

グロイオバクターロドプシン (GR) の光反応時間分解分光研究

(名工大院工¹, Sogang University, Korea²) ○永田久美子¹、井上圭一¹、Kwang-Hwan Jung²、神取秀樹¹

【序】微生物型ロドプシンである *Gloeobacter rhodopsin* (GR) は 2003 年、シアノバクテリア *Gloeobacter violaceus* のゲノム上から発見された。バクテリオロドプシン(BR)やプロテオロドプシン(PR)と同様に、GR は光駆動型のプロトンポンプ機能を有する。励起された GR は次のような光反応を示す。GR→K→L/M→N→O→GR (Mylene R. M. Miranda et al. *Biophys. J.* 2009)

BR については研究の歴史が長く、立体構造やプロトンポンプのメカニズムについて多くの研究がされてきた。しかし、GR では、結晶構造は得られておらず、また、BR のプロトン放出基に対応する残基が存在しないことなど、BR とは異なる点が多く、プロトンポンプの際の詳細なメカニズムは未解明である。本研究では過渡吸収法(TA 法)および過渡回折格子法(TG 法)を用いることにより、GR の光励起反応サイクルにおける反応素過程を調べた。TA 法では主に発色団周りのダイナミクスを、TG 法では試料の屈折率変化から分子全体の構造変化についての情報を得ることができる。TG 法では、二本の励起パルス光を試料溶液中に入射することで、溶液中に干渉縞を生成する。これによって光強度に比例して GR が反応し、空間的に周期的な屈折率変化の分布が形成される。そしてそこにブラッグ条件を満たすようにプローブ光を入射して、得られる回折光の強度を光電子増倍管で検出することで、それをもとにして屈折率変化が求められる。

【実験】測定試料として、大腸菌を用いて C 末端にヒスチジンタグのついた GR を発現し Co-NTA アフィニティーカラムを用いて精製を行った。試料は pH 7.0、NaCl 4 M、Tris-HCl 50 mM、DDM 1% のバッファー中で可溶化されたものを用いた。まず TA 法を用いて励起光照射後の吸収変化を測定し、中間体の生成と減衰を調べた。また TG 法では、拡散定数の変化などをもとにタンパク質全体の構造変化を調べた。TA 法、TG 法ともに励起光として、Nd³⁺ ; YAG レーザーの二倍波($\lambda = 532 \text{ nm}$)の光を用い、TA 法では Xe ランプを、TG 法ではダイオードレーザー($\lambda = 808 \text{ nm}$)を検出光源として用いた。

【結果と考察】図 1、図 2 に GR の TA 測定の結果を示す。図 1 は過渡吸収スペクトル、図 2 は 510 nm と 616 nm のプローブ波長における吸収の時間変化を示している。TA 法で得た図 2 のトレースは 4 つの指数関数でフィッティングされ、それぞれ N→O、O→GR(1 成分目)、O→GR(2 成分目)、O→GR(3 成分目)と帰属付けされた。各成分の時定数は、3.4 ms、19 ms、70 ms、390 ms となった。

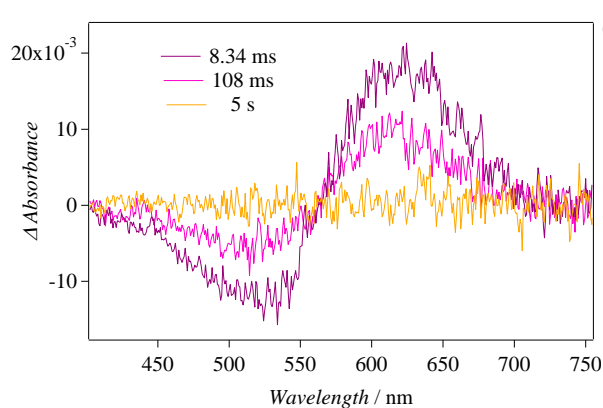


図 1. 過渡吸収スペクトル

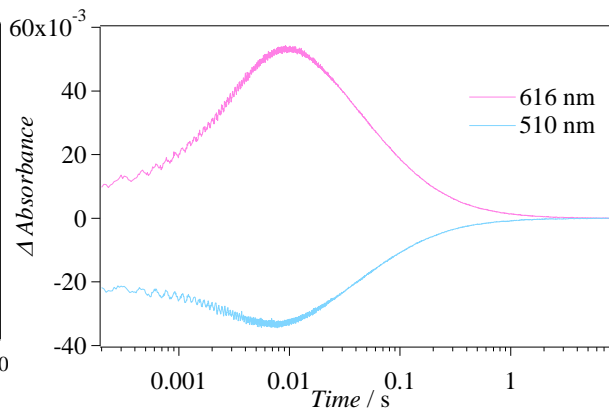


図 2. 616 nm と 510 nm の吸収変化

次に GR の TG シグナルは図 3 のようになり、1 ms 付近から上昇、下降、上昇、下降という二つの山が現れた。格子波数(q)をかえていくと図 4 のように二つ目の山が q に依存してずれてくるため、拡散信号であることがわかり、図 3 のシグナルは 1 ms 付近からの上昇が O の生成、10 ms 付近からの下降は O の減衰、100 ms 付近からの上昇は GR の拡散、その後の下降は O の拡散を示している。TG シグナルのフィッティングを行うと、N→O、O→GR(1 成分目)、O→GR(2 成分目)、O→GR(3 成分目)の成分が確認され、各成分の時定数はそれぞれ 3.1 ms、23 ms、79 ms、417 ms となった。TG 測定と TA 測定の結果とほぼ一致した。GR 始状態の拡散定数は、 $4.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ であり、見かけの分子量は 200 kDa で、GR 約 1 個分に相当する。と見積もられた。1 成分目から 3 成分目をそれぞれ O₁、O₂、O₃ とすると、それぞれの拡散定数は $5.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ 、 $5.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ 、 $9.6 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ となり、見かけの分子量は、130 kDa、130 kDa、24000 kDa 程度と見積もられ、分子数に換算すると、それぞれ 1 個、1 個、180 個となった。

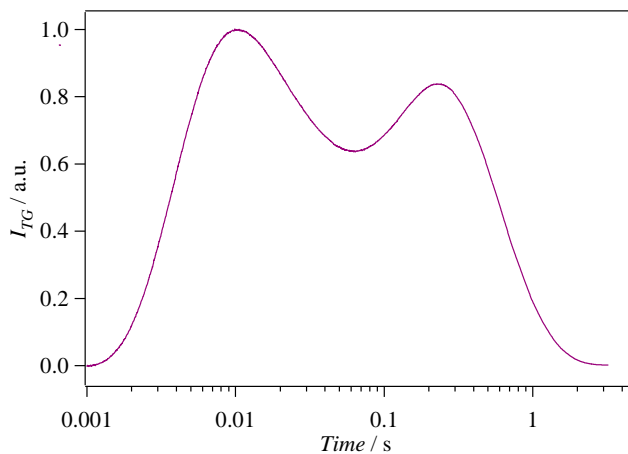


図 3. TG シグナル

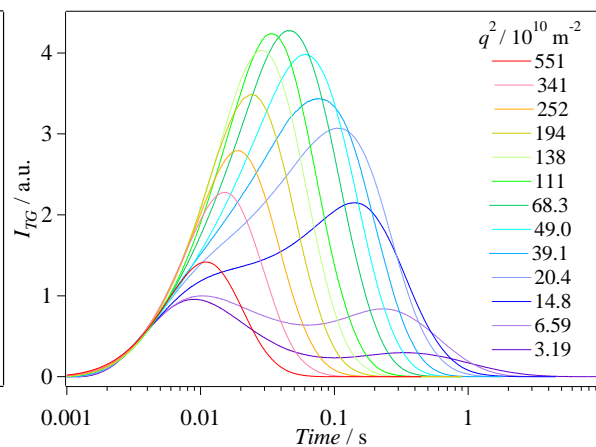


図 4. 様々な q での TG シグナル

O₃ で拡散定数が小さくなることは、この状態で大きな会合体を形成しているか、もしくは大きな構造の変化が起こっているかのどちらかの可能性を示唆している。そこでそれを確かめるためにタンパク質の濃度を薄めて会合体を形成しにくい条件で測定を行った。タンパク質濃度を薄めていくと、図 3 の二つめの山が消えていったため、O₃ では大きな会合体を形成していることがわかった。(図 5)

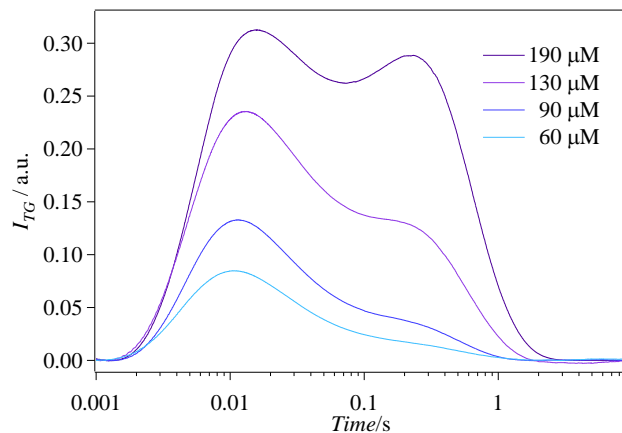


図 5. タンパク質濃度依存性 TG シグナル

今回の条件では、TA 測定の結果で O の減衰に O₁ から O₃ の 3 つの成分があることが確認された。その後 TG 測定の結果から、O₃ の拡散定数が非常に小さく、この状態で大きな会合体を形成していることが示唆された。GR の光反応を明らかにするには個々の分子が反応中にどのような構造変化をするのかが重要になる。そこでさらに GR 一分子での構造変化を調べるため、O₃ で会合体が生成しないよう塩濃度等の条件を調節して測定をおこなっており、講演ではその結果についても報告する。