

## サル緑視物質の塩化物イオン結合におけるQ114の構造的な役割

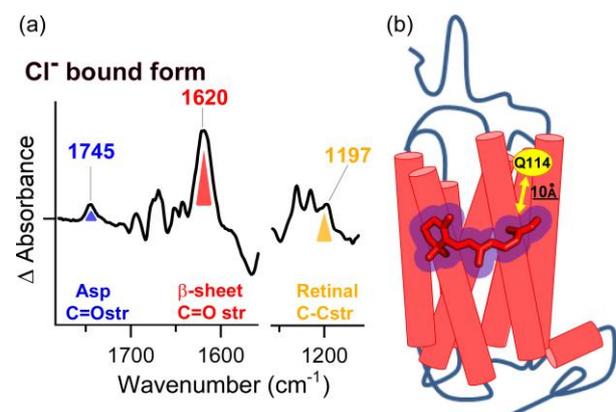
<sup>1</sup>名工大院工, <sup>2</sup>京大霊長研○片山耕大<sup>1</sup>, 中村駿太<sup>1</sup>, 佐々木琢磨<sup>1</sup>, 今井啓雄<sup>2</sup>, 神取秀樹<sup>1</sup>Structural role of Q114 for Cl<sup>-</sup> binding in primate green-sensitive visual pigment○Kota Katayama<sup>1</sup>, Shunta Nakamura<sup>1</sup>, Takuma Sasaki<sup>1</sup>, Hiroo Imai<sup>2</sup>, Hideki Kandori<sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, Japan<sup>2</sup> Primate Research Institute, Kyoto University, Japan

## 【Abstract】

Long-wavelength-sensitive (LWS) pigments, which belong to one of four classes of vertebrate cone visual pigment, possess a chloride binding site in its protein moiety. The binding of chloride alters the absorption spectra of LWS; this is known as the chloride effect. Recently, we successfully observed chloride binding-induced structural change of monkey green (MG) pigment by ATR-FTIR spectroscopy, from which structural information of the putative chloride binding site was elicited including secondary structure of  $\beta$ -sheet, the hydroxyl group of Tyr, and the protonation state of carboxylate. Here, we report that Q114 plays crucial role for chloride binding. Although Q114 is located far away from the chloride binding site due to crystal structure of rhodopsin, the chloride effect is decreased by mutation at position Q114, indicating that chloride cannot bind properly in the protein moiety. Low-temperature FTIR spectroscopy also detects the loss of important structural element for chloride binding by Q114 mutation. Accompanying with protein-bound water analyses and ATR-FTIR study, our results provide insight into the role that Q114 selectively regulates the anion binding.

【序】我々が様々な色を識別できるのは、吸収極大波長の異なる 3 種類の色覚視物質が網膜に存在するからである。これらは同一の発色団分子 11-*cis* レチナールをもつが、タンパク質部分がレチナールの電子状態を制御する結果、色の識別が可能になる。それに加えて色覚視物質の中には、塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>) が結合すると吸収波長が長波長シフトするグループ (グループ L) があり、その波長シフトの分子機構が注目されている[1]。最近我々は、水溶液中でのスペクトル測定が可能な全反射赤外分光法を用いて、サル緑視物質における Cl<sup>-</sup>の結合・解離に伴う構造変化を直接観測することに成功した[2]。その結果、Cl<sup>-</sup>結合によってタンパク質内部の $\beta$ -シート構造が安定化されることを見出した。さらにレチナールやアミノ酸の一官能基の構造変化を捉え、サル緑視物質の Cl<sup>-</sup>結合部位の構造情報を得ることができた。

本発表では、新たに Q114 が Cl<sup>-</sup>の結合に重要であることを発見したので報告する。



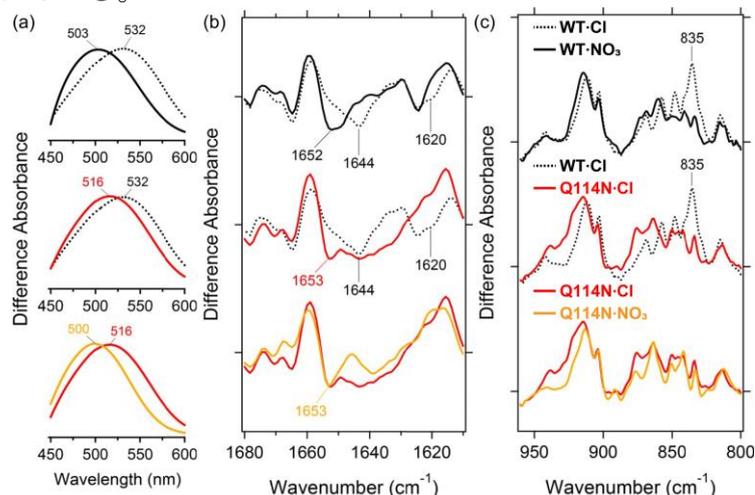
**Fig. 1.** (a) Cl<sup>-</sup> bound induced ATR-FTIR difference spectrum of MG. (b) Structural model of MG based on the crystal structure of bovine rhodopsin.

明暗を認識する (ウシ) ロドプシンの結晶構造を参考にすると、Q114 (ロドプシンの S98) は第二ヘリックスの細胞外側に位置し、Cl<sup>-</sup>結合部位と考えられるレチナール近傍からは 10 Å 程度離れている。従って、Q114 がどうやって Cl<sup>-</sup>結合に影響をもたらすのか、構造基盤に立脚して明らかにすることで、グループ L における Cl<sup>-</sup>結合機構の理解を深められると期待する。具体的には、Q114 の変異体に対する赤外分光法と紫外可視分光法を用いた構造解析を実行し、野生型との比較を行う。

**【方法 (実験・理論)】**哺乳類あるいは昆虫細胞により、サル緑視物質を発現・精製し、PC リポソームへ再構成した。Cl<sup>-</sup>非結合型、硝酸イオン (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 結合型試料を得るため、再構成における透析時に、Cl<sup>-</sup>の代わりに塩なしあるいは NO<sub>3</sub><sup>-</sup>存在下での緩衝液を用いた。再構成試料 30 μL を赤外測定用窓板に滴下し乾燥フィルムを作製した後、D<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub><sup>18</sup>O で水和、77 K での光照射前後の赤外差スペクトルを測定した。一方再構成試料 数μL を全反射赤外分光装置のシリコンプリズムに滴下し、乾燥させた後、Cl<sup>-</sup>を含む緩衝液を還流させた。その後、塩あり/なしでの赤外差スペクトルを計測した。

**【結果・考察】** Fig. 2a は緑視物質の野生型と Q114N 変異体の Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>結合型の紫外可視吸収スペクトルを示している。野生型の Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>結合型で 30 nm 程度の波長シフトが確認されており、過去の文献とも一致した[1]。一方で Q114N では両者における波長シフト幅が小さくなり (16 nm)、Cl<sup>-</sup>効果が減少した。Cl<sup>-</sup>がレチナール近傍に結合するのに対し、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>はイオンサイズが大きいためレチナール近傍に結合できないことを全反射赤外分光解析により示してきたが[2]、Q114N の結果は、Cl<sup>-</sup>がレチナール近傍に結合できないことを示唆している。

Fig. 2b, c は 77 K における光反応初期中間体バツと始状態との赤外差スペクトルを比較したものである。Fig. 2c において野生型の Cl<sup>-</sup>結合型にのみ表れた 835 cm<sup>-1</sup> バンドは、レチナールの C<sub>14</sub> 位の面外変角振動 (HOOP) に対応し、Cl<sup>-</sup>結合の指標バンドとして知られているが[3]、Q114N では Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>いずれの結合型でもバンドが消失した。つまり、Q114 の変異により構造的に Cl<sup>-</sup>がレチナールの C<sub>14</sub> 位近傍に結合できなくなったことを示している。また Fig. 2b における野生型の Cl<sup>-</sup>結合型で観測される 1644, 1620 cm<sup>-1</sup> バンドが、野生型の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>結合型および Q114N のいずれのイオン結合型でも消失した。これらのバンドはβ-シート構造に特徴的な amide-I バンドの振動数に対応しており、Cl<sup>-</sup>結合でのみβ-シート構造が安定化されたことを示唆している。この結果は過去の全反射赤外分光の結果とも一致する[2]。本発表では、内部結合水の違いや、全反射赤外分光測定の結果も合わせ、Q114 が Cl<sup>-</sup>の結合に果たす構造的な役割について議論する。



**Fig. 2.** (a) UV-visible spectra of the Cl<sup>-</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> bound form of WT and Q114N measured at 293 K. (b, c) Light induced FTIR difference spectra of the Cl<sup>-</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> bound form of WT and Q114N measured at 77 K in the 1680-1610 (b) and 950-800 (c) cm<sup>-1</sup> region.

### 【参考文献】

- [1] Z. Wang *et al.* *Biochemistry* **32**, 2125 (1993). [2] K. Katayama *et al.* *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3381 (2018). [3] T. Hirano *et al.* *Biochemistry* **40**, 1385 (2001).