

1P085

バクテリオロドプシンの色変異体に関する理論的研究

(京大院・理*, 名大院・理**) ○須郷聖也*, 神谷基司*, 須藤雄気**, 林重彦*

A theoretical study on color variants of bacteriorhodopsin

(Kyoto Univ.*, Nagoya Univ.**)
○Seiya Sugo*, Motoshi Kamiya*, Yuki Sudo**,
Shigehiko Hayashi*

【序】近年、光遺伝学(optogenetics)と呼ばれる学問分野が注目されている。光を使って神経活動を制御しようとする新たな技術である。その主役となるのが光を受容するとイオンを膜間輸送する機能をもつ膜タンパク質である。イオンを膜間輸送すると膜間電位が生じる。神経細胞は膜間電位に応答して機能するため、光を当てることで神経を制御できるというわけだ。光受容タンパク質のアミノ酸配列を一部変異させると機能を保ったまま吸収波長がシフトした色変異体を得ることができる。広い吸収波長をもつ色変異体を得ることができればそれを別々の神経細胞に発現させることによって波長で制御する神経を選択できるようになることが期待される。本研究では光受容タンパク質の代表例であり実験的・理論的に最も理解が進んでいるバクテリオロドプシン(bR)を対象として色変異体を探索した。(bRは約570nmの光を吸収して細胞膜内から細胞膜外へプロトンを能動輸送する光駆動プロトンポンプである。) bRの色変異体を光遺伝学に応用するに当たって波長のシフト幅が問題となる。波長で制御する神経を変えるためには少なくとも50nm以上のシフトが必要と思われるが、光受容タンパク質で50nm以上のシフトを実現した例はこれまでに存在しない。さらに、色変異体をはじめとしたタンパク質機能の改変は網羅的にアミノ酸を変異させる偶発的アプローチに頼る他ないのが現状である。そのため、理論的な色制御機構の理解とそれに伴った合理的なタンパク質設計が待望されている。

【変異体のデザイン】光遺伝学的応用に耐えうる波長シフトを持つ色変異体をレチナールタンパク質の色制御機構に関する知見から理論的に設計することを目的として研究を行った。既知の色制御機構として(1)レチナール周辺の静電相互作用の変化、(2)レチナールのポリエーテル鎖の捩れ、の2つが知られている。(1)の寄与に関しては実験的・理論的に研究が進んでおり[1]、タンパク質構造情報があれば比較的容易に設計が可能である。しかし過去の研究で大きなシフトは実現していない。それに比べて(2)の寄与の理解はあまり進んでいない。ポリエーテル鎖の回転によりタンパク質のポンプ機能にとって大事な結合部位の構造が壊れてしまう可能性があることも設計を困難なものにしている。そこで、 β イオノン環のメチル基とポリエーテル鎖の水素との間に立体障害があることと視物質ロドプシン(吸収波長は約500nm)の β イオノン環が約120度捩れているという2つの事実から β イオノン環の捩れに着目し、約120度捩った構造を安定化させることを考えた。捩った後の β イオノン環とメチル基との立体反

発を軽減するための変異(M118A と S141G)、静電相互作用によるブルーシフトのための変異(S141G と A215T)、 β イオン環のパッキングを良くするための変異(G122A)の3つの観点からそれぞれの変異を加えた四重変異体(M118A G122A S141G A215T)を提案した(図2中央)。また、共同研究者の須藤らの示唆をもとに図2右の三重変異体(M118A S141A A215T)も扱うこととした。

【研究手順】まず native bR の系をセットアップした(MD)。その後各々の変異を加え四重変異体と三重変異体の構造を作った。この際 β イオン環は手動で捩った。変異体の構造を決定する際、タンパク質全体の構造を緩和させつつ発色団付近を最適化しなければならない。そこで、図2に示した三構造を近年、当研究室で開発されたQM/MM-RWFE-SCF法[2]を用いて構造最適化した。QM/MM-RWFE-SCF法はMM構造(古典的に扱う領域)を緩和させつつQM構造(量子化学的に扱う領域)を最適化できる強みがある。最後に、決定した構造をもとにMRMP法で励起エネルギーを計算した。

【結果】QM/MM-RWFE-SCF法を用いて構造を決定すると、捩れた構造で安定になった[3]。変異の後に Schiff 塩基周りの結合部位は安定に保たれていた。決定した構造をもとにした予備的な計算によると捩れの寄与は2~4 kcal/mol と見積もられ大きな捩れの寄与を示唆する結果を得ることが出来た。

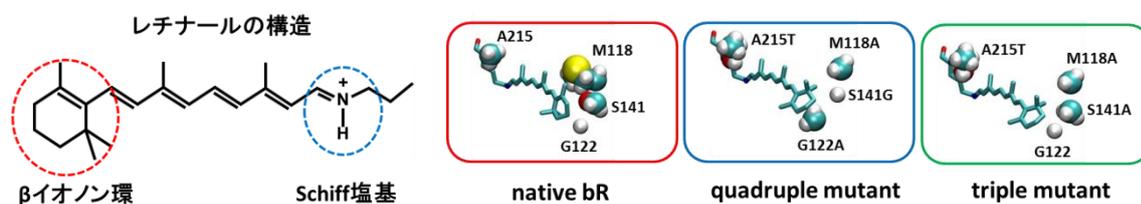


図1 β イオン環と Schiff 塩基 図2 native bR とデザインした変異体

【参考文献】

- [1] Shigehiko, Hayashi., et al., (2001) *J. Phys. Chem. B* 105,10124-10131
- [2] Takahiro, Kosugi. and Shigehiko, Hayashi., (2012) *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8,322-334
- [3] Yuki, Sudo., et al., (2013) *Journal of Biological Chemistry*, 288:20624-20632, 2013.