に発見された *Neurospora* Rhodopsin (NR) と *Leptosphaeria* Rhodopsin (LR) には、BR のプロトン輸送に重要なアミノ酸が保存されているにも関わらず、NR にはプロトンポンプ活性がなく、LR はプロトンポンプ活性をもっている(図)。このような機能の違いは、何に由来するのであろうか？ 真核生物由来の NR, LR は大腸菌では発現しないため、結晶構造解析を含む

構造機能相関の研究は十分に進んでいないのが現状である。

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」低い振動数をもった水を観測し、これがレチナルシッフ塩基と対イオンをブリッジする水に由来することを示した<sup>1,2</sup>。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、強い水素結合を形成した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事実を発見した<sup>2,4</sup>。このような経験則は、真正細菌であるラン藻から発見された古細菌型ロドプシンにも保存されていた<sup>5</sup>。

我々は、論文1において NR、論文2において LR に対して、内部結合水を含む蛋白質構造の詳細な解析を低温赤外分光により行った。その結果、これまでの経験則通り、強い水素結合を形成した水分子は LR だけに存在することがわかった(図)。強い水素結合を形成した水とプロトンポンプ活性との間の正の相関は、古細菌、真正細菌、真核生物というすべての生物種の古細菌型ロドプシンにあてはまっていたのである。光駆動プロトンポンプは、水分子の強い水素結合相互作用によって局所的な安定構造を実現しており、レチナル分子の異性化反応によって水素結合が不安定化されることが光エネルギーの蛋白質内部への取込に関わっているようだ。「ポンプ」という興味深い機能は、そのような状態から水素結合相互作用による安定化過程の中で発現されるのであろう。

## 参考文献

1. 柴田、神取 (2004) *生物物理* **44**, 113.
2. 神取 (2005) *現代化学* **414**, 51.
3. 神取、加茂 (2002) *蛋白質核酸酵素* **47**, 620.
4. Furutani et al. (2005) *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 661.
5. Furutani et al. (2005) *Biochemistry* **44**, 12287.

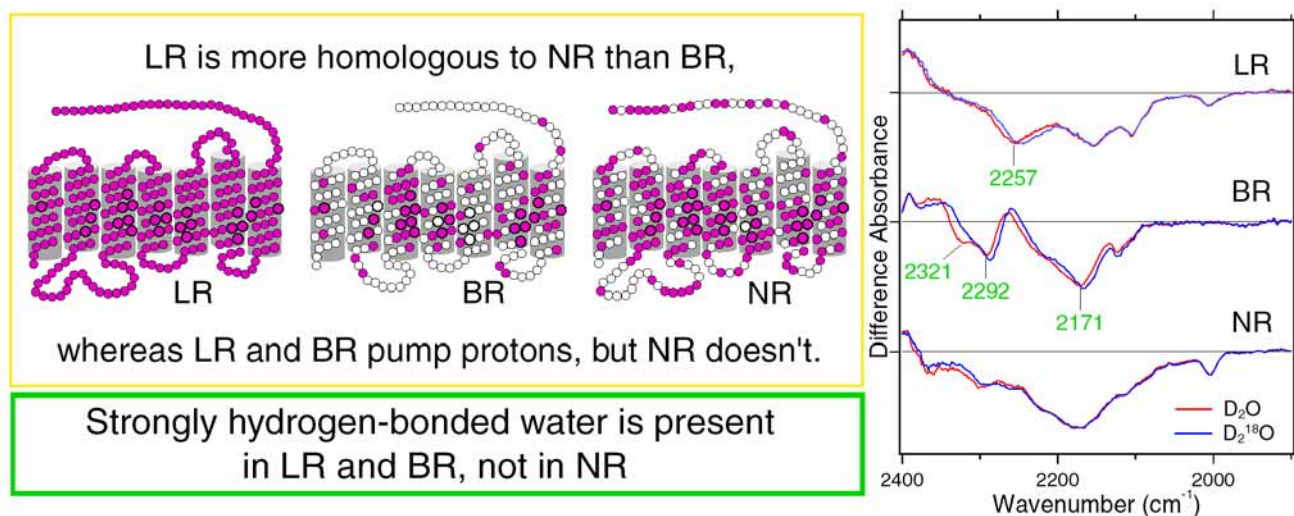


図 : LR のアミノ酸組成は、BR と 26% , NR と 56% の一致度を示す (左)。系統的に LR と NR が似ているのは当然であるが、機能的に見ると、LR と BR だけがプロトンポンプ活性をもつ。なぜそのような違いが現れるのか不明であるが、低温赤外分光を用いた研究から、水素結合の強い水分子は BR と LR だけに存在し、NR には含まれないことが明らかとなった (右)。

## 研究業績の紹介：酸素を水に還元するオキシデーの赤外分光法による研究

神取 秀樹 (名工大・工、計画研究代表者)

(コア研究：蛋白質のダイナミクス、機能と水和)

論文名：Redox-induced protein structural changes in cytochrome *bo* revealed by Fourier transform infrared spectroscopy and [<sup>13</sup>C]Tyr labeling

著者：Hideki Kandori, Hiro Nakamura, Yoichi Yamazaki, and Tatsushi Mogi

雑誌巻号：J. Biol. Chem. **280**, 32821-32826 (2005).

**水**と生体分子の研究において、多くの場合、取り扱われるのは集団的に振る舞う水分子の性質である。本特定領域研究においても、フォールディングやアミロイドなどの構造形成を支配する水和の効果や機能発現のための構造変化に関わる水和の効果、主要な議論の対象となっている。このように、水分子は蛋白質の環境となつて折り畳みやダイナミクスを制御するが、ときには蛋白質の内部に入って蛋白質の機能に直接的に関与する。このとき、集団的にはたらく水とは異なり、1個1個の水の特殊なはたらきが重要な意味をもつてくると考えられる。例えば、加水分解など水分子そのものが基質となる酵素反応や、脱水など逆に水分子が生成産物となる酵素反応においては、1個の水分子の構造や物性が反応を支配するのであろう。さらには、アクアポリンのように水分子を輸送するチャネルにおいては、1次元的な水素結合ネットワーク中の水のダイナミクスがその機能を支配すると考えられる。プロトンの着脱といったpKaを変化させる反応にも、水分子が深く関わっているに違いない。このように、蛋白質の機能発現過程における内部結合水の挙動にはたいへん興味深いものがあるが、その役割を実験的に示した例はほとんど見られない。結晶構造をもとに水分子に関わる酵素反応を計算機上で推定することはできても、蛋白質という複雑系において、個々の水分子を実験的に捉えることの困難さは容易に想像できるだろう。

このような観点からすると、我々が研究を行っているバクテリオドブシン (BR) などの光受容蛋白質はきわめて稀な蛋白質とすることができる。赤外分光やX線結晶構造解析においてさまざまな工夫を凝らすことで、機能発現過程における水分子の水素結合変化や位置変化を実験的に捉えることが可能になったからである。内部結合水がBRのプロトンポンプにおいて決定的な役割を担っていることはすでに自明である。それでは、BRで得られた知見は、どれほどの共通性をもつのであろうか？ このような観点から興味深いのは、呼吸鎖に含まれるプロトンポンプのオキシデーである。オキシデーはヒトもバクテリアももっており、生物の生体エネルギー変換における基本的な部品である。銅とヘム鉄から構成される複核中心に結合した酸素分子に、4個の電子とプロトンが秩序だつて供給されることにより、酸素を水に還元する反応が起こり、そこから解放される自由エネルギーを利用したプロトンポンプが実現する。1個の光子によって反応を制御されるBRのプロトンポンプとは異なり、複雑

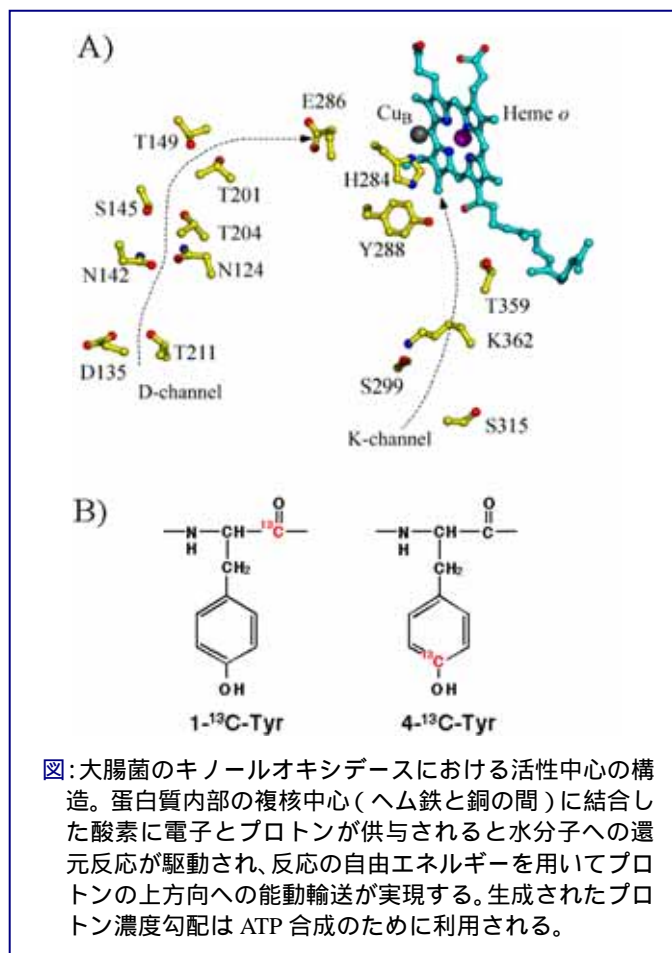
な反応の連鎖がオキシデーのプロトンポンプを実現するが故に、ウシやバクテリア由来のオキシデーに対して結晶構造が決定されたものの、反応機構についての十分な理解は得られていない。

我々はこれまでに、大腸菌のキノールオキシデー試料に対して、共存させた光還元剤からの光誘起電子移動反応に伴う赤外スペクトル変化を報告した(参考文献)。本論文においては、活性中心を構成するチロシン側鎖と主鎖を同位体標識することにより、チロシンに生じる構造変化の帰属を行っている(図)。得られた成果は、酸素の反応によるプロトンポンプ過程を捉えたものではないし、オキシデー中に含まれる水分子の構造解析も行っていない。このような点からすると、能動輸送機構解明はまだまだ先の課題であるが、水素結合をモニターすることのできる振動分光学などの実験データを蓄積することにより、オキシデーのプロトンポンプに対する正しい理解が得られるものと考えている。

## 参考文献

1. Yamazaki et al. *J. Biochem.* **125**, 1131 (1999); **126**, 194 (1999).

なお、個々の水分子のはたらきに注目したワークショップ「水と蛋白質が織り成す機能発現のメカニズム」を蛋白質科学会(平成18年4月、京都)において、阪大の高橋 聡助教授とともに開催する予定です。



図：大腸菌のキノールオキシデーにおける活性中心の構造。蛋白質内部の複核中心(ヘム鉄と銅の間)に結合した酸素に電子とプロトンが供与されると水分子への還元反応が駆動され、反応の自由エネルギーを用いてプロトンの上方向への能動輸送が実現する。生成されたプロトン濃度勾配はATP合成のために利用される。