

3P074

グロイオバクターロドプシン K 中間体における発色団とプロトンドナーとの長距離カップリング

(阪大院理¹, 名工大院工²)

○及川 健太郎¹, 水野 操¹, 神取 秀樹², 水谷 泰久¹

Long-range coupling between the chromophore and the proton donor in the K intermediate of *Gloeobacter* rhodopsin

(Osaka University¹, Nagoya Institute of Technology²)

○Kentaro Oikawa¹, Misao Mizuno¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

序 グロイオバクターロドプシン (GR) は真正細菌シアノバクテリア由来の微生物型ロドプシンである。GR はバクテリオロドプシン (BR) と同様に光駆動プロトンポンプ機能を有している。GR は光を吸収すると、複数の中間体を経て始状態へと戻る (GR→K→L→M→N→O→GR) [1]。この光サイクル中の M 中間体では、レチナール発色団のシッフ塩基が脱プロトン化しており、N 中間体でシッフ塩基が再プロトン化される[2]。この再プロトン化のためのプロトンドナーは 132 番目のグルタミン酸 (Glu132) だと考えられている。低温でトラップした K 中間体の FTIR スペクトルから、K 中間体生成に伴い、Glu132 が形成する水素結合の強度が変化することが報告されている[3]。このようなプロトンドナーの変化は、他の微生物型ロドプシンでは見られない。Glu132 の挙動を明らかにすることは GR のプロトンポンプ機能を理解する上で重要である。本研究では野生型 GR、および Glu132 をアスパラギン酸に置換した E132D 変異体について、室温における GR の始状態、K および L 中間体の共鳴ラマンスペクトルを測定した。その結果、GR では K 中間体の生成に伴い、レチナール発色団と Glu132 との間に長距離相互作用が形成されることがわかった。

実験 野生型 GR および E132D 変異体は、大腸菌に発現させ、可溶化したのちにカラムクロマトグラフィーで精製したものを用いた (pH 9)。レーザー光の強度変化を利用した中間体測定には、Nd:YAG レーザーの第二高調波 (532 nm, 20 ns) を用いた。時間分解共鳴ラマン測定においては、ポンプ光に Nd:YAG レーザーの第二高調波 (532 nm, 20 ns)、プローブ光には Ti:Sapphire レーザーの第二高調波 (475 nm, 40 ns) を用いた。

結果および考察 図 1 に、野生型および E132D 変異体における GR の始状態、K および L 中間体の共鳴ラマンスペクトルを示す。野生型と変異体のスペクトルを比較すると、いずれの状態においてもスペクトルはよく似ていることが分かった。ここで、1620–1650 cm⁻¹ 付近に観測される C=N 伸縮振動バンドに注目する。C=N 伸縮振動モードは、N–H 変角振動とカップルしており、レチナールシッフ塩基の水素結合強度の良いマーカーバンドである。シッフ塩基の水素結合が強い場合、C=N 伸縮振動バンドはより高波数側に現れ、大きな重水素シフトを示すことが知られている[4]。図 2A, B および C はそれぞれ、GR、K および L 中間体の C=N 伸縮振動バンドの拡大図である。図 2A および B を見ると、C=N 伸縮振動バン

ドは GR では完全に一致しているが、K 中間体では野生型の方が低波数側に現れた。これは、野生型と E132D 変異体のシッフ塩基の水素結合強度は、始状態では差がないのに対し、K 中間体では差があることを意味する。すなわち、レチナールシッフ塩基と Glu132 が、K 中間体生成に伴って相互作用を形成することを示している。シッフ塩基と Glu132 とは 10 Å 以上離れているにもかかわらず、このような相互作用が生じることは興味深い。また図 2C に示すように、L 中間体においても、C=N 伸縮振動バンドは野生型と変異体との間で波数に差が見られた。したがって、K 中間体生成時に生じた相互作用は L 中間体においても維持されていると考えられる。

以上から、GR では K および L 中間体

において、レチナールシッフ塩基と Glu132 が相互作用を形成していることが分かった。Glu132 は N 中間体生成時において、シッフ塩基にプロトンを供与すると考えられている。本研究の結果は、それよりも早い段階で Glu132 とシッフ塩基との間に相互作用が形成されていることを示している。このような長距離相互作用は、M 中間体に対するシッフ塩基の再プロトン化を促進し、光サイクル全体のターンオーバーの速度を速めていると考えられる。

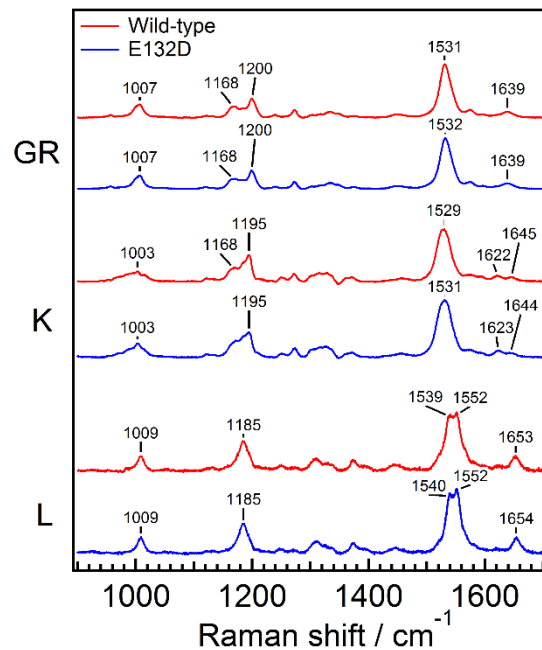


図 1. 野生型 (赤) および E132D 変異体 (青) における、GR の始状態、K および L 中間体の共鳴ラマンスペクトル

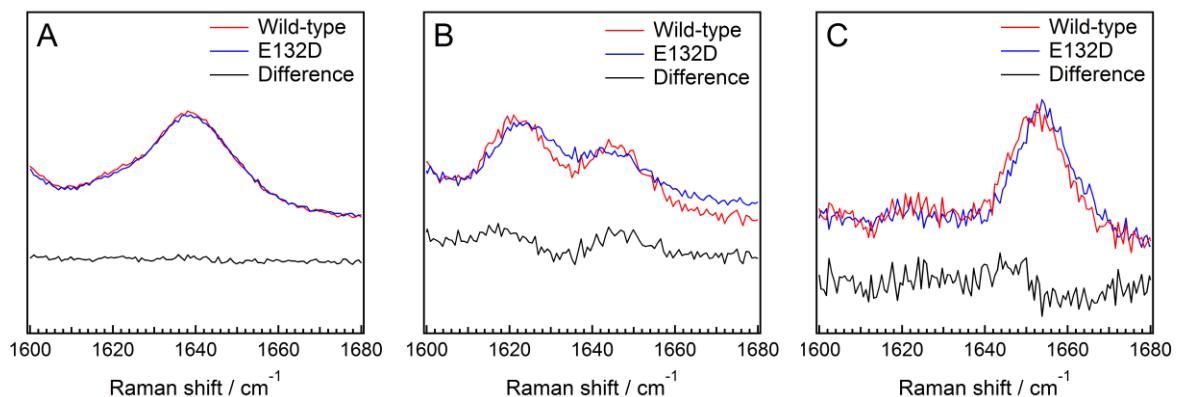


図 2. GR のラマンスペクトルの 1600–1680 cm⁻¹ 領域を拡大したもの. (A) 始状態, (B) K 中間体, (C) L 中間体

参考文献 [1] Miranda, et al., *Biophys. J.* **96** (2009) 1471. [2] 中嶋ら, 第 9 回分子科学討論会 2015 (東京), 4C09. [3] Hashimoto, et al., *Biochemistry.* **49** (2010) 3343. [4] Smith, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 3108.