

真核生物由来の古細菌型ロドプシンにおけるプロトンポンプ活性と内部結合水の水素結合強度との相関について

(名工大院工¹・CREST/JST²・University of Guelph³)

○古谷祐詞^{1,2}、住井昌代¹、Leonid S. Brown³、Stephen A. Waschuk³、
Arandi G. Bezzera Jr.³、神取秀樹^{1,2}

【序】 プロトンポンプ蛋白質は、光や化学エネルギーを利用して、膜内外にプロトン濃度勾配を形成する膜タンパク質である。その電気化学ポテンシャルを利用して、ATP合成酵素が生物の生存に必須なATPを合成するため、生物のエネルギー生産工場の動力源と言える。古細菌に存在するバクテリオロドプシン(BR)は光エネルギーを用いる世界最小のプロトンポンプ蛋白質である。様々な分光学的手法およびX線結晶構造解析により、光反応前および反応後の中間体の構造情報が得られており、最も良く分かっているプロトンポンプ蛋白質と考えられている。また、BRのような古細菌型ロドプシンは古細菌にしか存在しないと考えられてきたが、近年のゲノム解析の結果、菌類である *Neurospora crassa* や *Leptosphaeria maculance* などの真核生物や、ラン藻や紅色細菌などの真正細菌にも存在することが明らかとなり、より広い生物界に存在するタンパク質であることが分かってきた。

本研究の対象となる *Leptosphaeria Rhodopsin* (LR) は真核生物で見つかった古細菌型ロドプシンの中で、初めてプロトンポンプ活性があることが明らかとなったタンパク質である。一方、LR とのアミノ酸配列の一致度が 55.8 % であるにも関わらず (図 1)、ポンプとしてはたらず、センサーとして機能すると考えられている *Neurospora Rhodopsin* (NR) とはどのような構造的相違があるのかは良く分かっていなかった。本研究では低温赤外分光法により、レチナール異性化直後の K 中間体と光反応前との赤外差スペクトルを測定し、ポンプ活性に重要なレチナール周辺構造の違いを明らかにすることを目的に研究を行った。さらに、効率的なポンプ機構に重要なシッフ塩基へのプロトン供与基が、LR ではアスパラギン酸 (Asp150) であり、NR ではグルタミン酸 (Glu142) であるが、その Glu は機能していない点に着目し、LR の D150E、N 変異体についても時間分解可視吸収分光測定および低温赤外分光測定を行った。

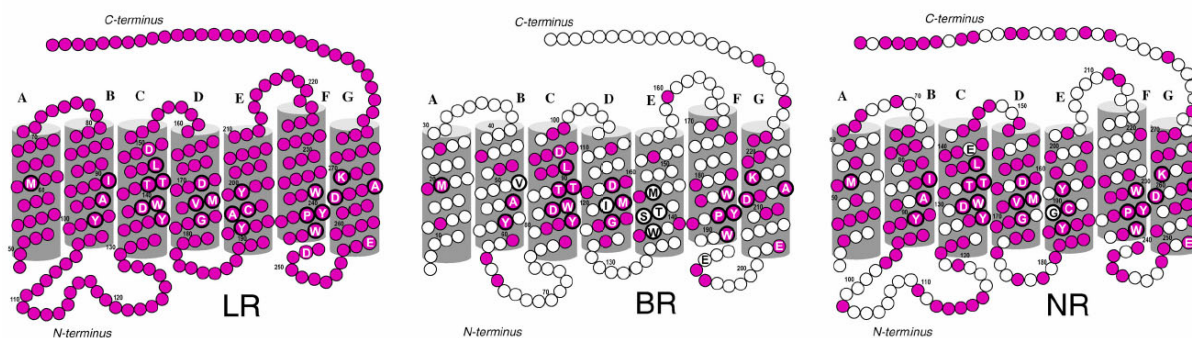
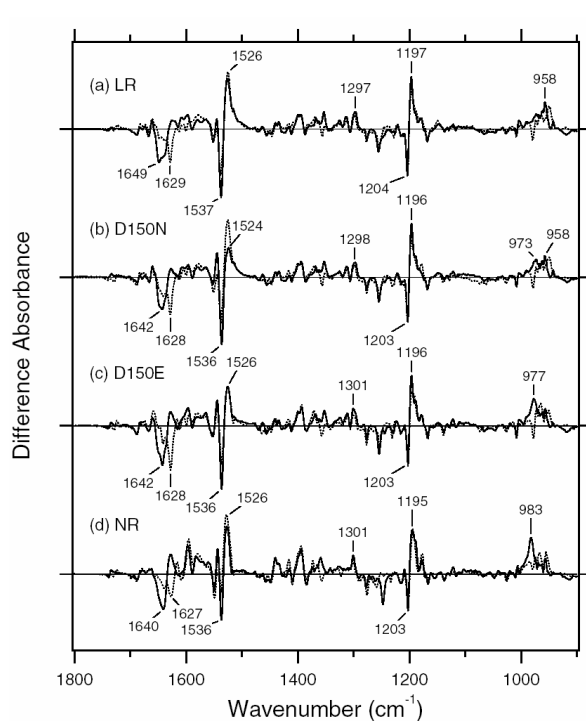


図 1 LR、BR、NR のアミノ酸配列の比較。BR、NR において、LR と同じアミノ酸を持つものを赤紫色で示した。太丸で囲んだアミノ酸は BR の結晶構造においてレチナールから 10 Å 以内に存在し、レチナール結合ポケットを形成する。

【実験方法】 LR は酵母菌 *P. pastoris* を用いて発現し、膜各分を界面活性剤 n-dodecyl- β -D-maltoside で可溶化した後に、Ni-NTA アガロースカラムで精製した。LR 溶液を DMPC と DMPA の比率が 9:1 のリポソームに再構成した後に、80 μ L (約 2 mg/ml の LR 濃度) を赤外窓板上で乾燥させ、フィルム試料を得た。1 μ L 程度の水 (H_2O , D_2O , $D_2^{18}O$) を試料近傍に置き、密閉することにより、試料を水和した。その後、K 中間体の安定化温度である 77 K まで冷却し、光照射前後の赤外差スペクトルを測定した。

【結果と考察】 LR の K 中間体との赤外差スペクトルを、過去に測定した NR[1]および BR の結果と比較したところ、アミノ酸配列の一致度が高い NR ではなく、一致度は低いが同じくプロトンポンプ活性のある BR と比較的良く似ていることがわかった[2]。特にレチナールの振れを反映する水素面外変角振動 (HOOP) については、NR の K 中間体は 983 cm^{-1} に最も大きなピークがあるが、LR では BR と同様に 958 cm^{-1} に現れた (図 2)。また、強い水素結合を形成した水分子に由来する O-D 伸縮振動は NR には観測されなかったが、LR では 2257 cm^{-1} に観測され、対照的な結果となった。我々は他の古細菌型ロドプシンに対する網羅的な赤外分光計測から、プロトンポンプ活性のあるものにはこのような強い水素結合を形成した水分子が存在することを見出しており[3]、LR と NR の結果もこの相関に合うものであった。

次にポンプの効率に関する Asp150 の Glu 変異体について時間分解可視吸収測定を行った結果、興味深いことに NR と同様に光反応サイクルが遅くなり、Glu はカルボン酸があるにも関わらずシッフ塩基へのプロトン移動に関与していないことがわかった。さらに、赤外分光測定によりシッフ塩基近傍の構造解析を行った結果、水分子の水素結合ネットワークにはほとんど影響がないが、ヘリックス構造に違いが見られ、HOOP



も 977 cm^{-1} へとシフトし NR 型に近くなった。Asp と Glu の側鎖長の違いがヘリックスのパッキングに影響した結果と考えられるが、レチナールから約 10 Å 離れたアミノ酸残基の変異によって NR との類似性が増したことは興味深い結果である。D150E 変異体にも強い水素結合を形成した水分子が存在することから、この変異だけでは NR のポンプ活性の喪失を説明することはできないが、効率的なポンプとしてはたらくのに必要な速い光反応サイクルはメチレン基一個の違いも許さない精緻な構造によってもたらされていることが明らかとなった。

図 2 LR の野生型、D150E, N 変異体、NR の野生型における K 中間体との赤外差スペクトル
実線は H_2O 水和、点線は D_2O 水和での結果。

- [1] Y. Furutani, A. G. Bezzer Jr., S. A. Waschuk, M. Sumii, L. S. Brown, and H. Kandori, (2004) *Biochemistry* 43, 9636-9646.
 [2] M. Sumii, Y. Furutani, S. A. Waschuk, L. S. Brown, and H. Kandori, (2005) *Biochemistry* 44, 15159-15166.
 [3] Y. Furutani, M. Shibata, and H. Kandori, (2005) *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 661-666.