

1P087

プロテオロドプシンの吸収波長を決定するアミノ酸

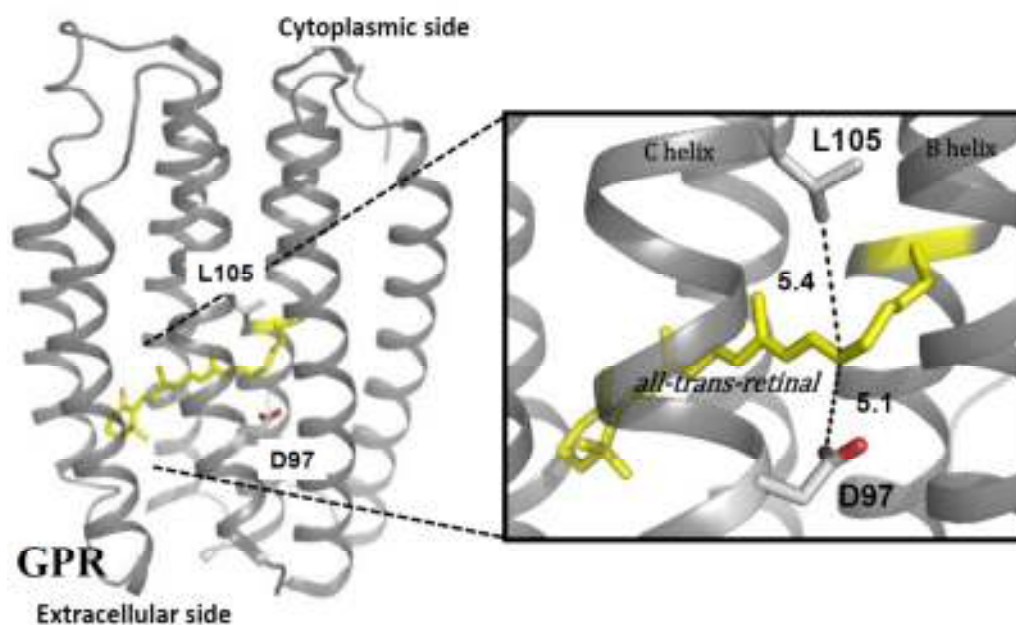
(名工大院工) 尾崎裕哉, 川島崇睦, 吉住 玲, 神取秀樹

A color determining amino acid in proteorhodopsin

(Nagoya Inst. Tech.) Yuya Ozaki, Takayoshi Kawashima, Rei Abe-Yoshizumi, Hideki Kandori

【序】視物質ロドプシンや微生物型ロドプシンにおける波長制御メカニズムは、分子科学の重要な課題の1つである。例えば、我々ヒトは色を認識する3種類(赤・緑・青)の色覚視物質を持っているが、これらの視物質は11シスレチナルという完全に同一の分子(protonated Schiff base of 11-cis retinal)を使って色識別を行っており、タンパク質場がもたらすレチナルの電子状態制御は実験においても理論においてもきわめてチャレンジングな問題である¹。

プロテオロドプシン(PR)は、2000年に真正細菌の一種である γ -*proteobacteria*から発見された微生物型ロドプシンである。視物質ロドプシンが11シスレチナルを発色団とするのに対して、微生物型ロドプシンは全トランス型のレチナルを発色団(protonated Schiff base of all-trans retinal)として結合している。プロテオロドプシンを持つ真正細菌は世界中の海に存在しており、生育する海の深度に応じて、緑色吸収型(Green-absorbing PR; $\lambda_{\max} \sim 525$ nm)と青色吸収型(Blue-absorbing PR; $\lambda_{\max} \sim 490$ nm)が存在することが知られている。興味深いことに、105番目のアミノ酸残基がGPRではLeu、BPRではGlnであり、相互に変異させると吸収波長がスイッチすることが報告されている²。NMRによるGPRの立体構造によれば、105位のアミノ酸はレチナルの13メチル基と相互作用できる部位にあり、発色団の対イオンであるAsp97から Schiff 塩基の窒素原子を挟んでほぼ等距離に存在する。過去の理論計算によれば、BPRにおけるGlnのC=O基が短波長化ももたらしていると報告³されたが、この部位



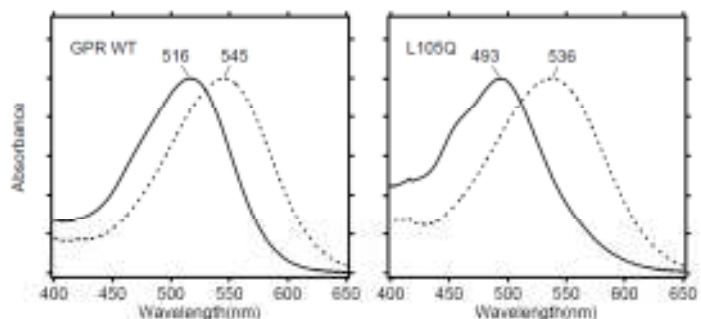
の極性だけで説明されるのかどうか、十分に理解されていない。そこで本研究において我々は GPR の Leu105 を全てのアミノ酸残基に置換した変異体を作製し、PR の波長制御機構について解析した。

【実験】 His タグを C 末端側にもつ GPR を大腸菌で発現し、1 % DDM で可溶化した後、Ni-NTA で精製した。ロドプシンでは対イオン (PR の Asp97) がプロトン化すると発色団の正電荷が非局在化することで吸収スペクトルが長波長シフトするが、PR の対イオン Asp97 は中性付近に pKa を持つことが知られている。そこで吸収スペクトルをさまざまな pH で測定し、Asp97 のプロトン化型 (下図の破線)、脱プロトン化型 (下図の実線) における吸収極大を求めるとともに、Asp97 の pKa も決定した。

微生物型ロドプシンは暗状態において、全トランス型だけでなく 13 シス型 (13-cis, 15-syn) 構造も取りうるということがわかっており、前者だけがプロトンポンプ機能をもつ。野生型の PR では 13 シス型の存在は無視できる⁴が、Leu105 の変異体ではシス体が増加する可能性もあるので、HPLC を用いて解析した。

【結果・考察】 GPR の 19 種類全てのアミノ酸変異体の発現に成功した。微生物型ロドプシンはレチナールシッフ塩基より細胞外側に水分子を含む水素結合ネットワークが存在する一方、細胞質側はきわめて疎水的でありプロトン経路も存在しない。Leu105 はそのような疎水的な部位に存在するが、Lys や Arg のように正電荷を持つ変異体も同様に折り畳まれたのは興味深い。L105K 変異体についてはその性質をすでに発表しているが、タンパク質の安定性が 3 倍程度低下し、プロトンポンプ活性が 6 倍程度低下したものの、機能は保たれていることがわかった⁵。

吸収スペクトルを比較した結果、側鎖に C=O 基もしくは O-H 基を持つアミノ酸残基では、短波長シフトが確認された。また、側鎖の体積が大きいアミノ酸残基で長波長シフトする傾向が見られた。現在、HPLC による異性体組成の測定を含めた解析が進行中であり、



、討論会のポスター発表においては、野生型を含めた 20 種類の結果をもとに、プロテオロドプシンの色を決定するメカニズムや、進化の中で Leu や Gln が選ばれた理由などについて議論したい。

【引用文献】

1. Katayama, Furutani, Imai, Kandori, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 891-894 (2010); Katayama, Furutani, Imai, Kandori, *Biochemistry* 51, 1126-1133 (2012); Sekharan, Katayama, Kandori, Morokuma, *J. Am. Chem. Soc.* 134, 10706-10712 (2012).
2. Man, Wang, Sabehi, Aravind, Post, Massana, Spudich, Spudich, Beja, *EMBO J.* 22, 1725-1731 (2003).
3. Hillebrecht, Galan, Rangarajan, Ramos, McCleary, Ward, Stuart, Birge, *Biochemistry* 45, 1579-1590 (2006).
4. Ikeda, Furutani, Kandori, *Biochemistry* 46, 5365-5373 (2007).
5. Maiti, Yamada, Inoue, Kandori, *Biochemistry* 51, 3198-3204 (2012).