

4P066

時間分解赤外分光計測による好熱性ロドプシン TR の光反応解析

(分子科学研究所¹、岡山大院・医歯薬総合²) 黒井邦巧¹、塚本卓²、本田尚也²、
須藤雄気²、古谷祐詞¹

Time-resolved infrared study on the photoreaction of Thermophilic rhodopsin (TR)

(Institute for Molecular Science¹, Okayama Univ.²)

【序】光受容タンパク質であるロドプシンは、最も精力的に研究されているタンパク質の1つであり、光で生理機能を制御するオプトジェネティクスへ応用されていることから、最近では生命科学分野でも注目されているタンパク質である。多様な種類が存在するロドプシンの中でも、最近発見された好熱菌由来のロドプシン Thermophilic rhodopsin (TR) (図1) は、初めての耐熱性ロドプシンであり光駆動プロトンポンプとして機能する[1]。TR は生理的環境下では75°Cの高温環境にあり、高い熱安定性を持ったTRの光反応がどのように高温環境に最適化されているのかを知ることは物理化学の見地から興味深い。また、TR は高温下における安定な光機能分子素子として期待されているので、その光反応機構を明らかにすることは重要な研究基盤となる。これまで塚本らが過渡吸収分光によってTRの光反応を調べているが[2]、タンパク質の構造変化などのダイナミクスの詳細はよく分かっていない。今回、我々は時間分解赤外分光法をTRに適用してその光反応誘起の構造変化を明らかにすることを試みた。さらに70°Cまでの様々な温度条件で測定を行うことで、TRの光反応がどのように高温環境に最適化されているのかを検討した。

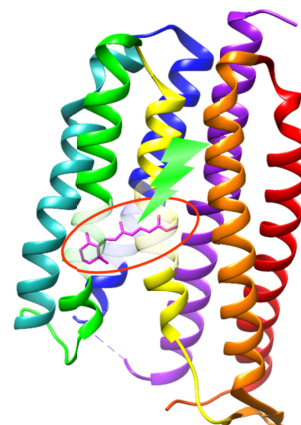


図1 ロドプシンの構造図。構造はTRと類縁のXanthorhodopsinのものである(PDB:3DDL)。

【実験】TR は文献[1]に従い、大腸菌で発現させ、界面活性剤で可溶化した後、カラムクロマトグラフィーにより精製した。卵黄由来フォスファチジルコリンをモル比1:20で混合し、界面活性剤を除去することで脂質膜に再構成した。これを緩衝液に懸濁し、超音波処理した後、CaF₂板の上に滴下、乾燥させた。近傍に20%グリセロール溶液の液滴を置き、密封することによって水和した。時間分解赤外分光測定にはBruker Optics社製のVertex80をステップスキャンモードで用いた(時間分解能12.5 μs)。試料の光励起には、ナノ秒パルスNd-YAGレーザー(3倍波)とOPOレーザーにより、波長約530 nmに変換したものをを用いた。試料セルの温度は、恒温槽により温度コントロールされた水を循環させることによって、30°Cから70°Cまで10°C刻みで制御した。得られたスペクトルの時間変化のデータについてMatlab数値解析ソフトで特異値分解(SVD)解析、およびGlobal Exponential Fitting(GEF)解析を行った。

【結果と考察】図 2(a)に好熱菌の生息温度付近である 70°Cにおいて得られた TR の光誘起赤外差スペクトルの時間変化を示す。これらのうち 2 つの吸収ピーク 1753 cm⁻¹ と 1628 cm⁻¹に着目した。1753 cm⁻¹はカルボン酸由来の吸収波数であり、この立ち上がりは光反応に伴うアスパラギン酸残基やグルタミン酸残基のプロトン化を意味する。またアミド I 領域の 1628 cm⁻¹の正のバンドは、同じくアミド I 領域の α -helix 由来と思われる 1649 cm⁻¹の負のバンドの変化と相関していることから、TR のタンパク質骨格の構造変化を表していると考えられる。図 2(b)に 70°Cと 40°Cにおける 1628 cm⁻¹および 1753 cm⁻¹における吸収の時間変化を示す。70°Cではカルボン酸のプロトン化が骨格構造変化よりも速い時間で起こるが(図内赤矢印)、40°Cでは速い立ち上がりが見られずプロトン移動速度が遅くなっている。

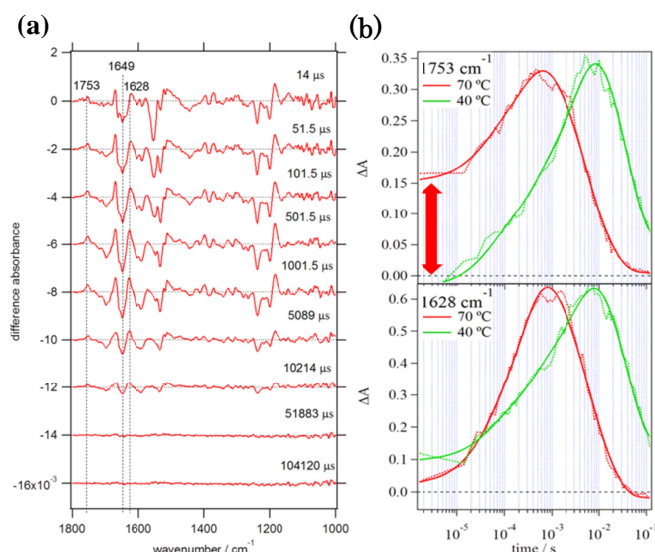
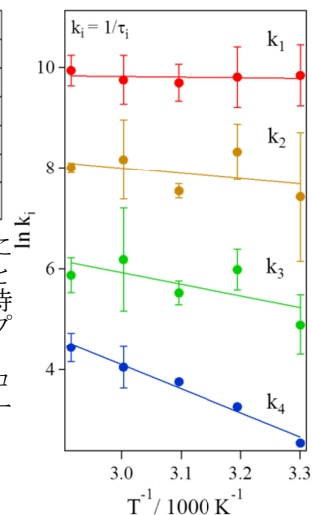


図 2 (a)70°Cにおける TR の光誘起赤外差スペクトルの時間変化。波数 1753 cm⁻¹の吸収変化はカルボン酸の吸収に 1649 cm⁻¹と 1628 cm⁻¹の吸収変化は TR の骨格構造の変化に由来すると考えられる。(b)1628 cm⁻¹および 1753 cm⁻¹における吸収の時間発展。太実線はフィット曲線、破線は実験値である。

次に、TR の各中間体遷移の反応速度の温度依存性を検討した。SVD 解析を行った結果、すべての温度で 4 つの主成分が抽出され、GEF 解析により図 3 の表に示す時定数が得られた。主成分数は塚本らの報告[2]と一致していた。アレニウスプロットにより得られた各活性化エネルギーEa (kcal mol⁻¹)は、遅い成分ほど大きな値であった。このことは低温側で著しく光反応サイクルが遅くなることと関連している。プロトン移動反応など、分子機構の詳細については現在変異体を用いて検討中である。

T / °C	$\tau_1 / \mu\text{s}$	$\tau_2 / \mu\text{s}$	$\tau_3 / \mu\text{s}$	$\tau_4 / \mu\text{s}$
30	63	1000	8800	78000
40	66	280	2700	38000
50	66	540	4100	23000
60	65	370	3300	19000
70	51	340	3000	12000
Ea kcal mol ⁻¹	0.24	2.1	4.6	9.5

図 3 各温度における GEF 解析により得た時定数 τ_i (i = 1, 2, 3, 4)とそれらのアレニウスプロット。時定数の単位は μs で、アレニウスプロットにおいて $k_i = 1/\tau_i$ である。Ea (kcal mol⁻¹)はアレニウスプロットより得た活性化エネルギーである。



【参考文献】

- [1]T. Tsukamoto *et al*, *J. Biol. Chem.* (2013)
 [2]T. Tsukamoto *et al*, *J. Phys. Chem. B.* (2014)