

## 4A02

# 海洋細菌から見つかった新規なアミノ酸配列を持つロドプシンの機能解明

(名工大院・工<sup>1</sup>, 東大大気海洋研<sup>2</sup>) 井上圭一<sup>1</sup>, 鷲崎涼<sup>1</sup>, 吉澤晋<sup>2</sup>,  
吉住玲<sup>1</sup>, 木暮一啓<sup>2</sup>, 神取秀樹<sup>1</sup>

## Functional and Molecular Scientific Studies of a New Rhodopsin from Ocean

(Nagoya Inst. Tech.<sup>1</sup>, AORI, Univ. Tokyo<sup>2</sup>) Keiichi Inoue<sup>1</sup>, Ryo Susaki<sup>1</sup>, Susumu Yoshizawa<sup>2</sup>,  
Rei Abe-Yoshizumi<sup>1</sup>, Kazuhiro Kogure<sup>2</sup>, Hideki Kandori<sup>1</sup>

【序】微生物型ロドプシンは真正細菌や古細菌など、微生物の細胞に存在する光受容型膜タンパク質であり、発色団としてレチナールを結合した7回膜貫通型ヘリックス構造を持つ。微生物型ロドプシンの最大の特徴はその多様性に富んだ機能で、有名なバクテリオロドプシン (BR) に代表される光駆動型の外向きプロトンポンプや、内向きクロライド (Cl<sup>-</sup>) ポンプ、カチオンチャネル、走光性のための光受容センサーなど様々な働きを持つものが存在する。2000年以降海洋環境における広範なメタゲノム解析が進み、5,000種類以上の微生物型ロドプシンが主に海洋に住む海洋細菌などから発見されている。そのほとんどはBRと同様に光のエネルギーを使ってプロトンを外向きに輸送するプロテオロドプシン (PR) に分類され、BR、PRの両方においてレチナールのSchiff塩基のカウンターイオンであり、プロトンポンプ機能に重要なアスパラギン酸 (BR: Asp85) が保存されている。しかし最近我々は海洋細菌 *α*-proteobacteria の一種 *Fulvimarina pelagi* のゲノム中にこのアスパラギン酸が失われた特徴的な配列を持つロドプシン (FR) があることを見出した (表1)。さらにFRではプロトンポンプ型ロドプシンで重要なBR: Asp96の位置にあるカルボン酸も失われており、このことからFRの性質は海洋環境中で大部分を占めるプロトンポンプ型ロドプシンのものとは大きく異なる可能性が示唆される。そこで今回FRの機能を調べると共に、過渡吸収法や赤外分光法を用いてその分子論的な性質について研究を行った。

Residue Number in BR (in <i>Fulvimarina</i> Rhodopsin)	82 (107)	83 (108)	84 (109)	85 (110)	86 (111)	87 (112)	88 (113)	89 (114)	90 (115)	91 (116)	92 (117)	93 (118)	94 (119)	95 (120)	96 (121)
BR	R	Y	A	D	W	L	F	T	T	P	L	L	L	L	D
PR	R	Y	I	D	W	L	L	T	V	P	L	L	I	C	E
<i>Fulvimarina</i> Rhodopsin	R	Y	G	N	W	T	I	T	V	P	I	L	L	T	Q

表1. *F. pelagi* のロドプシン(FR)のアミノ酸配列

【実験】FRの遺伝子は*F. pelagi*のゲノムからPCRでクローニングし、それをpET21aに組み込んだ発現プラスミドを作製した。これを用いて大腸菌 (C41株) を形質転換し、大量発現を行った。FRのポンプ機能の測定は、この大腸菌の懸濁液に光を照射し、それに伴うpH変化をpH電極を用いて検出することで行った。一方、分光測定には大腸菌からNi-NTAを用いて精製したタンパク質を用いた。過渡吸収測定では励起光にNd<sup>3+</sup>:YAGレーザーの倍波 ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ,  $5.6 \text{ mJ/cm}^2$ ) を用い、ICCD linear detector および光電子増倍管を用いて過渡吸収スペクトルと特定のProbe波長での吸収変化の時間変化の測定を行った。

【結果と考察】まず FR のポンプ機能を調べるため、FR を発現させた大腸菌の懸濁液に光を照射して生じる外液の pH 変化を測定した (図 1)。プロトンポンプである PR では光を照射すると細胞外へ  $H^+$  がくみ出されるため pH は減少する (図 1 上) が、FR ではそれとは逆の pH が増加する変化が見られた。この変化はプロトノフォアである CCCP を加えると増大することから FR はプロトンを直接輸送していないことが示唆され、また膜電位を解消する  $TPP^+$  を加えたところ pH 変化が完全に消失した。これらの結果から FR の光励起に伴う pH の増加はプロトン以外のイオンの輸送に伴う二次的なプロトン移動に起因するものであることが示された。さらに懸濁中液の塩を変えて同様の測定を行ったところ、アニオン依存的に信号強度が変化し、 $SO_4^{2-}$  存在下では完全に信号が消失したことから、FR は光で  $Cl^-$  をはじめとする一価の陰イオンを内向きに輸送するクロライドポンプであることが明らかとなった。

一方精製した FR の過渡吸収測定を行ったところ、図 2 の様に K、 $K \rightleftharpoons L$ 、O といった中間体が含まれるフォトサイクル反応を示すことが明らかになった。これまで FR と同様のクロライドポンプとして古細菌 *Halobacterium salinarum* などが持つハロロドプシン (HR) が知られていたが、HR の場合始状態より Blue-shift した L 中間体が最も顕著に蓄積するのに対し、FR のフォトサイクル中では逆に Red-shift した O 中間体が L よりも圧倒的に多く蓄積する結果となった (図 2 左)。このことから機能は似通っていても FR と HR の分子論的な性質には大きな差があることが示唆され、講演ではさらに詳細な点について議論する。

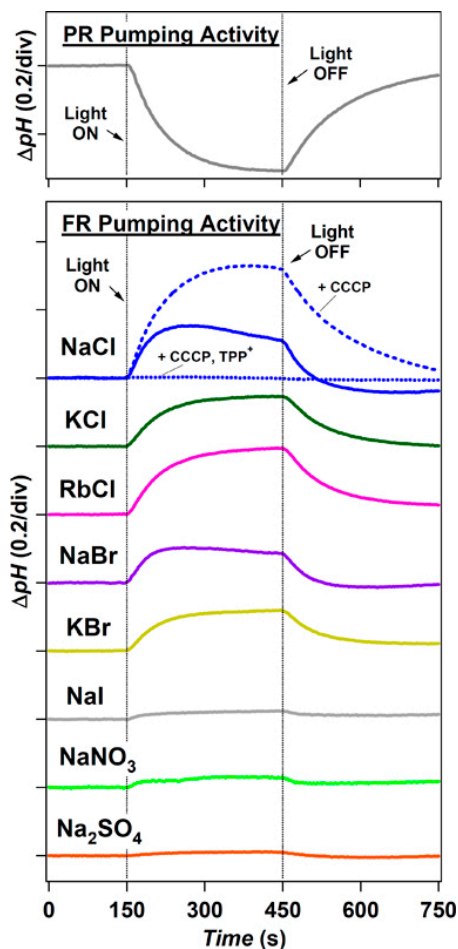


図 1. PR (上) と FR (下) の光誘起ポンプ活性

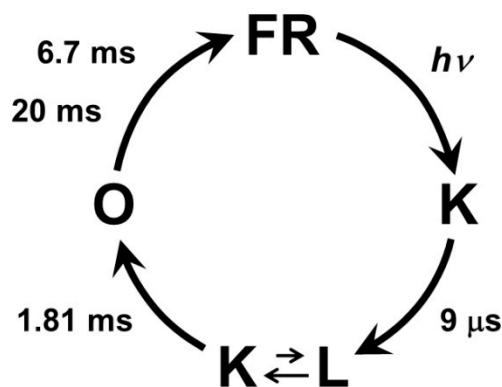
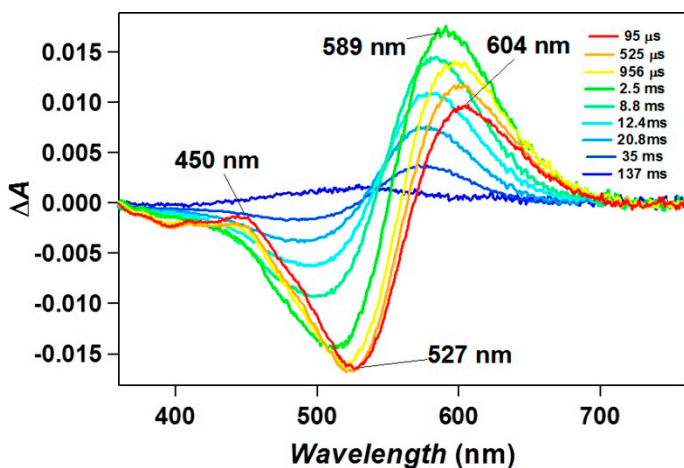


図 2. FR の過渡吸収スペクトル (左) とフォトサイクル (右)