

## 好熱菌由来光駆動プロトンポンプTRのタンパク質環境が 発色団構造に及ぼす影響

<sup>1</sup>阪大院理, <sup>2</sup>岡山大院医歯薬

○塩谷智巳<sup>1</sup>, 水野操<sup>1</sup>, 塚本卓<sup>2</sup>, 須藤雄気<sup>2</sup>, 水谷泰久<sup>1</sup>

### Effects of environment surrounding protein on the chromophore structure of a light-driven proton pump TR

○Tomomi Shionoya<sup>1</sup>, Misao Mizuno<sup>1</sup>, Takashi Tsukamoto<sup>2</sup>, Yuki Sudo<sup>2</sup>, Yasuhisa Mizutani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grad. Sch. Sci., Osaka University, Japan

<sup>2</sup> Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama University, Japan

#### 【Abstract】

Thermophilic rhodopsin (TR) is a light-driven proton pump from a thermophilic bacterium. Solubilized TR forms a trimer at room temperature, while it irreversibly decomposed into a monomer over 68 °C. Here, we measured resonance Raman spectra of solubilized TR and membrane-embedded TR to reveal the effects of the environment surrounding protein on the retinal chromophore structure.

We focused on the C=N stretch band of protonated Schiff base (PSB) in the chromophore because this band serves a good structural marker of hydrogen bond of PSB. For the solubilized TR, the monomer showed higher C=N stretching frequency than that of the trimer. For the membrane-embedded TR, frequency of the C=N stretch band exhibited no remarkable difference between before and after heating. This suggests that membrane-embedded TR has higher thermal stability than solubilized TR and that the membrane-embedded TR could keep trimer after heating. Thus the membrane environment plays an important role for the maintenance of protein structure in TR.

#### 【序】

Thermophilic rhodopsin (TR) は、約 75 °C の高温環境に生息する好熱菌に由来する光駆動プロトンポンプである。界面活性剤で可溶化した TR は、室温では三量体を形成するが、68 °C で加熱すると不可逆的に単量体へ解離する[1]。そこで本研究では、このような構造転移への脂質膜の効果を検討するため、細胞膜中での TR の発色団の共鳴ラマンスペクトルを加熱前後で比較し、細胞膜中での TR の会合状態、タンパク質周辺の環境がレチナル発色団構造に与える影響について議論した。

#### 【実験方法】

TR は大腸菌で発現させた。可溶化状態の試料は、界面活性剤（ドデシルマルトシド）を用いて可溶化し、カラムクロマトグラフィーで精製したものを用いた。一方、大腸菌膜中の試料は、TR が発現した大腸菌を超音波破碎し、得られた膜断片を緩衝液で洗浄し、そのまま用いた。試料の加熱は、85 °C の恒温槽に 10 分間浸けて行い、室温まで放置した試料を測定に用いた。

共鳴ラマンスペクトル測定には、TR の電子遷移（極大波長 530 nm（三量体）、524 nm（単量体））に共鳴する波長 532 nm の cw レーザー光を励起光に用いた。

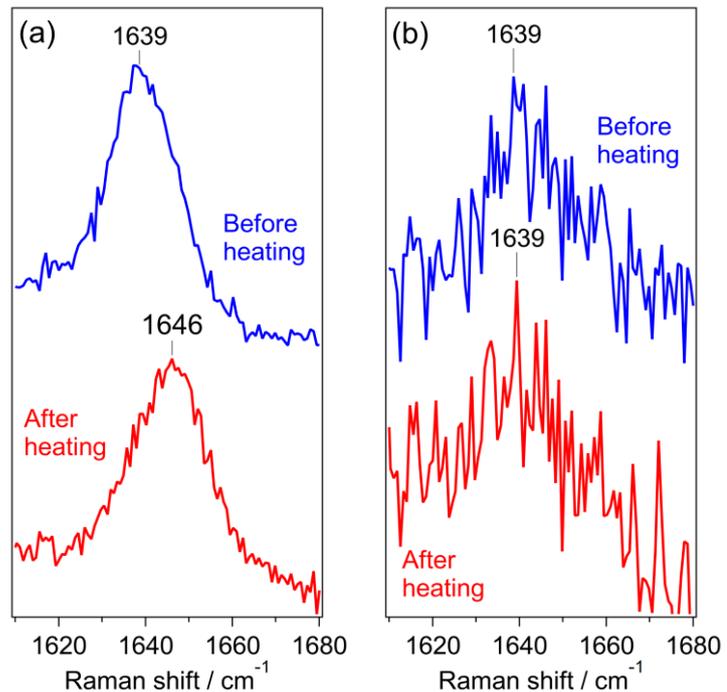
#### 【結果・考察】

我々はこれまでの研究において、可溶化状態の加熱前後の TR の共鳴ラマンスペク

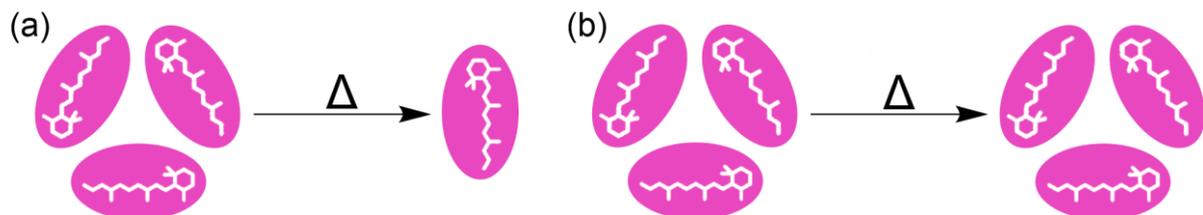
トルを比較した。両者のスペクトルは全体としてよく似ていたが、発色団のプロトン化シッフ塩基の構造を反映するC=N伸縮振動バンドの振動数が異なることを見出した[2]。そこで本研究では、C=N伸縮振動バンドをマーカーとして注目し、その振動数変化をもとに議論した。

得られた共鳴ラマンスペクトルのC=N伸縮振動バンドをFig. 1に示す。大腸菌膜中のスペクトルは、膜断片による散乱光強度が大きかったため、強度補正後のスペクトルを示している。可溶化状態のTRのC=N伸縮振動バンドは、加熱前では $1639\text{ cm}^{-1}$ に観測された。加熱後では $1646\text{ cm}^{-1}$ に観測され、加熱前後で振動数に顕著な違いが見られた。可溶化状態では、体積排除クロマトグラフィーにより、加熱前は三量体、加熱後は単量体であることを確認した。これより、三量体より単量体のC=N伸縮振動の振動数が高いことがわかった。これは、TRでは会合状態の違いにより、各プロトマー間の界面での構造変化が発色団構造に影響を及ぼすことを示唆している。一方、大腸菌膜中のTRのC=N伸縮振動バンドは、加熱前と後の両者ともに $1639\text{ cm}^{-1}$ に観測され、振動数に変化が見られなかった。また、この振動数は、可溶化状態の加熱前の振動数と一致していた。また、可溶化状態では、吸収極大波長が単量体化に伴い $530\text{ nm}$ から $524\text{ nm}$ へシフトするが[1]、リポソームに再構成したTRの吸収スペクトルでは加熱前後で違いは見られなかった。この結果から、膜中では加熱前、加熱後ともに三量体を形成している、あるいは、単量体となっても発色団周辺の構造に変化がないことが示唆された。

これらのことから、TRの相対的熱安定性は、界面活性剤中と細胞膜中とで異なり、細胞膜中では増すことが明らかになった。本研究の結果は、タンパク質周辺の環境がTRの会合状態あるいは発色団構造に影響を与えていることを示している。また、細胞膜がTRの発色団構造ならびに会合状態維持にとって重要であることが明らかとなった。



**Fig.1** Resonance Raman spectra of (a) the solubilized TR and (b) the membrane-embedded TR.



**Fig.2** Oligomerization change of (a) the solubilized TR and (b) the membrane-embedded TR.

### 【参考文献】

[1] Tsukamoto, Demura and Sudo, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 12383.

[2] 塩谷, 水野, 塚本, 須藤, 水谷, 日本化学会第 97 春季年会講演予稿集, 2B1-16 (2017).