

大阪大学グループ
(グループリーダー：水谷 泰久)

時間分解共鳴ラマン分光法によるグロイオバクターロドプシンの プロトン輸送機構の研究

中嶋亜侑美¹, 水野操¹, 神取秀樹², 水谷泰久¹

阪大院理¹, 名工大院工²

【序】グロイオバクターロドプシン (GR) は、光エネルギーを利用してプロトンを細胞内から細胞外へと輸送する。定常状態の GR が光を吸収すると、レチナール発色団は全トランス形から 13-シス形へと異性化する。光異性化後、タンパク質は複数の中間体 (K, L, M, N および O 中間体) を経由し、定常状態に戻る光サイクル反応 (図 1) を示す。プロトン輸送機構を理解するためには、各中間体における発色団の構造を明らかにすることが重要である。本研究では、定常状態、K, L, M および N 中間体について、共鳴ラマン分光法を用いて、ナノ秒からミリ秒領域におけるレチナール発色団の構造および周辺残基との相互作用を調べた。

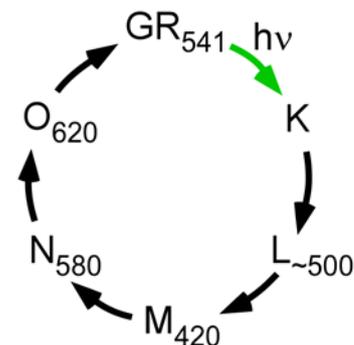


図 1. グロイオバクターロドプシンの光サイクル反応

【実験】GR は大腸菌系で発現させ、界面活性剤により可溶化し、カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。時間分解共鳴ラマンスペクトルの測定は、ポンプ - プロブ法を用いて行った。ポンプ光には 532 nm および 561 nm、プロブ光には 400 nm, 475 nm および 532 nm の波長の光を用いた。ラマン散乱光は、前置分光器を通してレイリー散乱光を取り除いた後、シングル分光器で分散し液体窒素冷却型 CCD 検出器で検出した。

【結果・考察】475 nm をプロブ光波長とした時間分解共鳴ラマンスペクトルでは、2 本の C=C 伸縮振動 $\nu(\text{C}=\text{C})$ および 2 本の C=N 伸縮振動 $\nu(\text{C}=\text{N})$ バンドが観測された。遅延時間 10 μs にかけて、いずれのバンドも相対強度が変化した。これは、この時間帯に 2 種類の中間体が存在することを示している。過去の過渡吸収測定の結果から、この時間帯では L 中間体が観測されている。このため、GR には 2 種類の L 中間体が存在することがわかった。これらを L_{fast} , L_{slow} 中間体と名付けた。さらに、遅延時間 5 ms にかけて、新たな $\nu(\text{C}=\text{C})$ および $\nu(\text{C}=\text{N})$ バンドが観測された。バンドが出現した時間帯から、これらは N 中間体に由来すると帰属した。また、532 nm および 400 nm のプロブ光を用いて、それぞれ K および M 中間体のラマンスペクトルを観測した (図 2)。

各中間体について、軽水および重水中でのスペクトルを観測し、同位体効果を調べた。図 3 に示すように、M 中間体の $\nu(\text{C}=\text{N})$ バンドは重水素置換による波数シフトを示さなかったが、その他の中間体では低波数シフトが観測された。これらから、レチナール発色団のシッフ塩基は M 中間体で脱プロトン化状態となり、N 中間体で再プロトン化状態となることがわかった。さらに、M 中間体の生成速度、減衰速度はともに重水中では軽水中に比べて遅くなり (図 4)、これらの過程でプロトン移動が起きていることを示した。

$\nu(\text{C}=\text{N})$ モードは、NH 変角振動モードとカップルしているため、その振動数はプロトン化シッフ塩基の水素結合の強さを反映する。図 3 に示した軽水中の $\nu(\text{C}=\text{N})$ バンドの振動数および同位体効果

の大きさから、 L_{slow} 中間体でシッフ塩基とカウンターイオンとの水素結合が最も強くなることがわかった。また、 L_{slow} および M 中間体のバンド強度の時間変化から、これらの中間体は速やかに平衡関係に達することが示唆された。以上の結果から、 L_{slow} 中間体生成の過程でカウンターイオンがシッフ塩基に近づき、プロトン移動のエネルギー障壁を低くしているという仮説を提案した。

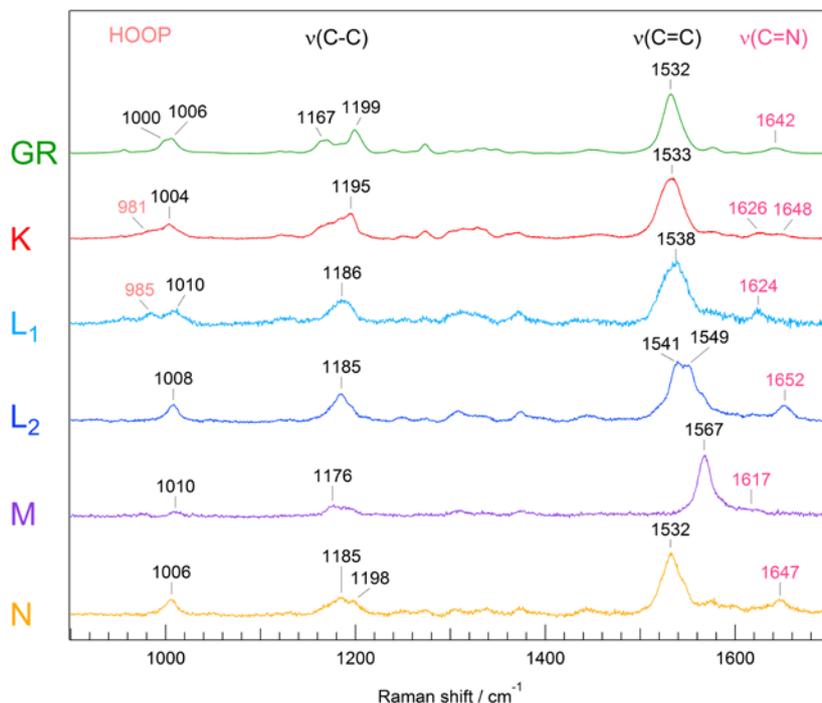


図 2. グロイオバクターロドプシン反応中間体の共鳴ラマンスペクトル

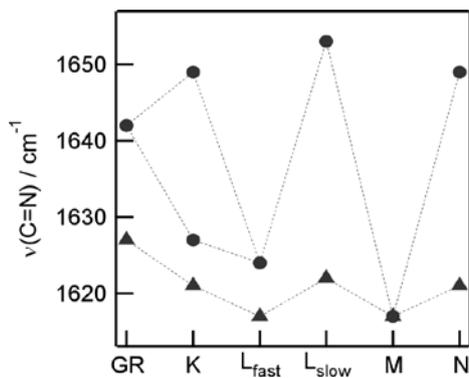


図 3. 定常状態および各中間体の $\nu(\text{C}=\text{N})$ バンドの振動数およびその同位体効果。軽水中 (●)、重水中 (▲) の値。

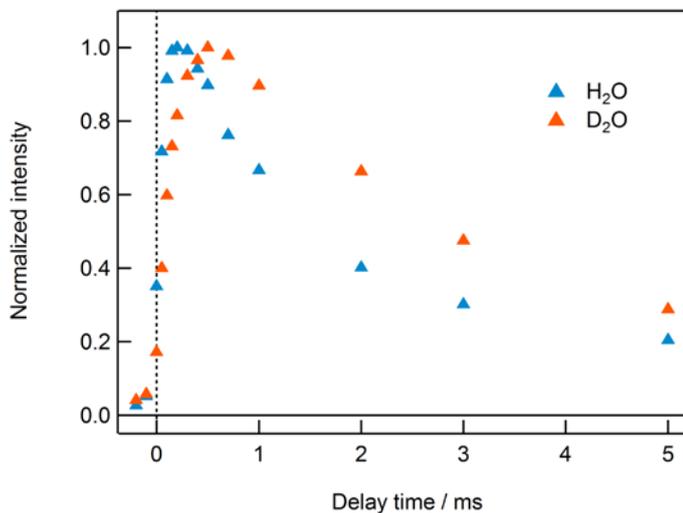


図 4. M 各中間体の $\nu(\text{C}=\text{C})$ バンド強度の時間変化。軽水中 (青)、重水中 (橙) の値。

酸素センサータンパク質 FixL の構造変化に基づく活性制御機構の研究

山脇竹生¹, 石川春人¹, 水野操¹, 中村寛夫², 城宜嗣², 水谷泰久¹

阪大院理¹, 理研・城生体金属科学²

【はじめに】FixL はマメ科植物と共生する根粒菌に含まれる酸素センサータンパク質で、細胞内酸素濃度を感知する。低酸素下ではリン酸化酵素活性を持ち、高酸素下では活性を抑制することで窒素固定系遺伝子の発現調節を担う。FixL はガス分子と結合するヘムを含むセンサードメインと、リン酸化を触媒する酵素ドメインで構成されており、ガス分子の結合に伴う構造変化がドメイン間を伝達することで活性の制御を行うと考えられている。しかし、酵素ドメインの結晶構造は報告例がなく、構造変化による活性制御を直接観測した例はいまだかつてない。本研究では、紫外共鳴ラマン分光法による全長 FixL の構造変化の観測に加え、リン酸化活性測定を行うことで、活性制御に重要な残基の構造変化をとらえることに成功した。

【実験】試料は大腸菌発現したものをカラムクロマトグラフィーで精製し、調製した。時間分解測定は、ポンプ光に波長 532 nm、プローブ光に波長 233 nm のパルス光をもちいて行った。リン酸化活性測定は、リン酸基と相互作用をする Mn²⁺錯体である phos-tag 試薬をゲルに混合し、SDS-PAGE を行った。FixL がもつ 7 つのチロシン(Tyr)残基のうち、いずれか 1 残基をフェニルアラニン(Phe)残基に置換した変異体を 7 種作製した。

【結果・考察】図 2 は FixL およびその変異体の酸素結合前後のスペクトル変化を示している。野生型(WT)の Tyr および Phe 残基由来のバンドに変化が見られたことから、酸素の結合に伴う FixL の構造変化をスペクトル変化として観測することができた。変異体における酸素の結合に伴うスペクトル変化は、WT の変化と比べると、変化量が異なっており、特に Tyr201 変異体で違いが大きかったことから、スペクトル変化は Tyr201 の寄与が大きいことを明らかにした。Tyr201 変異体についてリン酸化活性測定をした結果、WT では酸素の添加により活性が抑制された一方、変異体では抑制がほとんど見られなかった(図 3)。このことか

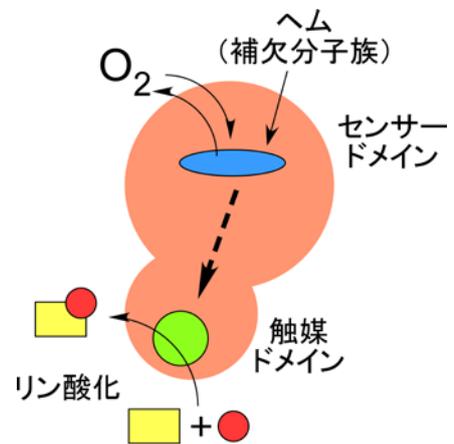


図 1. 酸素センサータンパク質 FixL の作動機構

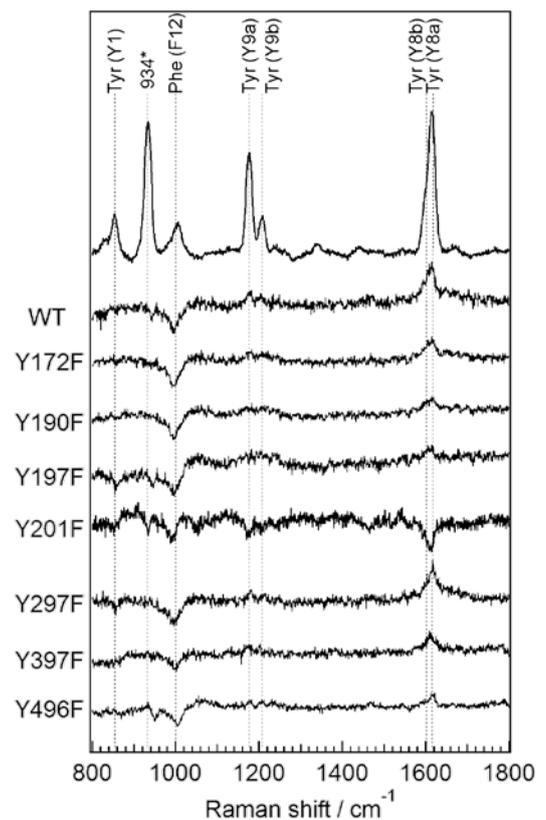


図 2. FixL WT および変異体の紫外共鳴ラマンスペクトル: 酸素結合に伴うスペクトル変化を、(酸素結合形) - (非結合形) の差スペクトルとして示す。また、最上段には比較のため酸素結合形 FixL のスペクトルを示す。

ら Tyr201 が活性制御に重要な残基であることが明らかになった。Y8a バンドの強度増大は Tyr の水素結合が強くなったことを反映しており、酸素の結合に伴い、Tyr201 の水素結合が強まり、活性が抑制されたと考えられる。Phe 変異体では水素結合を形成できないことから、抑制がみられなくなったと考えられる。以上のことから、Tyr201 の水素結合強度変化が活性制御に重要であることを明らかにした。

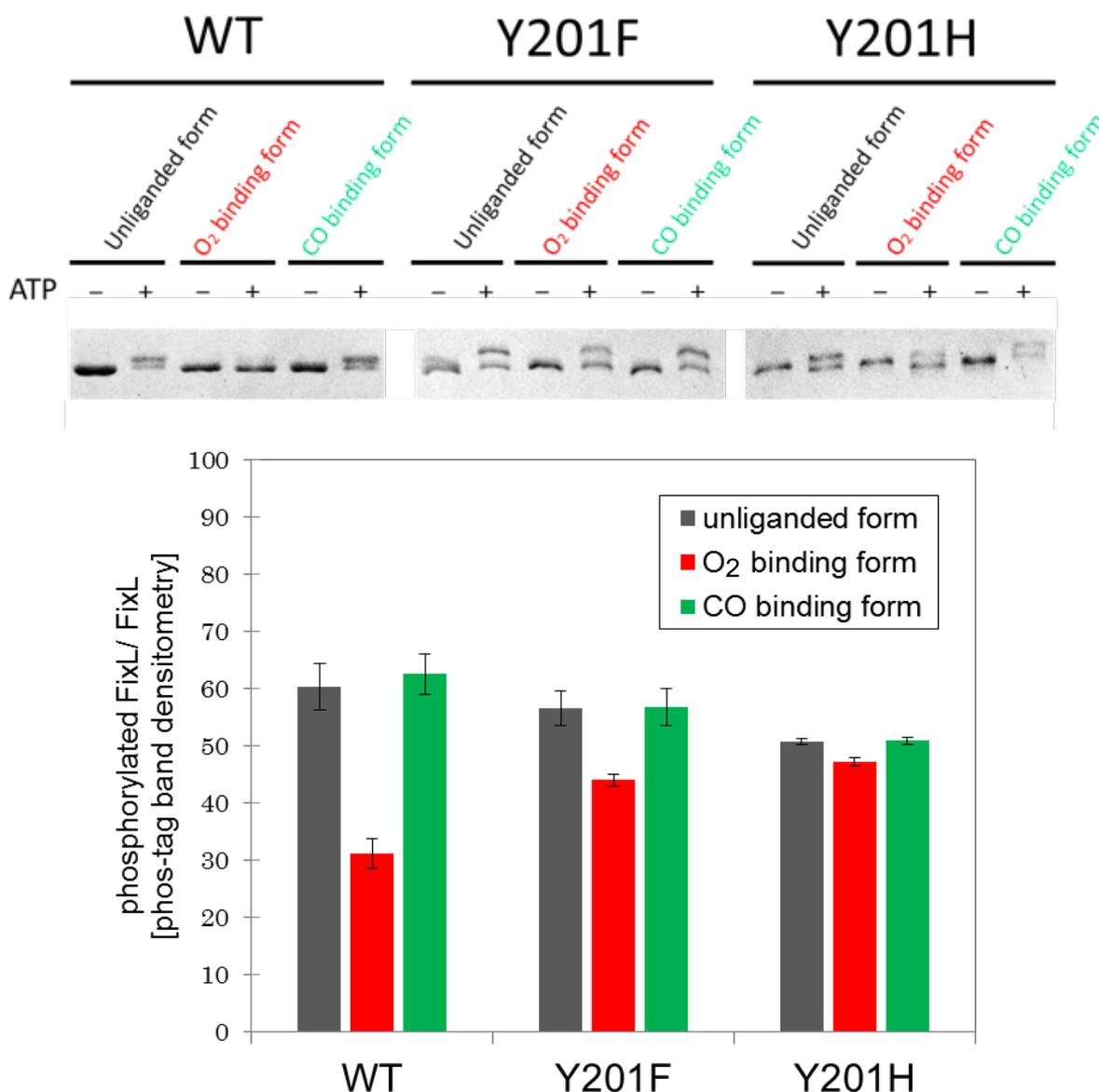


図 3. Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化活性の定量。(A) 電気泳動のゲル写真、(B) ゲルのバンド定量に基づいて得られたリン酸化タンパク質の割合。

【参考文献】

- (1) Hiruma, Y. Kikuchi, A.; Tanaka, A.; Shiro, Y.; Mizutani, Y. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6086-6096.
- (2) Yoshida, Y.; Ishikawa, H.; Aono, S.; Mizutani, Y.; *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* **2012**, *1824*, 866-872.
- (3) Yano, S.; Ishikawa, H.; Mizuno, M.; Nakamura, H.; Shiro, Y.; Mizutani, Y.; *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 15786-15791.