

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06837

研究課題名(和文) 温度圧力条件下の赤外分光法による耐熱性ロドプシンの光反応機構の解明

研究課題名(英文) Time-resolved infrared spectroscopy of the thermophilic rhodopsin under various pressures and temperatures

研究代表者

黒井 邦巧 (Kuroi, Kunisato)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：70757757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、好熱菌由来のロドプシンTRの光反応を熱力学的に特徴づけることを目指して、様々な温度条件と圧力条件下で、時間分解赤外分光法を用いて光反応の解析を試みた。変異体の測定を組み合わせたTR光反応の解析から、まず光反応における分子内プロトン移動の経路を明らかにした。次に30 から70 までの様々な温度における測定から、TR光反応機構が約40 でスイッチすることを見出した。最後に、圧力下での時間分解赤外分光計測が可能な系を構築し、バクテリオロドプシンを用いて、初めて圧力下での時間分解赤外スペクトルを得た。しかし、測定系の問題から期間内にTR光反応に適用し、圧力下測定を行うことはできなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the photoreaction of the thermophilic rhodopsin (TR) by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy (TR-FTIR) under various temperature and pressure conditions to thermodynamically characterize its photoreaction. First, from the TR-FTIR measurement of TR and its mutants at 50 degree, we revealed the intramolecular proton transfer mechanism of TR. Second, from the TR-FTIR measurement of TR at various temperatures from 30 to 70 degrees, we found that the photoreaction mechanism of TR seemed to switch at about 40 degree. Finally, we developed the measurement system of high-pressure TR-FTIR, and applied it to the photoreaction of the bacteriorhodopsin (BR). We succeeded in measuring the TR-FTIR spectra of BR under high-pressure for the first time. However, due to the bad signal to noise ratio of the system, unfortunately we couldn't apply that system to TR by the end of this project.

研究分野：物理化学

キーワード：耐熱性ロドプシン 時間分解赤外分光計測 高温 高圧 光反応

### 1. 研究開始当初の背景

自然界では、植物の光合成に代表されるように、光エネルギーを用いたエネルギー生産が生命活動に利用されている。プロトンポンプ型のロドプシンは、このような光を用いたエネルギー獲得に用いられる代表的な分子であり、菌類の光エネルギー利用に用いられている。プロトンポンプ型のロドプシンは、細胞膜に埋まった膜タンパク質であり、分子内にあるレチナールという分子（発色団と呼ばれる）で光を受け取る。光を受け取ると、プロトン（水素イオン）が細胞外へとポンプされて、細胞膜の内側と外側にプロトン濃度の勾配を作って、化学エネルギーを作り出す。この光によって、プロトンをポンプする過程はロドプシンが起こす光反応として、よく研究されている。このようなロドプシン分子には、多くの種類が存在するが、最近になって非常に高熱に強いものが発見され、**thermophilic rhodopsin (TR)**と名付けられた。タンパク質分子は普通、50度程度で、構造が壊れて失活してしまうが、TRは75°Cの高温でも安定に機能する。本研究では、TRがなぜ高温でも安定に機能することができるのかを、TRの光反応の観点から明らかにすることを目指した。

### 2. 研究の目的

フーリエ変換赤外分光法(FTIR)は、赤外スペクトルからタンパク質の骨格構造の変化やアミノ酸側鎖のプロトン化状態の変化などの情報を得ることが可能な分光法である。本研究では、TRの光反応における構造変化を時々刻々と赤外スペクトル測定を行うことで、明らかにすることを目指した。このような方法を時間分解FTIR計測(TR-FTIRと略記)と呼ぶ。光反応の測定は、TRの生理的環境温度である70°Cから室温付近の30°Cまでの温度条件で行った。これにより、光反応が受ける温度による摂動を検討することにした。さらに、もうひとつの基本的な物理パラメータである圧力も加え、光反応への圧力摂動についても検討することにした。熱力学では、反応速度や平衡定数への温度摂動はエネルギーに関する量(エンタルピー $\Delta H$ 、エントロピー $\Delta S$ )を与え、圧力による摂動は構造に関する量(体積量 $\Delta V$ )を与える。これらの摂動を用いて、TRの光反応を熱力学的な観点より特徴づけることを目指した。特に、圧力をかけながら、タンパク質の反応を赤外スペクトルから調べた研究は、これまでに例がなく、新たな計測系の開発という点からも興味深い。

### 3. 研究の方法

#### (1) 常温～高温条件下での TR-FTIR 測定

岡山大学、須藤研究グループの塚本助教(当時)より、TRおよび、TR変異体の試料

を作成してもらい、提供を受けた。TRと比較を行うために、TRと近縁の種であり常温性のグライオバクターロドプシン(GR)の提供も受けた。これらの試料は、脂質膜上に再構成させて、生理的な条件と同じで膜上で働くようにしてある。時間分解 FTIR 計測は、Bruker社製の赤外分光器 Vertex80を用いて行った。ロドプシンの光反応は、ナノ秒パルスレーザーによる波長 530 nm 付近での光励起によって起こした。測定試料の温度は、温度管理した水を赤外セルホルダー中に循環させて制御した。野生型の TR の測定において、測定温度は 30°C から 70°C まで、10°C 刻みに変えた。TR の変異体、および GR については 50°C で測定を行った。

#### (2) 高圧力条件下における赤外分光測定

測定試料への圧力印加のために、シンテック社よりダイヤモンドアンビルセル(DAC)と呼ばれる高圧セルを購入した(図1左上)。DACを用いた測定では、図1右に示した模式図のように、試料をガスケットと呼ばれる厚さ 20  $\mu\text{m}$  のステンレス箔に空いた直径 1.1 mm の穴に封入し、上下からダイヤモンドの頭頂部で圧力をかける。この穴に、赤外光を正確に通すためには、DACの位置を正確に制御することが必要となる。そこで、分子科学研究所の装置開発室の協力のもと、DACの位置と温度を正確に制御できるような DACホルダーを新たに製作した(図1左下)。これを赤外分光器内に取り付けて、圧力下での TR-FTIR 計測を行った。TR-FTIR 計測は赤外分光器 Vertex80 のステップスキャンモードを用いて行った。

後述する理由から、圧力下測定ではバクテリオロドプシン(BR)と呼ばれる代表的なロドプシンを測定試料とした。BRは、名古屋工業大学の神取研究グループの好意により提供を受けた。BRは重水中に懸濁して、ガスケット上の試料穴に封入した。内部圧力は、試料と一緒に封入した標準物質(硫酸バリウム)が与える赤外スペクトルより見積もった。

圧力は、図1の写真に示した DAC 上の 3

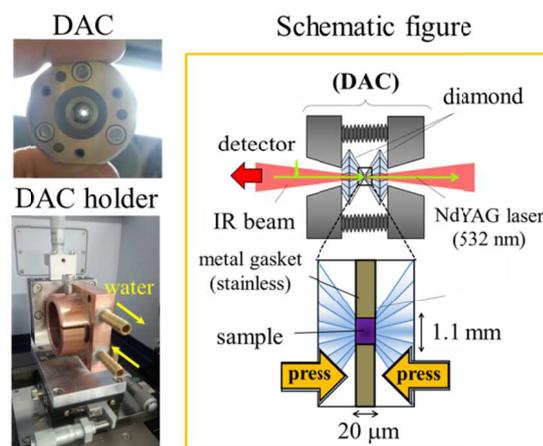


図1 構築した高圧力下 TR-FTIR 測定系

本のスクリーンを締めることで発生させ、0.1, 100, 200, 300, 400 MPa の圧力条件を用いた。(0.1 MPa が大気圧にあたる。) 測定試料の温度は、DAC ホルダー内に温度管理された水を循環させることで制御し、測定温度は 25°C に保った。この圧力下での測定系の構築にあたり、立命館大学薬学部、加藤稔教授からの助言を受けた。

#### 4. 研究成果

##### (1) TR の温度条件 TR-FTIR 測定

##### ① TR の TR-FTIR スペクトル

図 2 に 70°C において得られた TR の TR-FTIR スペクトルを示す。70°C という高温において、このようなロドプシンの時間分解赤外スペクトルが測定されたのは、我々の知る限り本研究が初めての成果である。ここに現れている赤外スペクトルは、光照射後の各時間における TR の構造変化を表しており、スペクトルを読み解くことでタンパク質の動きを読み取ることができる。たとえば、1753 cm<sup>-1</sup> のピークは、分子内のカルボン酸がプロトン化したことを示している、これは、発色団であるレチナールから、近傍のアスパラギン酸残基にプロトンが移動した過程を表している。また、1700 cm<sup>-1</sup>-1600 cm<sup>-1</sup> に現れているピークは、アミド I バンドと呼ばれていて、タンパク質の骨格構造の変化に由来している。スペクトルから、特に 1628 cm<sup>-1</sup> のバンドが比較的遅い時間から出現してきている。近縁種の GR との比較から、1628 cm<sup>-1</sup> で表されるこのバンドは、TR に特徴的な骨格構造変化であることが分かった。

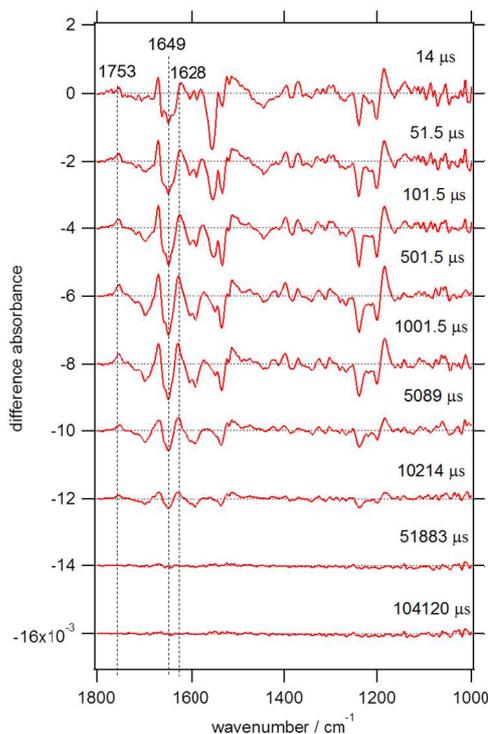


図 2 70°C での TR の TR-FTIR スペクトル

##### ② 変異体を用いたプロトン移動経路の同定

①で見られた 1753 cm<sup>-1</sup> のバンドは前述のように、分子内のプロトン移動に由来するものであり、プロトンポンプ型ロドプシンの反応メカニズムを解析する際の重要なシグナルとなる。そこで、このバンドが分子内のどのアミノ酸残基に由来するのかを同定すべく、TR の変異体を用いた解析を行った。プロトンポンプ型ロドプシンでは、このバンドは発色団レチナールから近傍のアスパラギン酸残基へのプロトン移動過程であることが典型的である。そこで TR の場合でも同様のことが起きていると狙いをつけ、TR のレチナール近傍に存在するアスパラギン酸残基 95 番と 229 番をそれぞれ、グルタミン酸およびアスパラギンに変える 4 種の変異体を作成し、TR-FTIR 計測と解析を行った。その結果、1753 cm<sup>-1</sup> のバンドは、レチナールからのプロトンをアスパラギン酸残基 95 番が受け取ったことを表していることが明らかになった。さらに、この過程にはアスパラギン酸残基 229 番も関与している、この部位にカルボキシル基がないと起こらないことも明らかになった。プロトンポンプ型ロドプシンの反応における知見を鑑みると、この部位が水分子を介してアスパラギン酸残基 95 番と水素結合をしていることが推定された。以上のことから、TR の光反応における発色団からのプロトン移動経路を、図 3 のように提案することができた。

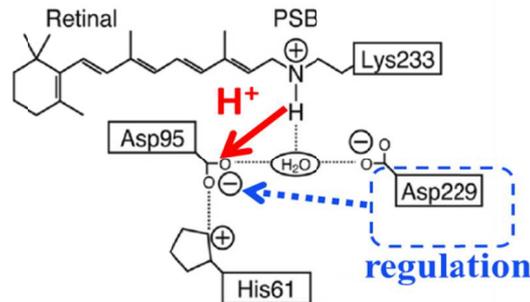


図 3 本研究より分かった TR の発色団レチナールからのプロトン移動経路 (赤矢印)。青矢印でアスパラギン酸 229 番 (Asp229) から、プロトン移動が制御を受けていることを表す。Tsukamoto, *et. al.* (2013) を改変。

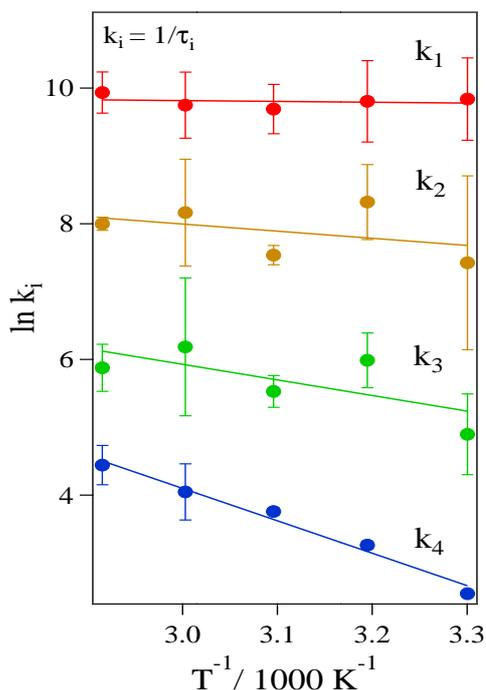
##### ③ TR 光反応の温度依存性の解析

30°C から 70°C までの温度条件で、TR 光反応の TR-FTIR 計測を行った。得られた赤外スペクトルの時間変化を、特異値分解解析とグローバル指数関数フィットによる解析により詳細に解析を行った。その結果、いずれの温度でもスペクトルの時間変化は、4 つの時間定数 ( $\tau_1 < \tau_2 < \tau_3 < \tau_4$ ) を持つ指数関数で再現することができた。つまり、反応は、速いものから遅いものまで、少なくとも 4 つのステップより成ることを示唆する。表 1 に各温度

において得られた時定数 $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4$ の値、**図 4** に時定数の温度依存性より得たアレニウスプロットを示す。アレニウスプロットとは、時定数の対数を温度の逆数に対してプロットしたものであり、プロットの傾きより反応におけるエネルギー障壁の大きさ「活性化エネルギー」を見積もることができる。このプロットから各寿命成分に対する活性化エネルギーの値を**表 1**の最下段のように得ることができた。最も遅い成分 $\tau_4$ は、光反応の戻り速度に対応し、この活性化エネルギー(9.5 kcal mol<sup>-1</sup>)は、塚本らが過去に報告している戻り速度の活性化エネルギー(12.6 kcal mol<sup>-1</sup>)と比較的近い値であった。

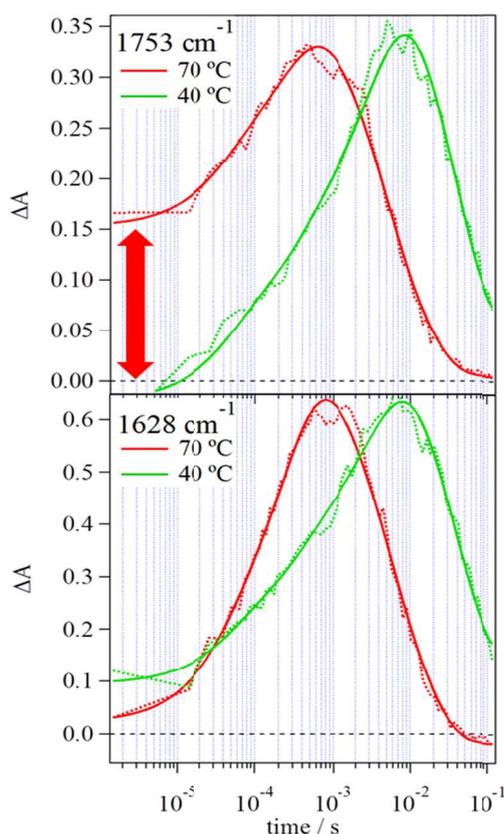
**表 1** 各温度における TR の TR-FTIR スペクトルの解析より得られた時定数と、**図 4** のアレニウスプロットから得た活性化エネルギー。

T / °C	$\tau_1 / \mu\text{s}$	$\tau_2 / \mu\text{s}$	$\tau_3 / \mu\text{s}$	$\tau_4 / \mu\text{s}$
30	63	1000	8800	78000
40	66	280	2700	38000
50	66	540	4100	23000
60	65	370	3300	19000
70	51	340	3000	12000
Ea kCal mol <sup>-1</sup>	0.24	2.1	4.6	9.5



**図 4** **表 1** の時定数の温度依存性より得たアレニウスプロット

上記の各温度における測定と解析から、①で述べた TR に特徴的な骨格構造変化を表す 1628 cm<sup>-1</sup> のバンド、およびレチナルからのプロトン移動過程を表す 1753 cm<sup>-1</sup> のバンドとの間に、興味深い温度依存性が見出された。**図 5** の上パネルに 1753 cm<sup>-1</sup> のバンド強度の



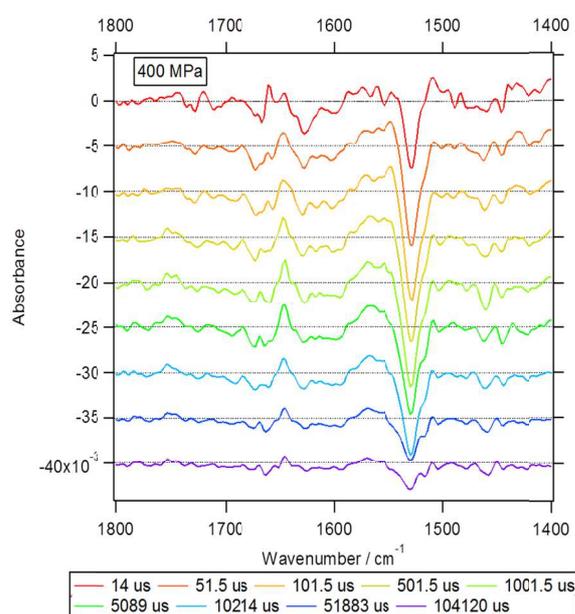
**図 5** (上) 1753 cm<sup>-1</sup> のバンド強度の時間変化 (赤線 70°C、緑線 40°C)。(下) 1628 cm<sup>-1</sup> のバンド強度の時間変化 (赤線 70°C、緑線 40°C)。温度間でバンド強度は規格化している。

時間変化を 40°C (緑) と 70°C (赤) について示し、下のパネルに同様に 1628 cm<sup>-1</sup> におけるバンド強度の時間変化を 40°C と 70°C について示す。70°C での結果である赤線同士を比較すると、1628 cm<sup>-1</sup> の強度の立ち上がりよりも速く、1753 cm<sup>-1</sup> のバンドが立ち上がっていることが伺われる (上段の太矢印)。一方、40°C の結果を表す緑線同士を比べると、両者の立ち上がりは、ほぼ同時である。このことから、TR の生理的環境温度である 70°C においては、レチナルからのプロトン移動が骨格構造変化に先んじて起こっているが、比較的低温ではプロトン移動が遅れてしまっていることが分かる。詳しい解析の結果から、TR の光反応は、40°C を境にして、その反応機構自身に変化が起こることが示唆された。

## (2) 圧力下 TR-FTIR 測定

3(2)で述べたように、圧力下 TR-FTIR 計測が可能な測定系の構築を行った。そのために、分子科学研究所、装置開発室の協力のもと、ダイヤモンドアンビルセル(DAC)の位置と温度が正確に制御可能な DAC ホルダーを製作した(**図 1**)。これを赤外分光器内に取り付け、DAC 開口部へ励起光を導入することで、圧力下での TR-FTIR 測定系を構築した。我々は、この系をまず、バクテリオロドプシン(BR)の光反応に適用した。これは BR が比較的大き

な赤外差スペクトルを与えるためである。その結果、初めて高圧力下で BR 光反応の時間分解赤外差スペクトルを得ることに成功した。代表的な結果として、**図 6** に、400 MPa の圧力下における結果を示す。



**図 6** 400 MPa の圧力下における BR の TR-FTIR スペクトル

しかし、このように BR では圧力下における光反応の測定に成功したが、本測定系においては、DAC を透過する赤外光量が小さく、得られる信号の信号ノイズ比(SN 比)が悪いという短所があった。そのため**図 6** に示した結果も、測定が比較的容易な BR においてさえ、かなりの積算数を要している。これは、主に試料を封入する穴の径が小さく透過赤外光の損失が大きいことや、ダイア表面での反射による赤外光の損失に起因すると考えられる。TR の赤外差スペクトルは、BR のそれよりもかなり小さいので、本測定系をそのまま TR の光反応に適用することは現実的に難しい。TR への適用にあたっては、赤外光の損失を大幅に改善する工夫を行ったり、より強い光源を用いたりして、SN 比を大きく改善する必要がある。残念ながら、本研究計画の期限内には、SN 比を改善して TR に圧力下計測を適用することはできなかった。しかしながら、本研究において、高圧力下 TR-FTIR の系を立ち上げ、初めて、高圧力下でタンパク質反応の時間分解赤外分光計測に成功したので、意義深い成果が得られたと言える。今後は、このような TR の高圧力下計測ができるように、透過赤外光量を増やして SN 比を改善していく必要があるだろう。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 黒井邦巧、木村幸代、青山正樹、古谷祐詞、Time-resolved FTIR study of the photoreaction of bacteriorhodopsin under high pressure、日本化学会、第 97 春季年会、2017 年 3 月 16 日～2017 年 3 月 19 日、慶応義塾大学
- ② 黒井邦巧、塚本卓、本田尚也、須藤雄気、古谷祐詞、Time-resolved FTIR study during the photoreaction in the thermophilic rhodopsin TR、第 17 回国際レチナルタンパク質会議、2016 年 10 月 2 日～2016 年 10 月 7 日、ポツダム (ドイツ)
- ③ 黒井邦巧、木村幸代、青山正樹、古谷祐詞、高圧下における光誘起赤外分光計測系の開発、第 10 回分子科学討論会、2016 年 9 月 13 日～2016 年 9 月 15 日、神戸ファッションマート
- ④ 黒井邦巧、塚本卓、本田尚也、須藤雄気、古谷祐詞、時間分解赤外分光法を用いた耐熱性ロドプシン TR の光反応解析、平成 27 年度日本生物物理学会 中部支部講演会、2016 年 2 月 29 日、岡崎カンファレンスセンター
- ⑤ 黒井邦巧、塚本卓、本田尚也、須藤雄気、古谷祐詞、時間分解赤外分光法を用いた好熱性ロドプシン TR の光反応解析、第 9 回分子科学討論会、2015 年 9 月 16 日～2016 年 9 月 19 日、東京工業大学

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒井 邦巧 (Kuroi Kunisato)

東北大学大学院・薬学研究科・助教

研究者番号：70757757

(3) 連携研究者

塚本 卓 (Takashi Tsukamoto)

北海道大学大学院・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：30744271