

## アナベナセンサリーロドプシンの光異性化に伴うタンパク質の構造ダイナミクス

(<sup>1</sup>阪大院理, <sup>2</sup>名工大院工) ○稲田誠亮<sup>1</sup>, 水野操<sup>1</sup>, 川鍋陽<sup>2</sup>, 神取秀樹<sup>2</sup>, 水谷泰久<sup>1</sup>

【序】アナベナセンサリーロドプシン(ASR)は、真正細菌である *Anabaena* の遺伝子から発見された古細菌型ロドプシンである。ASR は光センサーとして働き、その発色団はレチナールである。ASR の発色団は、常温では 13-cis, 15-syn 体(13 シス体)あるいは 13-trans, 15-anti 体(全トランス体)で安定に存在する。他の古細菌型ロドプシンとは異なり、ASR の発色団は全トランス体と 13 シス体の中でフォトクロミズムを示す(図 1)。全トランス体と 13 シス体の吸収極大が互いに近いので、明順応状態では 2 つの異性体が混在しており、13 シス体の割合は 70%以上である。一方、暗順応状態では、全トランス体が 98%の割合で存在している。我々は、ASR 発色団のフォトクロミックな性質を利用して、13 シス体から全トランス体、全トランス体から 13 シス体、という双方向の反応に追従するタンパク質ダイナミクスの比較をすることを考えた。13 シス体と全トランス体、それぞれを出発物質とする双方向の構造ダイナミクスを比較することで、タンパク質の構造変化に関する新たな知見が得られると期待される。本研究では、タンパク質ダイナミクスの観測に、時間分解紫外共鳴ラマン(UVRR)分光法を用い、トリプトファン残基のスペクトル変化を観測することを試みた。明順応状態の ASR から起きるタンパク質初期構造変化に由来するスペクトル変化を観測したので、これを報告する。

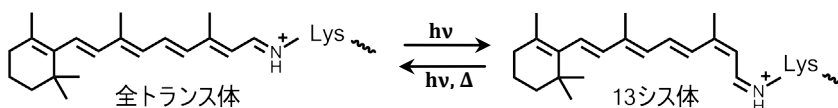


図 1 ASR 発色団のフォトクロミズム反応

【実験】時間分解 UVRR スペクトルの測定は、再生増幅したチタンサファイアレーザー(繰り返し周波数 1 kHz)を用いて、ポンププローブ法で行った。ポンプ光の波長に、ASR の発色団の吸収極大に近い 549 nm(エネルギー 5 μJ)を選択した。プローブ光の波長に、トリプトファン残基のバンドが共鳴効果による強度増大を起こす 225 nm(エネルギー 0.5 μJ)を選択した。装置の時間分解能は約 4 ps であった。ASR は pH 7.0 の緩衝液に可溶化したものを使用した。試料濃度は約 30 μM であった。測定中にサンプルを明順応状態に保つために、サンプルに定常光(波長 ≥ 440 nm)を照射しながら測定した。

【結果】明順応状態の ASR のピコ秒時間分解 UVRR スペクトルを図 2 に示す。各遅延時間におけるスペクトルは、ポンプ光照射によるスペクトル変化を示すため、遅延時間ごとのスペクトルから、プローブ光のみを照射して測定したスペクトルを差し引いた差スペクトルで表わしている。時間分解差スペクトルには、負のバンドが 756、1014、1566 cm<sup>-1</sup> に現れ、時間変化した。これらのバンドは、それぞれトリプトファン残基の振動である W18、W16、W3 モードに帰属される。差スペクトルに現れた負のバンドは、構造変化によりトリプトファンバンドの強度が減少したことを意味している。スペクトル変化を示すバンドの時間変化を、時間に対してプロットした結果を図 2 に示す。バンド強度の回復の時定数を  $\tau$  とし、 $A \times \exp(-t/\tau) + C$  と装置応答関数をコンボリュートした関数でフィッティングを行った。実線は  $\tau = 35$  ps とした時のフィッティング結果である。バンド強度の時間変化がよく再現されていることがわかる。

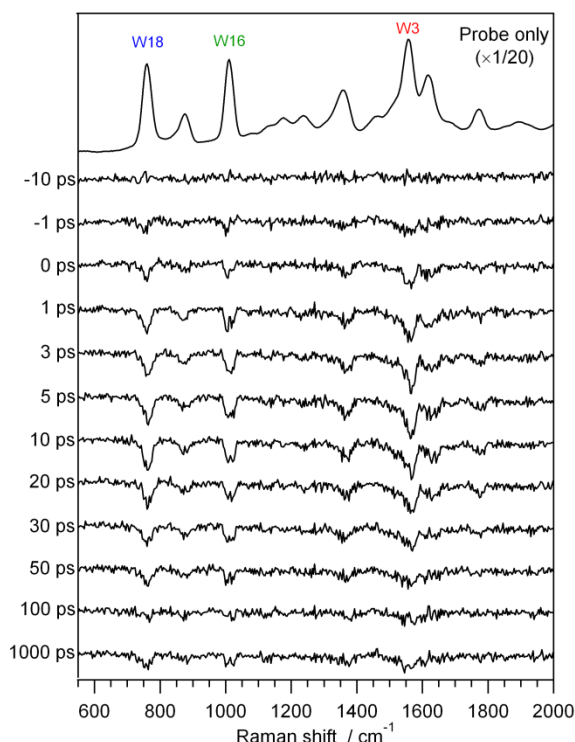


図2 明順応状態の ASR の時間分解 UVR 差スペクトル  
最上段はプローブ光のみのスペクトルである。

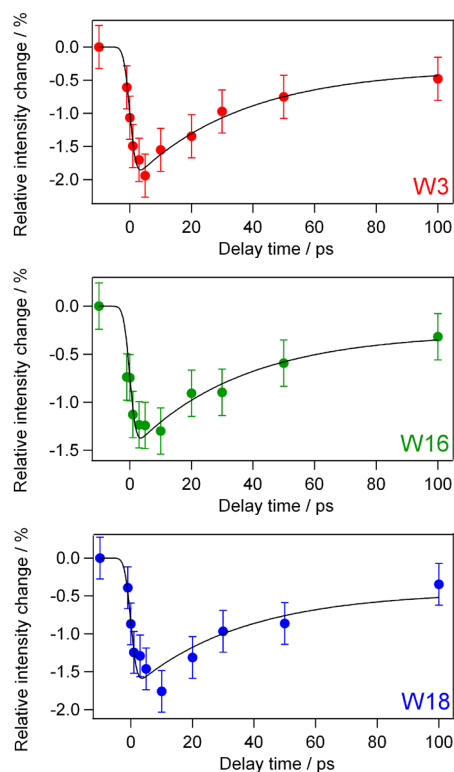


図3 バンド強度の時間変化  
プローブ光のみで測定したスペクトルのラマン  
バンド強度に対する変化の割合を表している。

【考察】 ASR の光異性化反応において、発色団の構造に関するダイナミクス研究はこれまでも行われている。しかし、発色団の異性化に追隨して起こるタンパク質の構造ダイナミクス研究は行われていなかった。我々は今回初めて、ASR の光異性化反応に追隨するタンパク質のダイナミクスを観測した。明順応状態の ASR の測定では、13 シス体が始状態で、全トランス体に異性化する反応が多くを占めていると考えられる。トリプトファンバンド強度の時間変化から、明順応状態の光反応には、約 35 ps の時定数を持つ構造変化が含まれていることがわかった。ASR にはトリプトファン残基が 13 個存在し、そのうち 3 個が発色団近傍に存在する。今回の実験で観測されたスペクトル変化はピコ秒領域で見られたことから、観測されたバンド強度変化は、発色団近傍のトリプトファン残基の構造変化に起因すると考えるのが自然である。これらのトリプトファン残基は、バクテリオロドプシン(BR)やセンサーロドプシン II (SR II)などの古細菌型ロドプシンに保存されている。明順応状態の BR では、発色団が全トランス体から光異性化反応が起こる。この異性化反応に追隨して、発色団近傍のトリプトファン残基周辺の構造が約 30 ps の時定数で変化することが報告されている<sup>1</sup>。明順応状態の BR と同じ全トランス体からの異性化反応を示す SR II についても、そのタンパク質構造変化の時定数は約 30 ps と報告されている<sup>2</sup>。明順応状態の ASR で観測された 35 ps の時定数は、逆方向の異性化反応を示す BR や SR II の時定数とよく似ている。このことは、発色団の異性化の方向によらず、タンパク質の構造応答速度が似ている可能性を示す。現在、暗順応状態の ASR についても、同様の実験を進めている。

#### 【参考文献】

- (1) Mizuno, M.; Shibata, M.; Yamada, J.; Kandori, H.; Mizutani, Y. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12121–12128.
- (2) 水野 操、須藤 雄気、本間 道夫、水谷 泰久 第 37 回生体分子科学討論会 2010, 54-55.