

バクテリオロドプシンのプロトン輸送機構 —フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) と内部水分子—

前田 章 夫

バクテリオロドプシンは古細菌に属する高度好塩菌の細胞膜に、紫膜というパッチを作って存在するタンパク質である。プロトン化シッフ塩基を通じて結合しているレチナールに吸収された光を使って、プロトンを細胞内から細胞外に運び、外から内に向かうプロトン駆動力に変換する。素過程は対応する光受容後に生じる中間体と共に同定されている。本稿では、特に一方向へのプロトン移動に重要な、シッフ塩基から Asp85 へ、また Asp96 からシッフ塩基へのプロトン移動を間違いなく起こすこれらの残基のプロトン親和性の変化が、どのような分子機構で行われるのか、これまでの結果を要約する。アスパラギン酸、ペプチド骨格以外にも、タンパク質内部の水分子が中間体の構造変化に重要な役割を演じていることを、赤外分光法による結果で示す。

1. バクテリオロドプシンとは？

バクテリオロドプシンは古細菌 (Archae) に属する高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* より単離された紫膜を構成するタンパク質で、動物の眼の網膜にある視覚に与えるロドプシンと同じく、光を受容するレチナールをもつ¹⁾。光をエネルギー源として、プロトンを一方向に動かす。その結果、膜の外側より内側にプロトンを動かす電気化学的ポテンシャルが生じ、ATP合成、鞭毛の回転、イオンの輸送などの別の形のエネルギーに変換される²⁾。

単量体の分子量は約 26,000 (248 残基) で、それが三量体 (図 1) を単位に 6 方晶系の二次元結晶として、紫膜と称されるパッチを形成する³⁾。その 75% をバクテリオロドプシンでしめ、1 分子当たり約 10 分子の diphytanylglycerol diether を構成要素とする脂質がその間を埋める^{4,5)}。純粋で安定な標品が容易にかつ多量にえられることから、最先端のテクニックをもった研究者を招きよせ、最もよく解明された酵素の一つとなった。生体エネルギー変換機構の

最もシンプルな、生化学の言葉で書き表される精巧な形が、このタンパク質にみられる。

バクテリオロドプシンは、最初に発見された細胞膜を貫通する 7 本のヘリックスよりなるタンパク質で、G タンパク質にカップルしたレセプター (GPCR) の原型をなす。その 7 本目の Helix G にある Lys216 に、レチナールがシッフ塩基 ($-\text{CH}=\text{N}-$) で結合している。レチナールは極めて疎水性の高い分子で、膜のほぼ中央を横切る。その細胞質側に近い部分を C 側、細胞外に近い部分を E 側と本稿ではよぶ (図 2)。シッフ塩基はプロトン化されていて、そのプラスの電荷は、シッフ塩基につらなるレチナールの側鎖の共役二重結合系の中に分散される (電荷の非局在化)。E 側にある Asp85 がこの電荷に釣り合うマイナス電荷をもつ。シッフ塩基の N—H は E 側を向き、Asp85 との間にある Water402 と水素結合を形成する。そばにはマイナス電荷をもつ Asp212、プラス電荷をもつ Arg82 があり、間には水分子 (ドットの円) が介在する。その下側には細胞外へのプロトンの放出に関与する Glu194, Glu204 と数個の水分子がある。C 側にはこのような極性の残基は少ない。シッフ塩基から約 1 nm 離れているプロトン化した Asp96 はプロトンポンプに重要で、Thr46 と水素結合を作る。

2. レチナールの変化—共鳴ラマン分光法

バクテリオロドプシンのレチナールは、シッフ塩基を形成する $C_{15}=N$ 結合を含めて、五つある二重結合のすべて

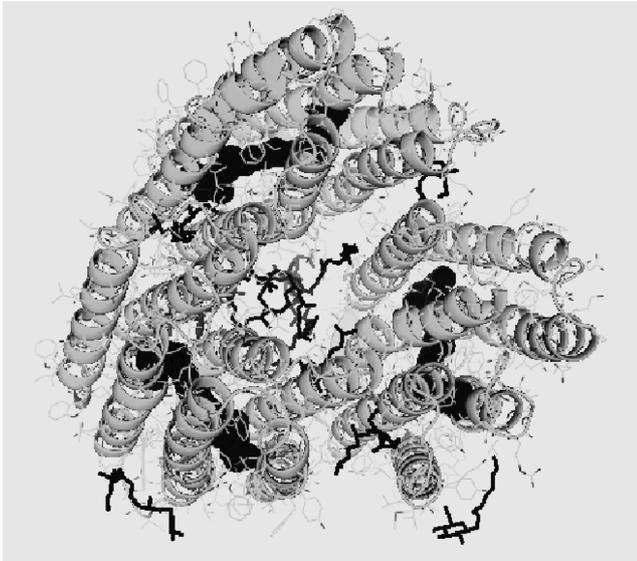


図1 C側からみたバクテリオロドプシンの三量体 (少し傾けている)

リボンはヘリックス, レチナールが Lys216 を通じて Helix G に結合していることを球モデルで示す. 棒モデルは diphytanyl-glycerol diether を構成要素とする脂質. [protein databank entry (PDB); 1BRR⁹により PyMol⁷を用いて作図]

が *trans* 型の全 *trans* 型のものと, その $C_{13}=C_{14}$ 結合と $C_{15}=N$ 結合 (図2参照) が共に *cis* 型になった 13,15-*dicis* 型のものよりなり, 両者は熱平衡状態にある. 光ですべての分子が 568 nm に吸収極大をもつ全 *trans* 型に変換される. 光によるプロトンポンプを起こすのは全 *trans* 型レチナールをもつバクテリオロドプシンのみで, 以下 **BR** と表す.

光により **BR** に起こされる反応は 0.02 秒ほどで終了し, もとの **BR** に戻る. このような速い反応は, 閃光照射後に起こる変化を, フェムト秒からミリ秒にわたる時間分解能をもつ分光法を適宜使って調べる. バクテリオロドプシ人がすぐれた研究対象である理由の一つは, このタンパク質の最も根幹をなす部分のレチナールが光で変化し, 可視部領域での吸収スペクトル, あるいは可視光で励起される共鳴ラマンスペクトルの変化から中間体を同定し, 反応過程をリアルタイムで追跡できることにある. ~ 0.1 ps (10^{-13} sec) で生じる励起状態の I_{400} からはじまり, 1 ps で基底状態である K_{610} で 13-*cis* 型になる⁹. その後, 赤外分光法で同定された K_L^{10} を経て, マイクロ秒からミリ秒の時間帯にある L_{543} , M_{412} , N_{540} , O_{640} と続く一連の中間体が, プロトンポンプの各段階をなす中間体として同定され, 最後にもとの **BR**₅₆₈ に戻ることが確認された (図2). これを光サイクルと呼ぶ¹¹.

可視光による共鳴ラマン法のように, 色の基になるレチナールに限定して振動バンドを解析する方法を使って, レチナール分子の各化学結合に起こる変化を同位元素置換で

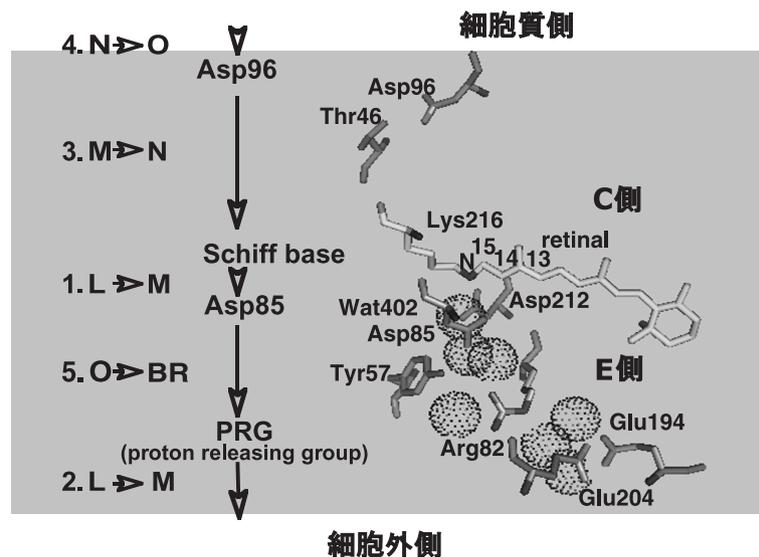


図2 中間体とプロトン移動経路

プロトン移動の順序と相当する中間体との遷移を左に, プロトン移動の経路をその右に, 関係する残基の位置関係 (PDB; 1C3W⁸) により PyMol⁷を用いて作図) を右に示す. **PRG** (proton release group) については本文参照. 13, 14, 15 はレチナールの炭素原子の番号, N はシッフ塩基の窒素原子を示す.

知ることができる¹²⁾。その結果、光はレチナールの $C_{13}=C_{14}$ 結合だけを *cis* 型に変えることが分かる。最初のプロトン移動を起こす直前の **L** では、シッフ塩基の $N-H$ は **BR** のときとは逆の **C** 側を向く¹³⁾。**M** でシッフ塩基の $N-H$ からプロトンがなくなり、**N** で再プロトン化されること、**O** ではもとの全 *trans* 型に戻るなど、共鳴ラマン法により明らかにされた。

3. プロトン移動の経路—フーリエ変換赤外分光法

以上の結果は **L** から **M** に変換する過程で、最初のプロトンの移動がシッフ塩基から起こることを示す (図 2-1)。その移動先が Asp85 ということは、振動分光法の一つ、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) によって示された。図 3a に **M** の状態でのスペクトルから **BR** のそれを引いた差 FTIR スペクトルを示す。ここには **M** の生成にともない変化した振動バンドのみが現れている。中間体によって異なった差スペクトルを示し、多くの振動バンドが同定されている¹⁵⁻¹⁷⁾。上側に向いた 1761 cm^{-1} に現れるバンドは、**M** の生成にともない現れたプロトン化したカルボン酸による吸収である。アスパラギン酸のカルボキシル基を ^{13}C でラベルした標品では低波数の 1722 cm^{-1} にシフトすること¹⁸⁾、Asp85 を Glu にした変異体で 1725 cm^{-1} に変化すること¹⁹⁾ から、プロトン化した Asp85 によると結論される。下側に向いた吸収バンドは **M** の生成にともない消失した **BR** の吸収で、 ^{13}C によりシフトする 1385 cm^{-1} のバンドは、Asp85 の脱プロトン化したカルボン酸による²⁰⁾。**M** の生成にともない、シッフ塩基のプロトンが Asp85 に移ったことが明らかになる。

FTIR 分光法の強みは、赤外線の吸収が双極子の変化に基づくことにある。酵素の機能発現が極性化学結合の極性

変化によることを考えれば、FTIR の差スペクトルに現れる吸収バンドの同定を通じて、機能発現メカニズムの素描をえがけることになる。化学結合の同定は、同位元素による標識と、適当な変異タンパク質の組み合わせ、理想的には部位特異的同位元素標識による²¹⁾。立体構造上での位置関係は、結晶解析の結果を参考にするが、結晶解析では見出されない分子内局所の、機能に関連する化学結合の極性の変化が捉えられる。結晶化による分子内部の配列替え、特にシッフ塩基に起こる X 線による傷害²²⁾などは、非侵襲的で native な状態で測る FTIR 法では考えられない。

シッフ塩基のプロトンの Asp85 への移動 (図 2-1) に続いて、細胞外へプロトンが放出される (図 2-2)。表面のマイナスの電荷が表面電位を形成して、放出されたプロトンは見かけ上トラップされるが、表面に結合させた pH 指示薬の変化から、プロトンの放出は **M** の生成に少し遅れて起こることが分かる²³⁾。pH 滴定における見かけの pK_a に大きな影響を及ぼす表面電位の効果は、塩 (0.15 M KCl) を加えて減らすことができる。

Asp85 のプロトンは最後の **O** まで保持されており、**M** の生成にともなう細胞外へのプロトンの放出は別の場所から起こる。細胞外に面した表面より少し中に入ったところにある Glu204 や Glu194 を Gln に変えると、このプロトンの放出がなくなる^{24,25)}。ただ、**BR** で Glu のプロトン化した状態が見出されず、これらのカルボキシル基から直接放出されるのではない²⁶⁾。また Arg82 や Tyr57 の置換でもプロトンの放出が減る^{27,28)}。**M** の生成にともなう FTIR 差スペクトルが示す、 2100 cm^{-1} から 1800 cm^{-1} へ基線から次第に下側に離れていくマイナス方向のいわゆる continuum band (図 3a) は、Glu194, Glu204 の置換で消失する²⁹⁾。いくつかの主張^{26,30,31)}があるが、Glu204, Glu194, Arg82,

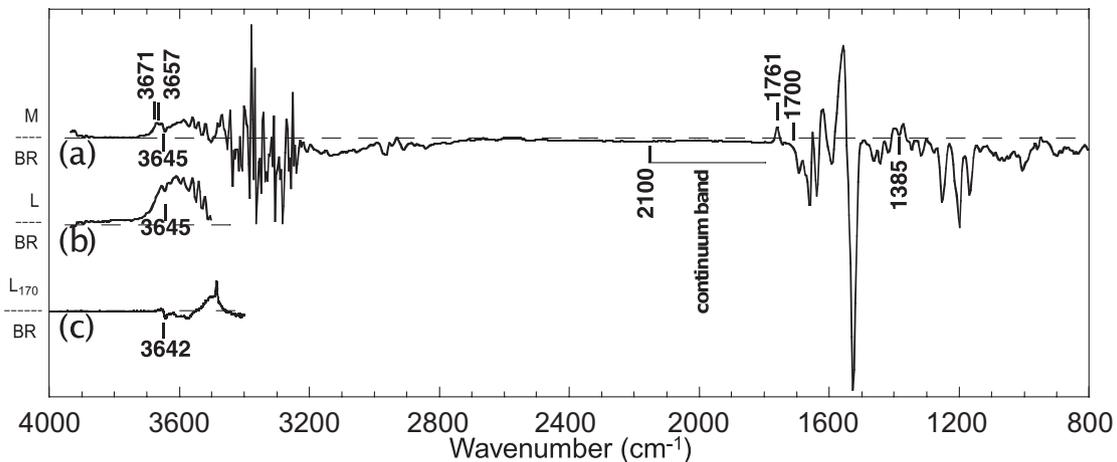


図 3 水の変化を含む中間体と BR の差 FTIR スペクトル

(a) 時間分解 FTIR スペクトル法によりえた、バクテリオロドプシンの 25°C における **M** と **BR** の差スペクトル¹⁴⁾。(b) 同じ方法で求めた時定数 $43\text{ }\mu\text{s}$ のスペクトルの水の振動バンドの部分で、**L** と **BR** の差スペクトルが 75% を占める。(c) 170 K での光照射でえられた **L** と **BR** の差スペクトル¹⁵⁾の水の振動バンドの部分。横軸は振動数に比例する波数、縦軸は差吸光度。

Tyr57 とそれに囲まれた内部水分子による水素結合を通じて非局在化したプロトンの解離によるという、Zundel の提案³²⁾に基づく考えが最も妥当であろう。このプロトン放出基を以下 PRG (proton releasing group) とよぶ (図2参照)。

プロトンを失ったシッフ塩基は次の N で再びプロトン化される (図2-3)。FTIR による結果は、BR でプロトン化していた Asp96 が N では解離することを示す³³⁾。Asp85 は E 側、Asp96 は反対の C 側にあり、プロトンが一方に動くことが分かる。Asp96 は次の O への過程で細胞質からプロトンを取り (図2-4)、もとのプロトン化した状態に戻る³⁴⁾。プロトンを供与できない D96N では、細胞質から Asp96 をバイパスして、細胞質から直接シッフ塩基へプロトンがとりこまれる³⁵⁾。最後に Asp85 に残っていたプロトンは BR に戻る過程で PRG に移り (図2-5)、全過程でプロトンを1個、細胞質から細胞外に運び、もとの BR に戻る。

4. 水クラスターで保持される L のシッフ塩基プロトン

それでは一方向へのプロトンの移動を起こすのに、バクテリオロドプシンの構造がどのように整えられてゆくか。すなわち、L から後の一連の中間体で、プロトン移動に関与する PRG, Asp85, シッフ塩基, Asp96 のプロトン親和性がどのような機構で調整されていくのかが問われる。

BR でのシッフ塩基へのプロトンの親和性は非常に高く、E 側を向いたシッフ塩基の N—H のプロトンは、外液の pH を 12 にしても離れない³⁶⁾。外液とは自由にプロトンを交換する³⁷⁾ので、シッフ塩基の窒素原子がプロトンへの高い親和性をもつことを示す (図4-BR)。シッフ塩基を¹⁵N でラベルした標品での固体 NMR による結果は、Asp85, Asp212 のマイナスの対電荷は水分子 (図2の Water402) を間においたシッフ塩基との相互作用により分散され、プロトンが解離した形が安定になることを示す³⁸⁾。対応してシッフ塩基においてもレチナールの共役二重結合系を通してプラスの電荷が分散し (電荷の非局在化)、プロトンをもつ形が安定になる。

L のレチナールは 13-*cis* 型で、シッフ塩基の N—H の向きが BR のときとは逆の C 側を向き、Asp85 との間にあった Water402 がなくなり、シッフ塩基へのプロトン親和性も減る。シッフ塩基からプロトンが外れた M とは互いに準平衡状態にある (図4)。以下に述べるようにこの平衡は、シッフ塩基の C 側のいくつかの残基が作る構造体と、それが囲む水クラスターによって影響される^{13, 39-41)}。

著者らが提唱する L の構造を最もよく表す、Kouyama らの結晶解析による構造モデル^{42, 43)}の一部を図5に示す。BR でのシッフ塩基のすぐ C 側で、Val49, Thr89, Leu93, Ala215, Lys216 に囲まれた領域を塞いでいた Lue93, Val49

の側鎖が、L ではフリップして空洞ができ、上からシッフ塩基の窒素原子がみえる。空洞の上部は Thr46, Asp96, Phe219 (棒モデル) によってふたがされている。

この中でまず Asp96 と水素結合を形成している Thr46 を非極性の Val に変えた T46V では、L ↔ M の平衡は M の方にずれ、T46V と D96N の二重変異でもとに戻る⁴⁴⁾。レチナール、Lys216 の近傍にあり、側鎖をシッフ塩基の方に向けている Trp182, Leu93, Val49 を小さいアミノ酸に置換した W182F, L93M, V49A では、平衡は野生型よりもさらに L の方にずれる⁴⁵⁻⁴⁷⁾。

このような平衡の移動に対応した水の変化が、170 K (−103 °C) という極低温での光照射で安定に作られる L に見出される^{44, 48-50)}。水は赤外領域の絶対スペクトルに大きな吸収バンドを与える。図3aの差スペクトルの 3500–3200 cm^{−1} の領域でノイズが大きいのはそのためである。温度を下げて水の吸収バンドを低波数に下げた 170 K での L のスペクトル (図3b) には、H₂¹⁸O に置換すると約 10 cm^{−1} 低い振動数へシフトする、3500 cm^{−1} を中心にして L による水の3個の O—H 伸縮振動のバンドが認められる (図3c)。平衡が M によった T46V では L のこの水の変化は大きく減少し、T46V/D96N でもとに戻る⁴⁴⁾。Thr46 とペアを作る Asp96 とシッフ塩基との間の橋渡しをする水の水クラスターの形成にかかわっているとみられる (図4L)。L を安定にする V49A, L93M, W182F では、FTIR でみられるこの水の変化が大きくなる⁵⁰⁾。側鎖を小さくすると、これらの残基とシッフ塩基に囲まれた領域に水を入れる空間がひろがり、L の C 側の構造保持につながっていると思われる。

以上の結果は、L の水クラスターは一方でシッフ塩基と相互作用し⁵¹⁾、他方では Asp96 のところまで延びていることを示す⁵²⁾ (図4L)。高い振動数からみて、構成する水分子は強い水素結合で結びついているのではなく、タンパク質の作る空洞 (cavity) を埋めて、シッフ塩基のプロトン化を含む L に特異なコンホメーションを安定にしていると考える。

5. M では水クラスターがシッフ塩基から離れる

M の FTIR スペクトルには、L でみられた水クラスターに相当する振動バンドはなく、代わりに 3671 cm^{−1} という高い振動数に、水素結合を失った水の O—H 伸縮振動のバンドが認められる⁵³⁾ (図3a)。このバンドは、シッフ塩基から 1 nm ほど離れ、Asp96, Thr46 とともに L の空洞のふたをしている Phe219 (図5) を置換した F219L で小さくなる。F219L の結晶解析モデルには、Phe219 の側鎖にあたる部分に3分子の水がみられる⁵⁴⁾ことから、野生型の場合には Phe219 の近傍に空洞が生じ、それを水数分子が埋めていると考えられる。よりシッフ塩基の近くにある

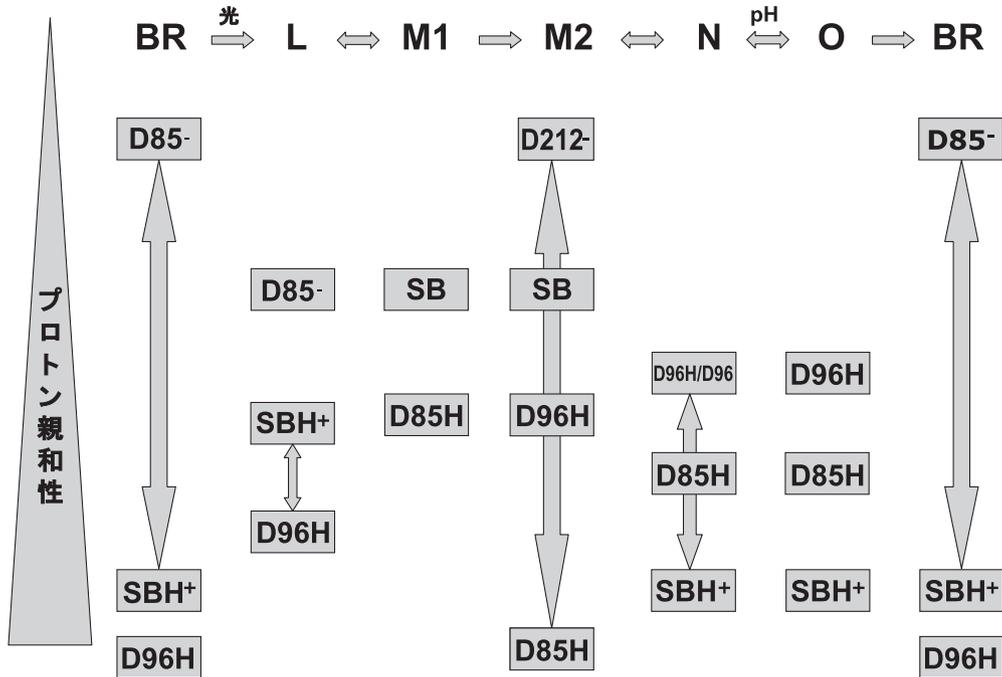


図4 Asp96, シッフ塩基, Asp85 の BR および各中間体におけるプロトン親和性と pH 7 でのプロトン化状態の変化

プロトン親和性の大小として概念的に示したので、厳密な pKa 値ではない。下の方に向けて親和性が大きく、pKa で 3 以下から 11 以上にわたる。両矢印は水がプロトンへの親和性を与える相互作用に関与することを示す。SB はシッフ塩基、SBH⁺ はプロトン化シッフ塩基を示す。

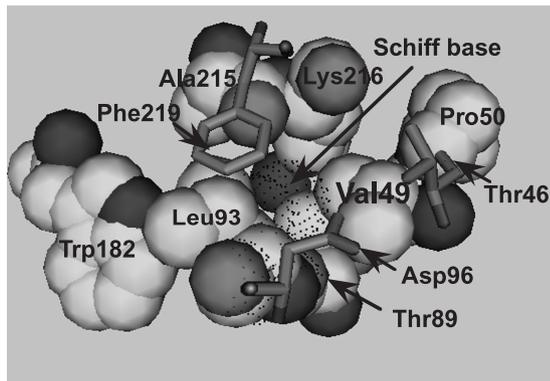


図5 L のシッフ塩基の C 側から見下した構造 (PDB ; lucq⁴²⁾ により PyMol⁴⁷⁾ を用いて作図)

M における Leu93, Val49 の側鎖 (PDB : liw9⁸⁰⁾) を、その下のシッフ塩基がみえるようにドットで示す。

Val49 の置換では影響される水分子はなく^{53,55)}、結晶解析の結果も合わせて、M ではシッフ塩基のそばには水分子はないものとみられる。

L では、Leu93, Val49 の側鎖がフリップし、水のクラスターをいれるスペースをつくる。M になるとその側鎖がドットで示すように空洞を塞ぎ (図 5)、水を排除する。図 5 の L のモデルには示していないがこの場所に 4 分子の水のクラスターがあり^{42,43)}、このような構造が C 側を向いて他に支えをもたない、L のプロトン化シッフ塩基を安

定にしていることが結論される。この構造の安定化に寄与していた水クラスターがなくなるとともに、シッフ塩基のプロトンに対する親和性は減少して M になる^{53,55)} (図 4-M₁, M₂)。小さくて動きやすい、しかも極性の水分子をスパーサー、あるいはコファクターとして、中間体の間の速い構造変化を行っていると考えられる。

L の別の結晶解析モデル^{56,57)} には C 側の水のクラスターはない。結晶と native な膜標品の違いもさることながら、X 線によりレチナルが損傷を受けた可能性⁴²⁾ がこの違いの最も大きな原因と考えている。

6. 室温の L のゆるい水クラスター

BR を 230 K で光照射すると M が安定にできる。ところが 170 K での光照射でえた L を 230 K に暖めても M に変化せず、もとの BR にもどる⁵⁸⁾。水との相互作用のために、シッフ塩基が強くプロトン化状態に保たれているためと推測される。それでは室温の L ではどうなっているか。室温での時間分解 FTIR スペクトルには、L が存在する時間帯に重なって、光で励起されたレチナルからのエネルギーで熱せられた水分子、タンパク質部分の変化が現れる^{31,59)}。その中に L と M の変換に追従して変化する、より高い振動数の、水素結合の極めて弱い数分子の水の変化が捉えられる (図 3b)¹⁴⁾。室温で L と N のシッフ塩基の N-H が同じような水素結合を形成して C 側を向いてい

ること、Nで水クラスターと相互作用していること、Thr46, Leu93, Val49などのC側の空洞を囲むアミノ酸の置換でL, Nがそれぞれ安定になることなどから、このLの水分子はC側の空洞を埋めているクラスターに相当し、C側を向いたLのシッフ塩基のプロトン化を助けていると考えられる¹⁴⁾(図4-L)。低温では水クラスターにより阻害されていたMへの変換が、ゆるい水の構造をもつ室温では進行するというのである。このようなLに特異な水の変化は室温では見出されないとの報告がある³¹⁾が、水の振動バンドを示すために水和を減らした³¹⁾が原因になっていると思われる^{13,14,60)}。正常な水和はプロトンポンプの機能にも重要である⁶¹⁾。

7. 似た構造をもつLとN

170KでのLのシッフ塩基は、歪んだ構造をしている^{62,63)}。しかし室温でのLのFTIRの結果は、歪みのないNのシッフ塩基の構造に似ていることを示す¹⁴⁾。共にシッフ塩基のN—HをC側に向け、その変角振動の振動数からみて、同じ程度の強さの水素結合を形成している。その相手は170KでのLと同じように、シッフ塩基からAsp96との間に形成された水クラスター(図4-N)であることが、FTIRの結果から示される⁶⁴⁾。

Lの場合と同じように、Nでも水クラスターを囲むタンパク質部分がコンホメーション変化を起こしている。FTIRの結果では、LおよびNでVal49—Pro50のペプチド結合の変化がみられる^{53,65)}。この変化はV49Aでみえなくなる。このことは、Nの生成にともないVal49の側鎖がバックボーンを変形させる形でフリップし、水クラスターをいれる場所を作ること示唆する。Nが著しく安定になるV49Aを使ったNの結晶解析のモデル⁵⁴⁾では、シッフ塩基からAsp96に至る水のクラスターが認められ、前述のLの場合と同じくLeu93の側鎖がフリップし、Val49がAlaに代わって生じた隙間と共に、水をいれる場所を作っている。

このようにLとNとは、シッフ塩基がC側の水クラスターと相互作用した、互いに似た構造をもっている。水クラスターを失ってシッフ塩基のプロトンを保持できなくなったMを中において、動き易くかつ極性の水分子が移動してL, Nの構造をMに対して安定にする。L \leftrightarrow M, M \leftrightarrow Nそれぞれの間の変換をこのように説明する^{13,41,43,53)}(図4)。

8. 一方向へのプロトン移動

一方向へのプロトン移動は、シッフ塩基がAsp96からのみプロトンをとってMからNに進み、Asp85に移ったプロトンがシッフ塩基には戻らず、再びLをつくらないことでもたらされる。動力学的な解析から、L \leftrightarrow M, M \leftrightarrow N

二つの平衡の間には大きな自由エネルギーの差があり、逆戻りできない⁶⁶⁾(図4)。各々のMの構造上の違いは分からないが、M₁, M₂と区別され、Lと共存するのがM₁、そのあとにNと共存するのがM₂と考えられている。Mの段階でもたらされる自由エネルギーの低下は、どのような分子機構によるかが問われる。

9. Asp85の高いプロトン親和性(1)

BRのAsp85はプロトン化されていない。そのpK_aは、Asp85のプロトン化により、レチナルシッフ塩基の吸収スペクトルが長波長にシフトし、紫色が青色に変換するpHで、 ~ 3 と見積もられる⁶⁷⁾。Mの生成にともないPRGからのプロトンの放出が起こる。暗黒中でのBRの滴定から、Asp85が解離している状態でのPRGのpK_aは ~ 9 である²⁷⁾。PRGからプロトンが解離すると近傍でのプラスの電荷が一つ減り、Asp85のpK_aを下げている静電的相互作用が減少して、Asp85のpK_aが7付近に上昇する。レチナルの異性化もシッフ塩基の脱プロトン化もない条件で、もう一つの解離基、PRGとの相互作用だけで、Asp85に ~ 3 から ~ 7 までのpK_aの上昇がもたらされる。逆にAsp85がプロトン化するとPRGのpK_aは ~ 6 に低下する⁶⁸⁾。pH6以下の光サイクルでは、Mの生成に同期したPRGからのプロトンの遊離が起こらず、PRGのpK_aが ~ 4.5 に下がったOで起こる⁶⁹⁾。

好塩菌には、バクテリオロドプシンに似た構造をもつハロロドプシン⁷⁰⁾がある。塩素イオンを結合し⁷¹⁾、反対方向に運ぶ⁷²⁾。Asp85に代わるThrとシッフ塩基の間に、塩素イオンが結合している⁷³⁾。バクテリオロドプシンのD85Tでも効率は悪いが同じように塩素イオンを運ぶ⁷⁴⁾。このことからバクテリオロドプシンは水酸イオンを逆方向に運んでいるのではないかという仮説が提唱されている^{38,75)}が、証拠はない。

10. Asp85の高いプロトン親和性(2)

このようにPRGからのプロトンの放出はAsp85のプロトン親和性を上げ、シッフ塩基からのプロトンを受け入れる環境を整える。しかし、MからNへの過程でAsp85からの逆流がないことは、MのAsp85のpK_aが、Asp96の解離する前のNのシッフ塩基のpK_a ~ 8 ⁷⁶⁾よりも高いことを意味する。pH10でもMができること^{62,77,78)}は、Asp85へのプロトン親和性が静電相互作用から考えられた ~ 7 よりも高く、Asp85がシッフ塩基のプロトンを受け取り、逆流させないで保持できることを示唆する。

PRGの解離とAsp85のプロトン化との関係にどのような構造的な変化が介在しているか、分光学的手法によってえられた結果を、BRの状態でのE側領域における結晶解析モデルによって説明する(図6)。Asp85の近くにある

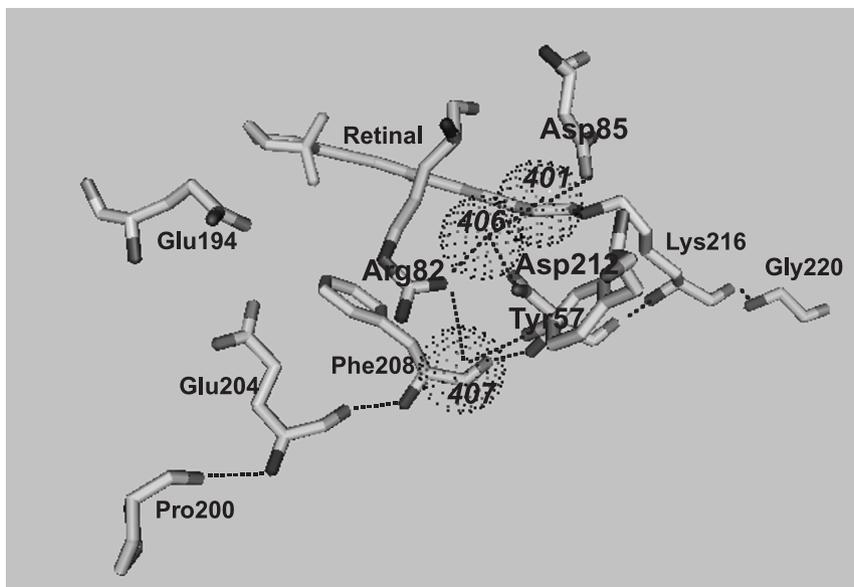


図6 BRのシッフ塩基のE側の構造 (PDB; 1c3w⁸⁾により PyMol⁷⁾を用いて作図)
ドットの円は水分子, 斜体の数字は Luecke⁸⁾らにより定義された水分子の番号, 点線は期待される水素結合を示す.

Arg82の窒素は, 水分子をはさんで Asp212, Tyr57の酸素と相互作用している. Arg82を置換するとMの生成が速くなることから, Arg82が遠ざかることがMでの Asp85へのプロトンの親和性の増加に働いていることが示唆される^{27,79,80)}. BRで Asp212および Tyr57の方を向いていた Arg82の側鎖が, Mで Glu194の方に向きを変えて PRGの pK_a を下けている. Arg82がスイッチとして働いていることを示す.

同件事象を Takeda らのMの結晶解析モデル⁸¹⁾は次のように説明する. Mの生成にともないシッフ塩基に連なる Lys216の側鎖も変形し, 図6に示す Lys216と Gly220との間の水素結合が切断され, Lys216から Pro200に至る Helix GがE側の方向に移動する. その結果 Helix Gにある Glu204と, 隣り合った Helix Fにある Glu194の間の相互作用がMでは変化し, Glu194が向きを変える. E194QではMにおける Asp85のプロトン親和性が弱くなることから⁸²⁾, Glu204から離れた Glu194が Arg82を引き寄せられていることが示唆される.

11. Asp85のまわりに起こる変化

Asp85の近くにある Asp212と Arg82の電荷対を, それぞれ中性残基に置換した D212Nと R82Qの二重変異タンパク質では, Mは見かけ上検出されない⁸³⁾. レチナルのシッフ塩基のとなりにある $C_{14}-H$ をフッ素化し, シッフ塩基のプロトン親和性を下げるとMが検出できるようになることから, D212NのMでは Asp85へのプロトン親和性が下がり, LとMの間の平衡がLの側によっていると解釈される. 似たことは, Asp212と相互作用している

Tyr57を置換した Y57Nでも認められる⁸⁴⁾. Asp212と Tyr57はいずれもMでの Asp85のプロトン親和性の上昇に寄与することを示す.

これらの残基の位置関係を結晶構造モデルからみる (図6). BRの Asp85は2分子の水をはさんで, Asp212, Arg82と相互作用している. Tyr57は Asp212のカルボキシル基の酸素に配位している. Tyr57, Asp212の酸素はさらにそれぞれ水分子をはさんで Arg82の窒素と相互作用している. Mの生成速度に対する重水素置換の効果が R82Aでは大きく減少すること⁸⁵⁾から, Mの生成にともなって Arg82の関与する水素結合が減少することが分かる.

Tyr57の酸素はさらに, Helix Gにある Phe208の骨格の酸素に近接している (図6), Mで Helix Gが動いたときに影響を受けていることが考えられる. Mの生成にともない, 1700 cm^{-1} 付近のペプチド骨格の $C=O$ によるとみられる振動バンドが消失する⁸⁶⁾. このバンドは Tyr57に影響されていることが, Liu らの論文²¹⁾の Figure 5に現れている. 野生型で Tyr57からのプロトンの遊離は起こらない²¹⁾が, Y57Dではシッフ塩基の代わりに Asp57からプロトンが遊離する⁸⁷⁾. Helix Gの Pro200, Val210をそれぞれ Thr, Tyrに変え, 後述する SRIIのトランスデューサーである HtrIIを相互作用させると, Mの寿命が400倍ほど長くなる⁸⁸⁾. Helix Gで Val210の反対側には Tyr57に近い Phe208がある. 以上の事実は, Helix Gが Tyr57, Asp212の側鎖を通じてMでの Asp85のプロトン化状態の安定化に寄与していることを示唆する.

12. 一方向へのプロトン移動—水的作用

結晶解析モデルによると, Asp85のカルボキシル基の酸素の一つはBRの状態ではThr89と相互作用しているが, MではAsp85の側鎖がフリップして水素結合が作りにくい形に変わる. Asp85のC=O結合による高い振動数 1761 cm^{-1} (図3a)は, そのカルボキシル基がかなり完全な二重結合を保持した状態になっていることを示す. Thr89の重原子置換やAsnへの置換で影響をうけること^{89,90}から, この酸素はThr89の方を向いていると思われる. このことはもう一方の酸素ではC—OHの方がより安定になること, すなわちAsp85のプロトン親和性が高いことを意味する. BRではこの酸素には2個の水分子, Water402, Water401が相互作用している(図2)が, レチナールの異性化によってシッフ塩基のN—Hの向きが変わり, Water402が支えを失って消失する. LのAsp85では, 相互作用していたWater402がなくなり, シッフ塩基のプロトン親和性が上昇していると思われる. pH3でも解離したままなのは, Lが存在する時間が0.1msとプロトン化を起こすには短すぎるためであろう. 分子動力学による理論計算⁹¹から, Water402の消失が, MのAsp85のプロトンに対する親和性の増加に大きく寄与していることが示される.

またMの生成と共に 3657 cm^{-1} (図3a)に水素結合の形成に関与しない水のO—H伸縮振動が現れる¹⁴. Arg82の置換で消失する⁹²ことから, Arg82とAsp212, Asp85の間にあった水分子(図6)Water406が, Arg82から離れたことを示唆する. Arg82から離れたAsp85とAsp212は, 水分子(Water401)とTrp86を中にはさんで^{54,81}新たな複合体を作り(図7, 図4M₂), Asp85のプロトン化型を安定にしていると解される¹³. Asp212のカルボキシル基の二つの酸素は, それぞれTyr57, Tyr185と相互作用していて, 前者はAsp85のプロトン化状態を安定にする²⁸.

13. NからBRでのプロトンの移動

NではAsp85のC=Oの振動数は 1756 cm^{-1} に下がる⁶². カルボキシル基全体が解離型の方向によったことを示し, Asp85のプロトン親和性の低下を反映していると思われる(図4-N). Nのシッフ塩基はプロトン化されていて, もはやAsp85からのプロトンの逆流はない(図4-N). 続くOは, Nで解離していたAsp96が細胞質からプロトンをとって生じ, pHに依存してNと平衡にある⁶⁹(図4-O). OからBRにもどる過程でAsp85のプロトンは, 解離していたPRGを再プロトン化する. その中間にAsp85のプロトンがAsp212に移った状態, O'が捉えられる^{93,94}. Arg82をAsp212から離しにくくするE194Q⁹²でこの状態がより安定に捉えられることから, Mで離れたAsp212とArg82の相互作用が復活したものであろう. Asp212は,

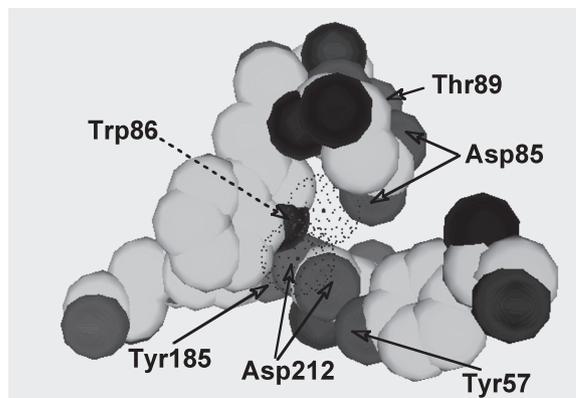


図7 MのAsp85, Asp212, Trp86を中心にしたMの構造(PDB; 1i9w⁸⁰)によりPyMol⁷を用いて作図

ドットの円は水分子を示す. それぞれの残基の側鎖の酸素原子を実線の矢印, 窒素原子を点線の矢印で示す.

Arg82およびTyr57というPRGの構成メンバー(図6)につながっており, おそらくプロトンがもとに戻る中間状態が捉えられていると考えられる. Oではレチナールの異性化により, シッフ塩基のN—HがBRのそれと同じようにAsp85の方を向き, Asp85のプロトン親和性を減少させ, そのプロトンをAsp212に引き渡すということであろう.

14. Asp96からのプロトンの解離

11以上という異常に高いAsp96の pK_a ⁹⁵(図4BR)は, 何によってもたらされているか. BRでのAsp96のC=O伸縮振動のD₂O置換によるシフトが小さいことは, モデルとの比較からカルボキシル基のC—OH部分が水素結合に関与していることを示唆する³³. 結晶解析の結果によると, BRでのAsp96のC—OHは, Thr46の酸素にプロトンを与える形で水素結合を形成している⁸. Asp96のBRでの高い pK_a はこの水素結合によると思われる. LおよびNでは, シッフ塩基と間の水クラスターによりこの水素結合がゆるみ, pK_a はNでは7付近にまで下がり^{69,96}(図4N), そのプロトンはシッフ塩基に移される. Lでも同じような変化を受けていると思われるが, 平衡に至る以前の短時間でMになることでプロトンの解離には至らない¹⁴ためと考えている. MのAsp96はpH7では水素結合の変化を受けている¹⁴が, アルカリ性では部分的にしか受けておらず^{55,97}, pHに依存して異なった構造のMが捉えられている可能性を示す.

このような水素結合の形成によりカルボキシル基が高い pK_a をえている例には, BRでThr90および水分子と水素結合を作っているAsp115⁹⁵にもみられる. これらの結果はMの生成にともなうAsp85の高い pK_a も, 水との水素結合によっているという上に述べた考えを支持する.

15. プロトンの移動

プロトンを与えるシッフ塩基のN—HがLでC側を向き、プロトンを受け取る Asp85 から離れているため、LからMへの過程でプロトンの受け渡しができないのではないかと疑問が生じる。これまでも、N—HがE側を向いて歪んだレチナルの構造をもったLのモデルが提案されたが⁵⁷⁾、ここで述べてきたような分光学による実験事実には合わない¹³⁾。理論計算からは、N—HがC側を向いたモデルでプロトン移動の速度は一応説明されている⁹⁸⁾。関与する残基の原子の位置が、LからMへの過程の中で揺動していることも大きな要素である。

MからNに変換するとき、1 nm離れた Asp96 からシッフ塩基にどのようにプロトンが渡されるかという問題がある。V49Aで Asp96 がプロトン化されていると思われる状態でのNで、シッフ塩基から Asp96 に至る5分子よりなる水の連鎖がみられる⁵⁴⁾。またこの水の連鎖は野生型のNでもあることがFTIRによる結果から示唆されている⁶⁴⁾。ただNで見出される水のクラスターはむしろ構造の安定化に働いているというのが、著者の見解である。

実際のプロトン移動はLとM、あるいはMとNの間の遷移状態で起こる。その構造は結晶解析でも分光学的な手法でも見つけられていない。考えられる方法は分子動力学の手法である。今のところバクテリオロドプシンについては200 psのKとK_iまでしか扱われていない⁹⁹⁾が、最近この方法がマイクロ秒の領域にまで拡大され、Na⁺/H⁺ antiporterの機構に立ち入った考察が加えられるようになってきた¹⁰⁰⁾。このシミュレーションには、関与する力やエネルギーが含まれてくるので、変化が起こる理由も質すことができる¹⁰¹⁾。ただこの手法は結晶解析による構造モデルを出発点とし、量子化学的計算を適用する原子の数はかなり限定的になるので、どのようなモデルから出発するか、生化学的、分光学的データを正しく理解する必要がある。その結果についてもFTIR法その他による検証が欠かせない。固体NMRによるレチナルの正確な構造決定^{38,102)}も重要な寄与をなすであろう。

16. 情報伝達タンパク質と水分子

バクテリオロドプシンはプロトン駆動力を作って、細胞にエネルギーを供給するタンパク質である。一方、視覚に与えるロドプシンはGPCRに属する。ロドプシンに光で起こされた変化はGタンパク質を通じて細胞の電位変化に変換され、光情報の伝搬に関与する¹⁰³⁾。この両者は全く異なった進化経路をたどってきたが、ロドプシンもそのシッフ塩基のプラスの電荷に対応したGlu113のマイナスの電荷をもち、ミリ秒段階で生じるメタロドプシンIIで、プロトンがGlu113に移る。それがGタンパク質を活性化する

状態になるときに、細胞質からプロトンを取り込む。ただプロトンの放出はなく、不完全なポンプである¹⁰⁴⁾。

ロドプシンのレチナルのC側にあるプロトン化したカルボン酸 Asp83 と Gly120 のC=Oの間を水分子がつなぎ、さらにこれが別の水とともにシッフ塩基の対電荷であるGlu113に連なっていることが、FTIR分光法による研究から示唆された¹⁰⁵⁾。このようなタンパク質の内部にある水分子のクラスターは、GPCRに属するウシのロドプシン¹⁰⁶⁾、 β_2 -adrenergic receptor¹⁰⁷⁾、イカのロドプシン¹⁰⁸⁾の結晶モデルでも確認され、速やかな構造変化に対応する mediatorと考えられている。このクラスターの中にプロトンを取り込む場所がある可能性は既に論じている¹⁶⁾。

より近縁のシグナル伝達に関与するタンパク質は、同じバクテリアにあるセンサーロドプシン (SRI)¹⁰⁹⁾およびフォボロドプシン (SRIIあるいはPR)¹¹⁰⁾で、走光性、あるいは忌光性のレセプターであるセンサーロドプシン、SRIとSRIIである¹⁰⁷⁾。いずれもレチナルをもつ7本のヘリックスよりなる膜貫通のタンパク質で、それぞれのシグナル状態で、対応するトランスドューサー、HtrIあるいはHtrIIの変化を通じて、鞭毛のモーターの動きを制御する¹¹¹⁾。これらのレチナルタンパク質でのシッフ塩基の対イオンのpK_a=7.1は、バクテリオロドプシンのAsp85より著しく高く、アルカリ性でのみプロトンポンプの機能が発現する。この機能はトランスドューサーとの結合によって阻害される^{112,113)}。対応する水分子の変化は興味ある問題である。

17. ひろがるプロトンポンプの世界

21世紀に入り、メタゲノムの手法により、海洋細菌にバクテリオロドプシンに似た遺伝子が見つかり、プロテオロドプシンと名付けられ¹¹⁴⁾、海洋における主要なエネルギー源の一つと推定されている。プロテオロドプシンは大きく二種に分けられる。一つは、緑色の光を吸収するGPRで、BRと同じように光でプロトンを一方向に運ぶ。もう一つはハワイ沖の水深75mの所や南極海からとられた青色の光を吸収するBPRで、SRIIに似ている¹¹⁵⁾。PRのシッフ塩基からのプロトンを受容するAsp97の光受容前のpK_aは7.1で、アルカリ性でのみプロトンポンプの機能が発現する¹¹⁶⁾。弱アルカリ性にある海洋の環境に適応したためといわれる。シッフ塩基を再プロトン化するプロトン供与のための残基は、Glu108である。基本的にはシッフ塩基はまずプロトンをE側にある脱プロトン化したカルボキシル基に与え、そのあとC側にあるプロトン化したカルボキシル基からとるということは保存されている。

エネルギーを使ってプロトンを運び、逆にプロトンを動かしてエネルギーを作るタンパク質には、F型ATP合成酵素、P型ATPaseがあるが、いずれもバクテリオロドプ

シンの場合のように、カルボキシル基のプロトン化、脱プロトン化にアルギニンがスイッチとして働いている。ただバクテリオロドプシンと違い、エネルギーとカップルするATPを加水分解するサイト、リン酸化されるサイトは離れていて、遠距離にわたるタンパク質部分のコンホメーション変化を通じて行われている^{117,118)}。

18. バクテリオロドプシンのこれから

比較的小分子であることにもまして光で駆動されるバクテリオロドプシンは、分子内部の詳細に立ち入ることのできる非侵襲的な分光学的な方法が、最も理想的な形で適用されるタンパク質である。プロトンポンプという機能の発見から始まり、遺伝子操作技術の進展にも助けられたプロトン移動経路の解明に続いて、一方向性のプロトン移動がどのようなメカニズムで起こるかということを論じてきた。次の段階として、何故という問題が控えていて、分子動力学によるプロトン移動の素過程のより詳細な分子機構の解明が続くように思われる。実験データに基づいて導きだされた理論的な予言による機構の提案には、必ず実験による確認が必要になる。それが比較的容易にできるのがバクテリオロドプシンである。

タンパク質間の相互作用のようなアミノ酸レベルの選択には、自然は各々の目的に応じて対応しており、多様性を与えた代わりに統一性が見出されにくい。一方、ここで目指す一方向性のメカニズムは自然界を支配する熱力学の問題と化学機構の分野であり、よくデザインされたタンパク質であるバクテリオロドプシンの研究を通じてえられる知見は、広く他のタンパク質のメカニズムの解明にも寄与するであろうことを信じている。

謝辞：ワシントン大学 Ebrey 教授，イリノイ大学 Gennis 教授，カリフォルニア大学アーバイン校 Lanyi 教授，Balashov 博士，京都大学の吉澤教授から七田教授に至る，著者も属した理学部生物物理学教室，協力を頂いた各研究室の方々に感謝します。

文 献

- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1971) *Nature New Biol.*, **233**, 149–152.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2853–2857.
- Henderson, R. & Unwin, P.N. (1975) *Nature*, **257**, 28–32.
- Kushwaha, S.C., Kates, M., & Martin, W.C. (1976) *Can. J. Biochem.*, **53**, 284–292.
- Corcelli, A., Lattanzio, V.M., Mascolo, G., Papadia, P., & Fanizzi, F. (2002) *J. Lipid Res.*, **43**, 132–140.
- Essen, L.-O., Siegert, R., Lehmann, W.D., & Oesterhelt, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11673–11678.
- DeLano, W. (2002) PYMOL, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., & Lanyi, J.K. (1999) *J. Mol. Biol.*, **291**, 899–911.
- Kobayashi, T., Saito, T., & Ohtani, H. (2001) *Nature*, **414**, 531–534.
- Sasaki, J., Yuzawa, T., Kandori, H., Maeda, A., & Hamaguchi, H. (1995) *Biophys. J.*, **68**, 2073–2080.
- Lozier, R.H., Bogomolni, R.A., & Stoekenius, W. (1975) *Biophys. J.*, **15**, 955–963.
- Smith, S.O., Lugtenburg, J., & Mathies, R.A. (1985) *J. Membrane Biol.*, **85**, 95–109.
- Morgan, J.E., Gennis, R.B., & Maeda, A. (2008) *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1038–1045.
- Morgan, J.E., Vakkasoglu, A.S., Gennis, R.B., & Maeda, A. (2007) *Biochemistry*, **46**, 2787–2796.
- Maeda, A. (1995) *Isr. J. Chem.*, **35**, 387–400.
- Maeda, A. (2001) *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 1256–1268.
- Barth, A. & Zscherp, C. (2002) *Quart. Rev. Biophys.*, **35**, 369–430.
- Engelhard, M., Gerwert, K., Hess, B., Kreutz, W., & Siebert, F. (1985) *Biochemistry*, **24**, 400–407.
- Braiman, M.S., Mogi, T., Marti, T., Stern, L.J., Khorana, H. G., & Rothschild, K.J. (1988) *Biochemistry*, **27**, 8516–8520.
- Fahmy, K., Weidlich, O., Engelhard, M., Sigrist, H., & Siebert, F. (1993) *Biochemistry*, **32**, 5862–5869.
- Liu, X.-M., Sonar, S., Lee, C.-P., Coleman, M., RajBhandary, U.L., & Rothschild, K.J. (1995) *Biophys. Chem.*, **56**, 63–70.
- Matsui, Y., Sakai, K., Murakami, M., Shiro, Y., Adachi, S., Okumura, H., & Kouyama, T. (2002) *J. Mol. Biol.*, **324**, 469–481.
- Heberle, J. & Dencher, N.A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5996–6000.
- Brown, L.S., Sasaki, J., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R., & Lanyi, J.K. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 27122–27126.
- Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Ebrey, T.G., Chen, N., Menick, D.R., & Crouch, R.K. (1997) *Biochemistry*, **36**, 8671–8676.
- Garczarek, F., Brown, L.S., Lanyi, J.K., & Gerwert, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3633–3638.
- Balashov, S.P., Govindjee, R., Kono, M., Imasheva, E.S., Lukashov, E., Ebrey, T.G., Crouch, R.K., Menick, D.R., & Feng, Y. (1993) *Biochemistry*, **32**, 10331–10343.
- Govindjee, R., Kono, M., Balashov, S.P., Imasheva, E., Sheves, M., & Ebrey, T.G. (1995) *Biochemistry*, **34**, 4828–4838.
- Rammelsberg, R., Huhn, G., Lüben, M., & Gerwert, K. (1998) *Biochemistry*, **37**, 5001–5009.
- Garczarek, F. & Gerwert, K. (2006) *Nature*, **439**, 109–112.
- Lórenz-Fonfría, V.A., Furutani, Y., & Kandori, H. (2008) *Biochemistry*, **47**, 4071–4081.
- Zundel, G. (2000) *Adv. Chem. Phys.*, **111**, 1–217.
- Maeda, A., Sasaki, J., Shichida, Y., Yoshizawa, T., Chang, M., Ni, B., Needleman, R., & Lanyi, J.K. (1992) *Biochemistry*, **31**, 4684–4690.
- Hessling, B., Souvignir, G., & Gerwert, K. (1993) *Biophys. J.*, **65**, 1929–1941.
- Otto, H., Marti, T., Holz, M., Mogi, T., Stern, L.J., Engel, F., Khorana, H.G., & Heyn, M.P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1018–1022.
- Sheves, M., Albeck, A., Friedman, N., & Ottolenghi, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3262–3266.

- 37) Deng, H., Huang, L., Callender, R.H., & Ebrey, T.G. (1994) *Biophys. J.*, **66**, 1129–1136.
- 38) Herzfeld, J. & Lansing, J.C. (2002) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **31**, 73–95.
- 39) Maeda, A., Tomson, F.L., Gennis, R.B., Ebrey, T.G., & Balashov, S.P. (1999) *Biochemistry*, **38**, 8800–8807.
- 40) Maeda, A., Balashov, S.P., & Ebrey, T.G. (2005) In *Light Sensing in Plants* (Wada, M., Shimazaki, K., & Ino, M. eds.) pp. 213–221, Springer Verlag, Tokyo.
- 41) Maeda, A., Morgan, J.E., Gennis, R.B., & Ebrey, T.G. (2006) *Photochem. Photobiol.*, **82**, 1396–1405.
- 42) Kouyama, T., Nishikawa, T., Tokuhisa, T., & Okumura, H. (2004) *J. Mol. Biol.*, **335**, 531–546.
- 43) 前田章夫, 神山 勉 (2007) 蛋白質 核酸 酵素, **52**, 1314–1321.
- 44) Yamazaki, Y., Hatanaka, M., Kandori, H., Sasaki, J., Karstens, W.F.J., Raap, J., Lugtenburg, J., Bizounok, M., Herzfeld, J., Needleman, R., Lanyi, J.K., & Maeda, A. (1995) *Biochemistry*, **34**, 7088–7093.
- 45) Yamazaki, Y., Sasaki, J., Hatanaka, M., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R., Shinada, T., Yoshihara, K., Brown, L.S., & Lanyi, J.K. (1995) *Biochemistry*, **34**, 577–582.
- 46) Brown, L.S., Gat, Y., Sheves, M., Yamazaki, Y., Maeda, A., Needleman, R., & Lanyi, J.K. (1994) *Biochemistry*, **33**, 12001–12011.
- 47) Kandori, H., Yamazaki, Y., Hatanaka, M., Needleman, R., Brown, L.S., Richter, H.-T., Lanyi, J.K., & Maeda, A. (1997) *Biochemistry*, **36**, 5134–5141.
- 48) Maeda, A., Sasaki, J., Shichida, Y., & Yoshizawa, T. (1992) *Biochemistry*, **31**, 462–467.
- 49) Kandori, H. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 177–191.
- 50) Maeda, A., Tomson, F.L., Gennis, R.B., Balashov, S.P., & Ebrey, T.G. (2003) *Biochemistry*, **42**, 2535–2541.
- 51) Maeda, A., Balashov, S.P., Lugtenburg, J., Verhoeven, M.A., Herzfeld, J., Belenky, M., Gennis, R.B., Tomson, F.L., & Ebrey, T.G. (2002) *Biochemistry*, **41**, 3803–3809.
- 52) Maeda, A., Herzfeld, J., Belenky, M., Needleman, R., Gennis, R.B., Balashov, S.P., & Ebrey, T.G. (2003) *Biochemistry*, **42**, 14122–14129.
- 53) Yamazaki, Y., Kandori, H., Needleman, R., Lanyi, J.K., & Maeda, A. (1998) *Biochemistry*, **37**, 1559–1564.
- 54) Schobert, B., Brown, L.S., & Lanyi, J.K. (2003) *J. Mol. Biol.*, **330**, 553–570.
- 55) Maeda, A., Tomson, F.L., Gennis, R.B., Kandori, H., Ebrey, T.G., & Balashov, S.P. (2000) *Biochemistry*, **39**, 10154–10162.
- 56) Edman, K., Royant, A., Larsson, G., Jacobson, F., Taylor, T., van der Spoel, D., Landau, E.M., Pebay-Peyroula, E., & Neutze, R. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 2147–2158.
- 57) Lanyi, J.K. & Schobert, B. (2007) *J. Mol. Biol.*, **365**, 1379–1392.
- 58) Iwasa, T., Tokunaga, F., & Yoshizawa, T. (1980) *Biophys. Struct. Mech.*, **6**, 253–270.
- 59) Garczarek, F., Wang, J., El-Sayed, M., & Gerwert, K. (2004) *Biophys. J.*, **87**, 2676–2682.
- 60) Chizhov, I., Chenavskii, D.S., Engelhard, M., Mueller, K.-H., Zubov, B.V., & Hess, B. (1996) *Biophys. J.*, **71**, 2329–2345.
- 61) Váró, G. & Kesthelyi, L. (1983) *Biophys. J.*, **43**, 47–51.
- 62) Pfefferlé, J.-M., Maeda, A., Sasaki, J., & Yoshizawa, T. (1991) *Biochemistry*, **30**, 6548–6556.
- 63) Hu, J.G., Sun, B.Q., Petkova, A.T., Griffin, R.G., & Herzfeld, J. (1997) *Biochemistry*, **36**, 9316–9322.
- 64) Maeda, A., Gennis, R.B., Balashov, S.P., & Ebrey, T.G. (2005) *Biochemistry*, **44**, 5960–5968.
- 65) Yamazaki, Y., Tuzi, S., Saitô, H., Kandori, H., Needleman, R., Lanyi, J.K., & Maeda, A. (1996) *Biochemistry*, **35**, 4063–4068.
- 66) Váró, G. & Lanyi, J.K. (1991) *Biochemistry*, **30**, 5008–5015.
- 67) Kelemen, L., Galajda, P., Szaraz, S., & Ormos, P. (1999) *Biophys. J.*, **76**, 1951–1958.
- 68) Zimányi, L., Váró, G., Chang, M., Ni, B., Needleman, R., & Lanyi, J.K. (1992) *Biochemistry*, **31**, 8535–8543.
- 69) Balashov, S.P., Lu, M., Imasheva, E.S., Govindjee, R., Ebrey, T.G., Othersen III, B., Chen, Y., Crouch, R.K., & Menick, D. R. (1999) *Biochemistry*, **38**, 2026–2039.
- 70) Mukohata, Y. & Kaji, Y. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**, 72–76.
- 71) Ogurusu, T., Maeda, A., Sasaki, N., & Yoshizawa, T. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **682**, 446–451.
- 72) Schobert, B. & Lanyi, J.K. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 10306–10313.
- 73) Kolbe, M., Besir, H., Essen, L.-O., & Oesterhelt, D. (2000) *Science*, **288**, 1390–1396.
- 74) Sasaki, J., Brown, L.S., Chon, Y.-S., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R., & Lanyi, J.K. (1995) *Science*, **269**, 73–75.
- 75) Facciotti, M.T., Rouhani, S., & Glaeser, R.M. (2004) *FEBS Lett.*, **564**, 301–306.
- 76) Brown, L.S. & Lanyi, J.K. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1731–1734.
- 77) Kouyama, T., Nasuda-Kouyama, T., Ikegami, A., Mathew, M. K., & Stoekenius, W. (1988) *Biochemistry*, **27**, 5855–5863.
- 78) Braiman, M.S., Dioumaev, A.K., & Lewis, J.R. (1996) *Biophys. J.*, **70**, 939–947.
- 79) Balashov, S.P., Govindjee, R., Imasheva, E.S., Misra, S., Ebrey, T.G., Feng, Y., Crouch, R.K., & Menick, D.R. (1995) *Biochemistry*, **34**, 8820–8834.
- 80) Govindjee, R., Misra, S., Balashov, S., Ebrey, T., Crouch, R. K., & Menick, D.R. (1996) *Biophys. J.*, **71**, 1011–1023.
- 81) Takeda, K., Matsui, Y., Kamiya, N., Adachi, S.-I., Okumura, H., & Kouyama, T. (2004) *J. Mol. Biol.*, **341**, 1023–1037.
- 82) Lazarova, T., Sanz, C., Querol, E., & Padrós, E. (2000) *Biophys. J.*, **78**, 2022–2030.
- 83) Brown, L.S., Váró, G., Hatanaka, M., Sasaki, J., Kandori, H., Maeda, A., Friedman, N., Sheves, M., Needleman, R., & Lanyi, J.K. (1995) *Biochemistry*, **34**, 12903–12911.
- 84) Govindjee, R., Balashov, S.P., Ebrey, T.G., Oesterhelt, D., Steinberg, G., & Sheves, M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **269**, 14353–14354.
- 85) Brown, L.S., Needleman, R., & Lanyi, J.K. (2000) *Biochemistry*, **39**, 938–945.
- 86) Morgan, J.E., Vakkasoglu, A.S., Lugtenburg, J., Gennis, R.B., & Maeda, A. (2008) *Biochemistry*, **47**, in press.
- 87) Sonar, S., Marti, T., Rath, P., Fischer, W., Coleman, M., Nilsson, A., Khorana, H.G., & Rothschild, K.J. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 28851–28858.
- 88) Sudo, Y. & Spudich, J.L. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16129–16134.
- 89) Kandori, H., Yamazaki, Y., Shichida, Y., Raap, J., Lugtenburg, J., Belenky, M., & Herzfeld, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1571–1576.
- 90) Russell, T.S., Coleman, M., Rath, P., Nilsson, A., & Rothschild, R.J. (1997) *Biochemistry*, **36**, 7490–7497.
- 91) Hayashi, S. & Ohmine, I. (2000) *J. Phys. Chem. B*, **104**, 10678–10691.

- 92) Hatanaka, M., Sasaki, J., Kandori, H., Ebrey, T.G., Needleman, R., Lanyi, J.K., & Maeda, A. (1996) *Biochemistry*, **35**, 6308–6312.
- 93) Dioumaev, A.K., Brown, L.S., Needleman, R., & Lanyi, J.K. (1999) *Biochemistry*, **38**, 10070–10078.
- 94) Zscherp, C., Schlesinger, R., & Heberle, J. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 57–63.
- 95) Száraz, S., Oesterheld, D., & Ormos, P. (1994) *Biophys. J.*, **67**, 1706–1712.
- 96) Zscherp, C., Schlesinger, R., Tittor, J., Oesterheld, D., & Heberle, J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5498–5503.
- 97) Sasaki, J., Lanyi, J.K., Needleman, R., Yoshizawa, T., & Maeda, A. (1994) *Biochemistry*, **33**, 3178–3184.
- 98) Bondar, A.-N., Fischer, S., Smith, J.C., Elstner, M., & Suhai, S. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14668–14677.
- 99) Hayashi, S., Tajkhorshid, E., & Schulten, K. (2002) *Biophys. J.*, **83**, 1281–1297.
- 100) Arkin, I.T., Xu, H., Jensen, M.Ø., Arbely, E., Bennett, E.R., Bowers, K.J., Chow, E., Dror, R.O., Eastwood, M.P., Flitman-Tene, R., Gregersen, B.A., Klepeis, J.L., Kolossváry, I., Shan, Y., & Shaw, D.E. (2007) *Science*, **317**, 799–804.
- 101) Henzler-Wildman, K. & Kern, D. (2007) *Nature*, **450**, 964–972.
- 102) Lansing, J.C., Hohwy, M., Jaroniec, C.P., Creemers, A.F.L., Lugtenburg, J., Herzfeld, J., & Griffin, R.G. (2002) *Biochemistry*, **41**, 431–438.
- 103) 前田章夫 (1996) 視覚のメカニズム, 裳華房.
- 104) Arnis, A. & Hofmann, K.P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7849–7853.
- 105) Nagata, T., Terakita, A., Kandori, H., Shichida, Y., & Maeda, A. (1998) *Biochemistry*, **37**, 17216–17222.
- 106) Li, J., Edwards, P.C., Burghammer, M., Villa, C., & Schertler, G.F.X. (2004) *J. Mol. Biol.*, **343**, 1409–1438.
- 107) Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Yao, X.-J., Weis, W.I., Stevens, R.C., & Kobilka, B.K. (2007) *Science*, **318**, 1266–1273.
- 108) Murakami, M. & Kouyama, T. (2008) *Nature*, **453**, 363–367.
- 109) Spudich, J.L. & Bogomolni, R.A. (1984) *Nature*, **312**, 509–513.
- 110) Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N., & Kobatake, Y. (1985) *FEMS Microbiol. Lett.*, **28**, 161–164.
- 111) Spudich, J.L. (1998) *Mol. Microbiol.*, **28**, 1051–1058.
- 112) Bogomolni, R.A., Stoekenius, W., Szundi, I., Perozo, E., Olson, K.D., & Spudich, J.L. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10188–10192.
- 113) Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K., Sumi, M., & Kamo, N. (2001) *Biophys. J.*, **80**, 916–922.
- 114) Béjác, O., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Leclerc, M., & DeLong, E.F. (2001) *Nature*, **411**, 786–789.
- 115) Wang, W.-W., Sineschekov, O.A., Spudich, E.N., & Spudich, J.L. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 33985–33991.
- 116) Dioumaev, A.K., Brown, L.S., Shih, J., Spudich, E.N., Spudich, J.L., & Lanyi, J.K. (2002) *Biochemistry*, **41**, 5348–5358.
- 117) Fillingame, R.H. & Dmitriev, O.Y. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1565**, 232–245.
- 118) Pederson, B.P., Buch-Pederson, M.J., Morth, J.P., Palmgren, M.G., & Nissen, P. (2007) *Nature*, **450**, 1111–1114.
-