

KR2における極大吸収波長の長波長化と レチナール周辺の構造の関係

¹名工大院工, ²東大院理, ³JST さきがけ
○富田紗穂子¹, 伊藤奨太¹, 井上圭一^{1, 2, 3}, 神取秀樹¹

The relationship between red-shift of the absorption maximum and structure around retinal in KR2

○Sahoko Tomida¹, Shota Ito¹, Keiichi Inoue^{1, 2, 3}, Hideki Kandori¹
¹ Graduate school of engineering, Nagoya Institute of Technology, Japan
² The institute for solid state physics, The University of Tokyo
³ PRESTO, JST

【Abstract】

KR2 is a light-driven sodium pump rhodopsin which is expected to be a new optogenetics tool for neuronal silencing. To avoid phototoxic effect, we tried to make maximum absorption wavelength of KR2 longer and previously found the mutants of P219T, S254A, and P219T/S254A showed red-shift of maximum absorption keeping its ion pump function.

Here, we applied light-induced low temperature FTIR spectroscopy to the mutants of P219 and S254, and analyzed structural element causing red-shift in KR2. Mutation of S254 showed smaller amplitude of a pair of bands derived from protein bound water and disappearance of X-H stretching vibration bands. Crystal structure showed water molecule in vicinity to S254 and side chain of S254 seem to form hydrogen bond with Y218. In addition, we found that HOOP mode correlate with maximum absorption wavelength of KR2. This correlation is considered to be caused by unique hydrogen bonding network and twisted structure around Schiff base in KR2. (154 words)

【序】

KR2は光駆動型ナトリウムポンプロドプシンであり、新たな神経抑制オプトジェネティクスツールとしての応用が期待されている[1,2]。一方、その最大吸収波長は525 nmにあり、より組織透過性が高く光毒性の低いツールの実現のため、吸収波長の長波長化が求められている。そこで、以前我々はKR2よりも長波長に吸収を持つロドプシンのレチナールの周辺のアミノ酸配置を参考に、βイオン環付近のP219と、 Schiff塩基付近のS254について変異を導入した。すると、P219TやS254Aにおいて、イオン輸送活性は保持したまま、最大吸収波長の長波長シフトが達成され。また、P219T/S254Aの二重変異体では、さらに加算的な長波長シフトを示した。(Fig. 1)

しかしこれら長波長シフトした変異体において、野生型との構造的違いについて実験的な知見は全く得られていない。そこで本研究では、新たに始状態におけるレチナールの構造や水分子を含む水素結合ネットワークについて光誘起低温赤外分光法測定を用いて研究を行った。

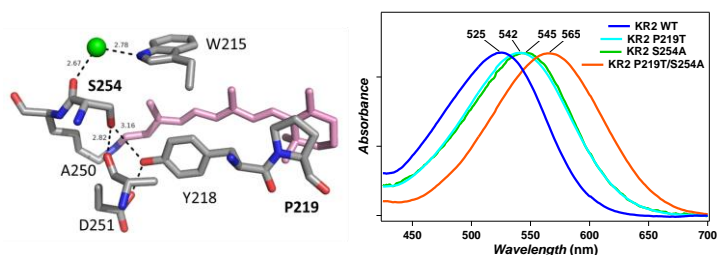


Fig. 1. The structure of KR2 around retinal (PDB ID: 3X3C) (left), and red-shifted mutants for P219 and S254 (right).

【方法 (実験・理論)】

KR2 の野生型や変異体の試料調製は、大腸菌を大量培養してタンパク質を発現し、膜破碎や可溶化などの処理を行った後、Co-NTA カラムによって精製した。この精製試料を脂質二重膜 (POPE : POPG = 3 : 1) に再構成した試料を赤外分光測定に用いた。

赤外分光法では、原子間の結合の振動エネルギーを見ることで、分子構造の変化や水素結合の強度変化を敏感に観測することができる。そしてこれまでに、同じく振動分光法である Raman 分光研究と共に、微生物型や動物型のロドプシンにおいて、最大吸収波長とレチナールの C=C 伸縮振動バンドの間に相関があることが示されてきた[3]。また、ロドプシンのイオンポンプにはタンパク質内で強い水素結合を形成する内部結合水が重要であることが示されており、先行研究により KR2 の野生型では強い水素結合を形成する内部結合水が存在することが示唆されている[4]。

今回 KR2 の野生型の赤外スペクトルと、P219T, S254A, P219T/S254A 変異体の赤外スペクトルを比較することで、変異導入によって引き起こされるレチナールの構造や水素結合環境の変化を観測した。また、最大吸収波長と様々なバンドの相関関係を解析し、KR2 における吸収波長制御に関わる構造的要素の理解を目指した。

【結果・考察】

KR2 P219T, S254A, P219T/S254A の各変異体の赤外スペクトルにおいて、レチナールの C-C 伸縮振動バンドやタンパク質骨格由来のバンドは野生型とほとんど一致していた。つまり、レチナールの all-trans 型から 13-cis 型への異性化や、それに伴う大きなタンパク質骨格の構造変化は野生型とほぼ同じであるために、これらの変異体ではポンプ活性が保たれていたと考えられる。

P219T 変異体では X-H 伸縮振動領域や X-D 伸縮振動領域にもあまり大きな変化は見られず、タンパク質内部の水素結合環境を含めて大きな構造変化はしていないと考えられる (Fig 2, upper)。

一方、S254 の変異体では O-H 伸縮振動バンドの消失や内部結合水由来の水の O-D 伸縮振動バンドの振幅の減少が観測された。消失した O-H 伸縮振動バンドは S254 の側鎖由来、O-D 伸縮振動バンドは結晶構造で S254 の主鎖と W215 の間に存在する水分子由来と考えられる。また、 Schiff 塩基の N-D 伸縮振動バンドが低波数シフトしており、 Schiff 塩基と対イオンの水素結合が WT より強くなっていると考えられる。

さらに、過去の研究で多くのロドプシンにおいて極大吸収波長との相関が知られている C=C 伸縮振動に加え、今回新たにレチナールの 15C-H と N-H の HOOP 振動の波数と最大吸収波長との間に相関関係があることを見出した。今回 KR2 にのみ特徴的に 15C-H と N-H の HOOP 振動の波数と最大吸収波長との間に相関が見られたことについて、KR2 は他のロドプシンと異なる位置に対イオンがあり、それによって Schiff 塩基付近でレチナールの大きな構造ひずみを持つことから、 π 電子の状態に応じてこれらの結合が鋭敏に影響を受けるようになったためであると考えられる。

【参考文献】

- [1] K. Inoue *et al.* *Nat. Commun.* **4**, 1678 (2013).
- [2] H. E. Kato *et al.* *Nature*, **521**, 48 (2015).
- [3] K. Kajimoto *et al.* *J. Phys. Chem. B* **212**, 4431 (2017).
- [4] Y. Nomura *et al.* *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3164 (2018)

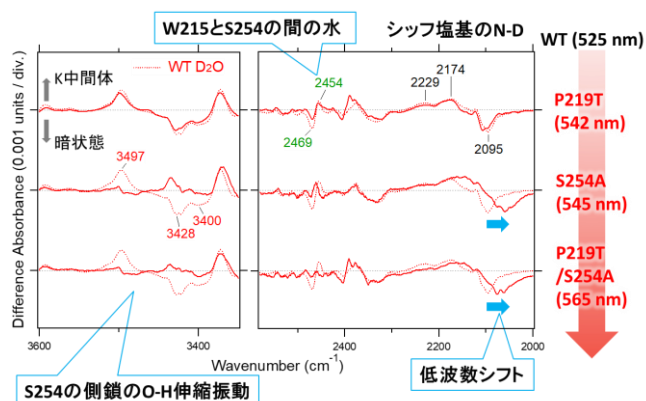


Fig. 2. FTIR spectra of KR2 WT, P219T, S254A, and P219T/S254A in 3600-3350 and 2580-2000 cm^{-1} regions.