

1B11

全反射赤外分光法によるセンサーロドプシン I のイオン結合部位の構造研究
(名工大院工¹, 名大院理²) ○井上圭一¹, Louisa Reissig², 須藤雄気², 本間道夫², 神取秀樹¹

【序】細菌や古細菌に代表される微生物は細胞膜中に存在する光受容タンパク質であるロドプシンを使って、光のエネルギーを吸収し、プロトンポンプや信号伝達など多様な生理機能に役立っている。その中で Sensory rhodopsin I (SRI) は緑色光もしくは黄色光に吸収を持つ微生物型ロドプシンであり、細胞が可視光に向かって遊泳する正の走光性のためのセンサーである。SRI は初め *Halobacterium salinarum* の細胞膜中で発見された (*HsSRI*) が、界面活性剤による可溶化や低塩濃度に対する不安定さから詳細な研究が行われず、現在のところ SRI の信号伝達メカニズムはほとんど明らかにされていない。

しかし 2008 年真正細菌 *Salinibacter ruber* より新たな SRI (*SrSRI*) が単離精製され、*HsSRI* には無い可溶化状態や低塩濃度環境下における安定性を持ち、SRI の信号伝達メカニズムを調べるための理想的なタンパク質として注目されている。そしてその結果 *SrSRI* はタンパク質内部に塩化物 (Cl^-) イオンを結合することが明らかとなった (図 1)。これまで我々は過渡吸収法や過渡回折格子法を用いて *SrSRI* の光反応ダイナミクスの研究を行ってきた。そして Cl^- イオンの結合が *SrSRI* の反応速度やエンタルピーに大きな影響を与えることを明らかにしてきた。しかしその一方で *SrSRI* がどのように Cl^- イオンを結合するのか、また結合サイトが構造がどうなっているのか明らかにされておらず、 Cl^- イオンが *SrSRI* の光反応にこのような影響を及ぼす理由は未だもって不明なままである。そこで本研究では全反射赤外分光法 (ATR-FTIR) を用いてイオン結合に伴う吸収変化を測定し、結晶構造の無い *SrSRI* の Cl^- 結合サイトの構造を分子レベルで明らかにすることを目指した。

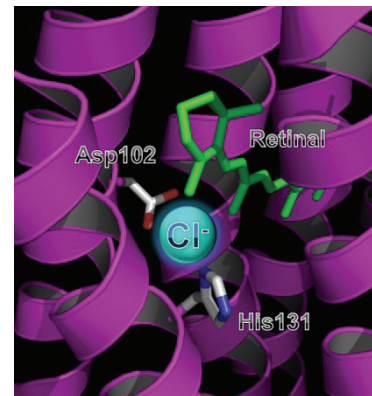


図 1. *SrSRI* のクロライドイオン結合サイトのモデル構造

【実験】 ATR-FTIR 測定は Bio-Rad 社製の FTS-6000 を用いて行った。試料である *SrSRI* は大腸菌を用いて発現し、phosphatidylglycerol (PG) に 1:50 のモル比で再構成した。測定には得られたタンパク質約 0.05 mg を図 2 で示したダイヤモンド基板に加え、自然乾燥して基板に固定した。その後 O-ring を挟んで冷却水を流し、温度を 20°C に保ちながら、タンパク質の置かれたセル内を目的の溶媒で満たした。そして外部の切替えシステムを用いて 2 種類の溶媒を交互に流しながら、それぞれの溶媒中における試料の赤外吸収スペクトルを測定し、その差スペクトルを求めることで、溶媒交換に伴う *SrSRI* の赤外吸収スペクトル変化を求めた。各溶媒を 20-30 分流すのを 1 サイクルとして、10 サイクル程度測定を行い、得られたスペクトルを平均化したものを最終的なスペクトルとした。溶媒の pH は 5 mM Tris バッファーを用いて pH = 7.0 とし、以下に示す濃度の塩を加えて実験を行った。

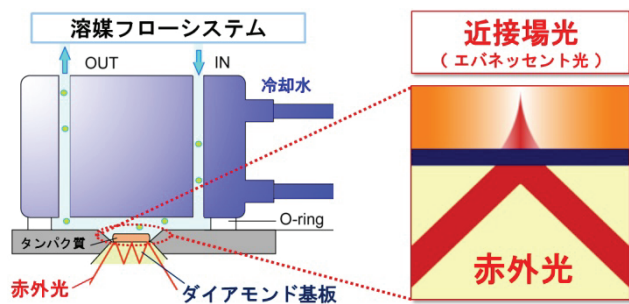


図 2. 全反射赤外分光法 (ATR-FTIR)

【結果と考察】図3に400 mM NaClと400 mM NaIの間で溶媒を交換した際に得られたATR-FTIRスペクトルを示す。この濃度ではSrSRIはほとんどCl⁻イオンに結合せず、ヨウ素イオン(I⁻)のみに結合するため、正のピークはイオン非結合型を、負のピークはイオン結合型に対応するスペクトルとなる。生データ(図3(a))にはタンパク質自身の構造変化に加え、様々なものに起因する吸収変化が現れているため、それらを補正する必要があることが明らかになった。その補正の手順は以下のようになる。まず2800-3000 cm⁻¹において正の400 mM NaCl側にPGのC-H伸縮振動と思われるピークがみられる。これは脂質膜の膨潤によるPGの吸収が現れたものと考えられる。これを補正したものが図3(c)であり、ここからさらに

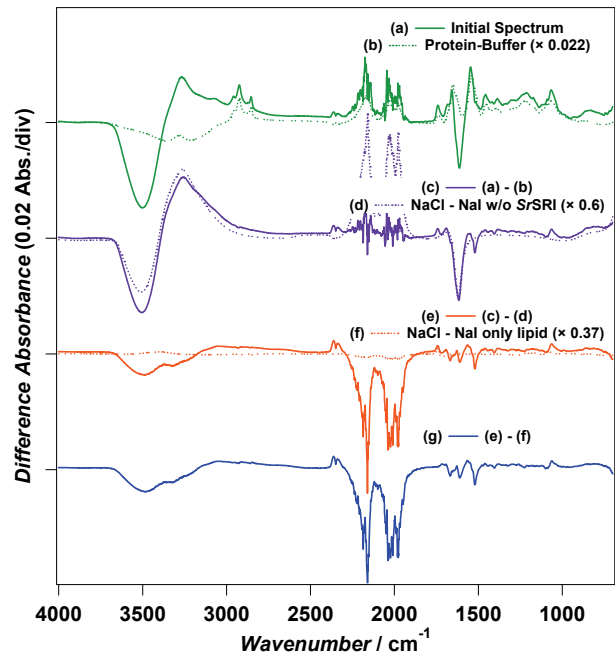


図3. SrSRIのATR-FTIRスペクトル
(正: 400 mM NaCl, 負: 400 mM NaI)

溶媒のみで得られた差スペクトルを補正したものが図3(e)となる。今回の場合、タンパク質だけでなくPGの吸収変化も1740 cm⁻¹に確認されたため、それを差し引くことで最終的に得られた図3(g)のスペクトルをSrSRIの吸収変化とした。このスペクトルの900-1800 cm⁻¹の領域を拡大し、それぞれのピークの波数を記したものを図4に示す。これを見るとイオンの結合・解離に伴って様々なバンドが変化していることが分かる。まず1716 cm⁻¹にはプロトン化カルボン酸のC=O伸縮振動と思われるピークが見られる。次に1667 cm⁻¹、1628 cm⁻¹、1611 cm⁻¹には主鎖C=Oのバンド(Amide-Iバンド)が見られ、タンパク質骨格の大きな構造変化があることを示唆している。また1564 cm⁻¹および1521 cm⁻¹のバンドはAmide-IIもしくはレチナールのC=C伸縮に由来すると考えられる。そして最も特徴的なものとして1062 cm⁻¹に強い正のピークが観測された。この振動数はヒスチジン残基の振動が観察される領域にあり、恐らく結合サイトを構成するHis131のイオン結合に伴う構造変化に起因すると考えられる(図1)。今回のATR-FTIR測定より、イオン結合・解離に伴うSrSRIの構造変化を反映した赤外吸収スペクトル変化を測定することに成功した。講演では変異体や同位体ラベル体を用いた結果についても紹介し、SrSRIのイオン結合についてより詳しい議論を行う。

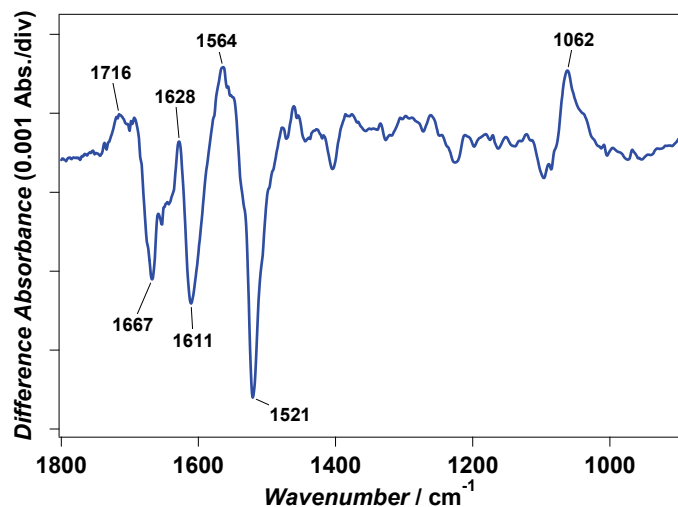


図4. 補正後のSrSRIのATR-FTIRスペクトル
(正: 400 mM NaCl, 負: 400 mM NaI)

【参考文献】

- (1) Kitajima-Ihara et al. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, pp. 23533-23541.
- (2) Inoue et al. (2011) *J. Phys. Chem. B.*, 112, pp. 2542-2547.