

# 막 단백질인 Proteorhodopsin과 *Anabaena* Sensory Rhodopsin의 다양한 측정 환경에 따른 광화학/생물리학적 특성

최아름<sup>1</sup> · 한송이<sup>1</sup> · 정영호<sup>2</sup> · 정광환<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>서강대학교 생명과학과, <sup>2</sup>한국기초과학지원연구원

## Photochemical/Biophysical Properties of Proteorhodopsin and *Anabaena* Sensory Rhodopsin in Various Physical Environments

Ahreum Choi<sup>1</sup>, SongI Han<sup>1</sup>, Young-Ho Chung<sup>2</sup>, and Kwang-Hwan Jung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science and Institute of Biological Interfaces, Sogang University, Seoul 121-742, Republic of Korea

<sup>2</sup>Division of Life Sciences, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333, Republic of Korea

(Received March 14, 2011 / Accepted March 28, 2011)

Rhodopsin is a membrane protein with seven transmembrane region which contains a retinal as its chromophore. Although there have been recently reports on various photo-biochemical features of rhodopsins by a wide range of purifying and measurement methods, there was no actual comparison related to the difference of biochemical characteristics according to their physical environment of rhodopsins. First, proteorhodopsin (PR) was found in marine proteobacteria whose function is known for pumping proton using light energy. Second one is *Anabaena* sensory rhodopsin (*Nostoc* sp.) PCC7120 (ASR) which belongs to eubacteria acts as sensory regulator since it is co-expressed with transducer 14 kDa in an operon. In this study, we applied two types of rhodopsins (PR and ASR) to various environmental conditions such as in *Escherichia coli* membranes, membrane in acrylamide gel, in DDM (n-dodecyl-β-D-maltopyranoside), OG (octyl-β-D-glucopyranoside), and reconstituted with DOPC (1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). According to the light-induced difference spectroscopy, rhodopsins in 0.02% DDM clearly showed photointermediates like M, and O states which respond to the different wavelengths, respectively and showed the best signal/noise ratio. The laser-induced difference spectra showed the fast formation and decay rate of photointermediates in the DDM solubilized samples than gel encapsulated rhodopsin. Each of rhodopsins seemed to be adapted to its surrounding environment.

**Keywords:** absorption spectrum, membrane protein, photocycle, photoreceptor

Chromophore로 레티날(vitamin A)을 사용하는 막 단백질인 로돕신은 세포막을 일곱 번 가로지르는 helix들이 레티날을 둘러 싸고 있는 포켓 모양을 지니는 특징이 있다(13, 14, 15, 18). 광감지(photo-receptor) 로돕신은 1999년 이전까지는 오직 고세균계의 haloarchaea와 고등 동물계(인간 포함)에서만 발견되었다(14). 하지만 1999년 이후 여러 생물계의 지놈 프로젝트를 통해, 거의 모든 병원성 곰팡이류(fungi)와 일반 세

균류(eubacteria), 원생생물류(protista)에서 나타남을 알게 되었다(3, 7, 18). 또한 바다 플랑크톤 중 실험실에서 키우기 힘든 해양 박테리아에서도 환경 지놈 연구(environmental genomics) 결과 아주 많은 종류의 로돕신들이 보고되었으며, 지금도 계속 발견되고 있다(1). 기존의 고세균(archaeal) 로돕신의 기능과 인간의 눈에 있는 로돕신은 많은 연구가 진행되어 다양한 특성을 알게 되었으며, 최근에는 X-ray crystal 구조도 알려져 모든 G-protein coupled receptor (GPCR)의 모델 시스템으로 연구가 진행되고 있다(19).

Type I에 속하는 미생물 로돕신은 그 기능에 따라서 크게

\* For correspondence. E-mail: kjung@sogang.ac.kr; Tel: +82-2-705-8795; Fax: +82-2-704-3601

이온 수송 펌프 역할을 하는 로돕신과 신호 전달에 사용되는 로돕신 두 가지로 나뉘어 진다. 첫 번째로 빛 에너지를 이용하는 수소이온 운반체이다. 빛 에너지는 ATP 생성, 편모운동, 그리고 다른 에너지를 요구되는 과정에서 양성자 전기화학적 위치를 만드는데 이용되고 있다. 이온수송펌프 역할을 하는 로돕신을 사용하여 에너지를 생산하는 기능은 haloarchaea (bacteriorhodopsin), group II 해양 archaea (euarchaeotic rhodopsin), 세균 [proteorhodopsin (PR) 그리고 xanthorhodopsin (XR)], 그리고 시아노박테리아 (*Gloeobacter* rhodopsin)에서 발견 되고 있다(11, 12). 두 번째로 신호 전달 리셉터 기능을 가지는 로돕신으로 halobacteria의 sensory rhodopsin I과 II, 미세조류에서 발견된 *Chlamydomonas*의 *Chlamydomonas* sensory rhodopsin A (CSRA)와 *Chlamydomonas* sensory rhodopsin B (CSRB), 시아노박테리아에서 분리한 *Anabaena* sensory rhodopsin (ASR) 등이 있다(8, 17, 20). 이들의 신호 전달 방법은 다양하며, 막 단백질의 전달자(transducer)를 이용하여 특이적 파장에 반응하는 주광성(phototaxis) 반응을 조절하기도 하고(2, 5, 17), 칼슘채널을 통한 막 전위차를 이용하여 세포의 움직임을 조절하거나, 특이하게 GPCR처럼 세포 내 수용성 전달자를 이용하여 신호를 전달하는 메커니즘을 이용하기도 한다(7). 또한 빛을 이용해 유전자 발현이나 단백질 기능을 조절하는 photoadaptation에 관여하는 로돕신도 있다. 예를 들면, *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC7120에 있는 로돕신은 광합성 하는 동안 chromatic 적응, 즉 phycobilin 합성을 위해서 특정한 파장의 빛에 반응하는 특징을 가지고 있다(7, 9, 16).

막 단백질을 정제하기란 어려운 일이다. 일반적으로 heterologous expression system을 이용하는데, 이때 사용하는 숙주 세포가 *Escherichia coli* 세포이다(10). 목적하는 단백질을 *E. coli*에 과량발현 한 다음, 막 분획 과정을 거치게 되면, 우리가 원하는 막 단백질을 얻을 수 있다. 하지만, 이는 너무 불투명하여 빛을 이용한 단백질의 성질을 측정하기가 쉽지 않다. 따라서 적은 양의 non-destructive detergent를 사용하여 정제한 다음, gel로 만들어 포토사이클 등을 측정할 수 있다(4, 16). 또한, detergent에 녹인 상태로 단백질을 정제할 수 있으며(6), 이를 다시 *E. coli* 지질에 재조립 할 수 있다(16).

본 연구에서는 수소 이온 펌프 역할 기능을 가지는 PR과 신호전달기능을 하는 ASR을 이용하여, 각 단백질을 다양한 측정 방법으로 환경조건에 따른 그 특성의 차이점을 알아 보려 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 플라스미드

클로닝을 위해서, 각 PR과 ASR 유전자를 pKJ900 vector에 *NdeI/NotI* 제한 효소를 이용했고 T4-DNA ligase를 이용해서 라이게이션(ligation)을 해서 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환(transformation)을 한 다음, 50  $\mu$ g/ml의 농도로 앰피실린이 녹아 있는 LB (Luria-Bertani)-broth에 접종을 하고, 35°C로

조정된 배양기에서 세포 배양했다.

단백질 발현을 위해서,  $\beta$ -carotene을 합성할 수 있는 pORANGE를 *E. coli* UT5600에 형질전환하여 *E. coli* strain  $\beta$ /UT를 구축했다.  $\beta$ -Carotene을 두 개의 레티날로 자를 수 있는 쥐의 dioxygenase ( $\beta$ -diox)는 pKJ900 vector에 *NcoI/PmeI*을 이용하여 클로닝했다.

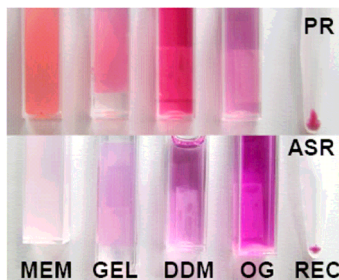
### 로돕신 발현 및 정제

각각의 PR과 ASR은 lacUV5 프로모터(promoter)에 의해서,  $\beta$ -diox는 pBAD 프로모터에 의해서 *E. coli* strain UT5600이나  $\beta$ /UT에서 조절·발현되었다. pKJ900 플라스미드가 형질 전환된 UT5600 cell은 1 mM IPTG로 유도(induction)되고, 5-10  $\mu$ M로 최종 농도가 되게끔 all-trans 레티날이 첨가되어서 6시간 동안 30°C에서 배양되었다. pKJ900과 pORANGE 플라스미드가 형질 전환된  $\beta$ /UT는 1 mM IPTG와 한 분자의  $\beta$ -카로틴을 두 분자의 레티날로 자르는 역할을 하는 15.15'-dioxygenase를 유도하기 위해서 0.2% (+)-L-arabinose가 첨가되었고, 24시간 동안 30°C에서 배양되었다. 초음파를 통해 세포를 분쇄시킨 다음 초고속 원심 분리를 통해 막 분획을 얻을 수 있었다. 막 분획에 최종농도를 1%가 되게끔 n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM)과 octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OG)를 첨가해서, 4°C에서 두 시간 이상 두어 막 단백질을 가용화시켰다. Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose (QIAGEN)를 첨가해서 4°C에서 4시간 배양해서 affinity chromatography를 통해 단백질을 분리하였다. 분리된 각 단백질은 0.02% DDM에 0.8% OG에 녹아 있었다.

### Membrane Gel 제조와 재조립

초음파 분쇄법을 이용해서 얻은 막 분획에 최종 농도가 0.04%가 되도록 DDM을 첨가한 다음 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 원심 분리를 통해 heavy membrane은 제거하고 초고속 원심 분리를 통해 light membrane을 얻었다. 물 1 ml을 넣어 pellet을 풀은 다음 15% polyacrylamide 용액을 첨가해서 membrane gel을 얻었다. 완성된 membrane gel은 탈이온수에 넣어서 4°C에서 O/N 동안 씻었다. 그리고 sonication buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 9.0)에 membrane gel을 넣어서 4°C에서 O/N 동안 배양시켰다.

정제된 로돕신의 최종농도가 OD=0.2가 되도록 buffer R1 (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1% DDM, pH 7.01)로 희석하여 5 ml을 만들었다. DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 20 mg/ml)을 30  $\mu$ l 넣어서 10-30분 동안 RT에서 배양시켰다. DOPC가 다 녹으면 Bio-Bead를 0.143 g 넣어서 4°C에서 12시간 이상 천천히 흔들어 재조립 시켰다. Bio-Bead를 걸러 낸 다음, 차가운 buffer R2 (200 mM NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7.05)를 5 ml 넣어서 씻어줬다. 6,000×g로 10분 동안 4°C에서 원심분리 한 다음, 상층액은 버리고 Buffer R2 1 ml에 녹인 후 Eppendorf-tube로 옮겼다. 14,000×g로 5분 동안 4°C에서 원심분리 한 다음, 상층액은 버리고 pellet을 녹여 측정에 사용했다.



**Fig. 1.** The color of PR and ASR in various physical environments. The order of the samples is MEM (*E. coli* membrane fraction), GEL (in polyacrylamide gel), DDM (solubilized in DDM), OG (solubilized in OG), and REC (reconstitution into DOPC).

### 흡수 분광학

PR과 ASR 측정샘플은 pH 9.0에 녹아 있는 상태로 Shimadzu UV-visible spectrophotometer (UV-2550)을 사용하여 흡수스펙트럼을 측정했다. 광-감응 차이스펙트럼은 SCINCO 및 RSM 1000 (Olis, USA)에 의해서 측정되었다. 화학 섬광은 Nd-YAG pulse laser (Continuum, MinilightII, 532 nm, 6 ns, 25 mJ)를 통해 이용되었다. Photointermediate의 생성 및 소

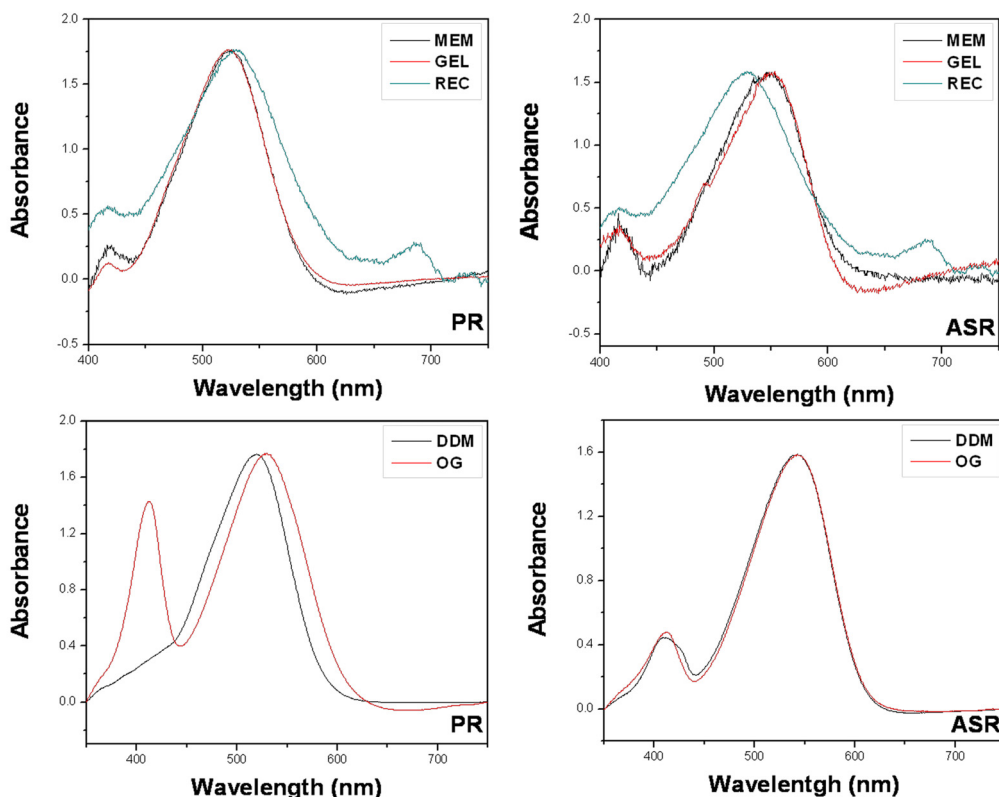
멸율은 16번씩 재어서 평균값으로 나타냈다.

## 결과

### 최대 흡수 파장

사용된 PR 샘플과 ASR 샘플은 각 환경 실험 조건을 위해 완성된 형태이다(Fig. 1). 막분획, gel, in DDM, in OG, 재조립(reconstitution) 순서로 나열되어 있다. 막분획은 로돕신 뿐만 아니라 *E. coli* 내의 막 단백질도 어느 정도 포함되어 있는 상태이기 때문에 색깔이 매우 탁한 것을 확인 할 수 있다. Membrane gel은 원심 분리를 통해 heavy membrane fraction은 제거하고, light-membrane fraction만 얻었기 때문에 membrane fraction 보다 훨씬 깨끗한 단백질을 얻을 수 있었다. Detergent 일종인 DDM에서는 단백질이 안정하게 존재하나, OG에서는 조금 불안정한 단백질이 응집 되어서 뿌연 것을 확인 할 수 있다. 다시 *E. coli* phospho-lipid (DOPC)로 재조립한 샘플은 정제한 로돕신을 이용했기 때문에 막 상태지만 좀 더 깨끗한 샘플을 얻을 수 있었다.

Figure 2는 pH 9에서의 각 PR 샘플 조건과 ASR 샘플 조건의 최대 흡수 파장을 측정한 것이다. PR의 경우 막(MEM) 조건과 젤(GEL) 조건의 경우 약 524 nm에서 최대 흡수 파장



**Fig. 2.** The  $\lambda_{\max}$  of PR and ASR according to the sample preparation states. PR solubilized in DDM is blue-shifted compared to PR which is embedded in *E. coli* membrane and trapped in polyacrylamide gel. Otherwise, PR solubilized in OG and reconstituted PR represents a red-shifted  $\lambda_{\max}$ . In the case of ASR, the  $\lambda_{\max}$  of DDM, OG solubilized ASR and reconstituted ASR are significantly blue-shifted than membrane, gel state ASR. The absorption maximum of each state is a little bit different to each other.

을 가지는 반면, DDM으로 녹인 조건에서는 약 4 nm가 blue shift 된 형태인 520 nm에서 최대 흡수 파장을 가지고, OG와 재조립(REC)된 샘플에서는 약 5 nm가 red shift 된 형태인 529 nm에서 최대 흡수 파장을 가진다. ASR의 경우 PR과 마찬가지로 MEM 조건과 GEL 조건의 경우 553 nm에서 최대 흡수 파장을 가진다. DDM과 OG에서는 약 10 nm가 blue shift 된 543 nm에서 최대 흡수 파장을 가진 반면, REC 조건에서는 약 24 nm가 blue shift 된 529 nm에서 최대 흡수 파장을 가진다(Table 1). 같은 단백질이지만 샘플 조건에 따라서 chromophore와 단백질간의 상호작용 정도가 달라져서 최대 흡수 파장에 차이가 있다는 것을 확인했다.

### 광감응 차흡수

Figure 3은 각 로돕신에 빛을 20초 쬘어 준 다음 로돕신의 파장(wavelength)별 흡수 스펙트럼(absorption spectrum)을 나타낸다. PR의 경우  $pK_a$ 가 7.5로 알려져 있다. 따라서, PR의 acceptor 기능을 하는 Asp97이 deprotonated form을 유지해서 PR이 좀 더 효율적인 M-, O-like intermediate을 형성 할 수 있도록 pH 9.0에서 광감응 차흡수를 측정했다. MEM과 GEL, 그리고 REC에서는 최대 흡수 파장인 약 530 nm에서 G (ground state)를 보였고, 약 410 nm에서 M-intermediate, 약 600 nm에서 O-intermediate을 보였다. 전체적으로  $\Delta OD=0.04$ 로 적은 차스펙트럼을 보이고 있다. 반면에, DDM과 OG에 녹아 있는 PR의 경우, 약 500 nm에서 G (ground state)를 보이며, 각 M-, O-intermediate은 약 400 nm, 약 600 nm에서 보이고 있다. MEM, GEL, REC 보다 약 100배인  $\Delta OD=0.3$ 의 차스펙트럼을 보인다.

ASR 역시 모든 샘플의 조건을 pH 9로 준비했다. ASR의 MEM인 경우, 발현 양이 너무 작고 너무 탁해서 차스펙트럼을 측정하지 못했다. MEM과 비슷한 환경의 조건인 GEL과 REC의 경우, 시그널이 매우 미미하지만, 약 550 nm에서 G (ground state)가 보이며, 약 400 nm에서 M-intermediate, 약 600 nm에서 O-intermediate를 보인다. ASR의 경우, 센서(sensory) 로돕신이기 때문에 수소 이온을 펌핑하는 로돕신보다 상대적으로 느린 포토사이클을 지닌다. 따라서, 빠른 포토사이클을 가지고 있는 PR에서는 측정하기 어려운 M-intermediate (약 390 nm)가 DDM과 OG에 녹아 있는 ASR에서는 아주 높게 형성되는 것을 확인할 수 있다. M-intermediate 형태의 로돕신이 많은 비율( $\Delta OD=0.04$ )로 축적되어 있기 때문

에, 상대적으로 O-intermediate (약 610 nm)는 적은  $\Delta OD$ 값인 0.01로 나타나는 것을 확인 할 수 있다.

PR과 ASR 모두 DDM에서 깨끗하고 명확한 광감응 차스펙트럼을 얻을 수 있는 것을 확인 할 수 있다.

### 레이저 감응 포토사이클 측정

각 PR과 ASR의 각 intermediate의 포토사이클 효율(rate)을 계산하기 위해서 레이저 감응 포토사이클을 측정하였다(Fig. 4). PR 막의 경우 ground formation의 half time이 39 ms로 O decay의 half time 36 ms와 비슷하게 나타났다(Table 1). PR gel의 경우, G formation time (49 ms)이 MEM보다 느려졌지만 O decay time (10 ms)는 MEM의 것보다 훨씬 빨라진 것을 확인 할 수 있다. PR DDM의 경우, 매우 빠른 M decay (1 ms)도 측정할 수 있었다. 반면, G formation (12 ms)과 O decay (23 ms)는 매우 빠른 것을 확인 할 수 있다. PR OG에서는 가장 느린 포토사이클 rate을 보이고 있다. PR REC는 MEM과 같은 패턴을 보인다.

ASR G (ground) formation half time은 GEL, DDM, OG, REC 모두 비슷한 약 40 ms이다. 그리고 MEM, DDM, OG에서 비슷한 속도(약 38 ms)의 M-intermediate을 측정할 수 있었는데, 이는 PR의 M-intermediate의 decay 속도 보다 약 40 배가 느리다는 것을 확인 할 수 있다. 반면, 모든 ASR 환경 조건을 pH 9.0에서 측정했기 때문에 O-intermediate은 관찰되지 않았다.

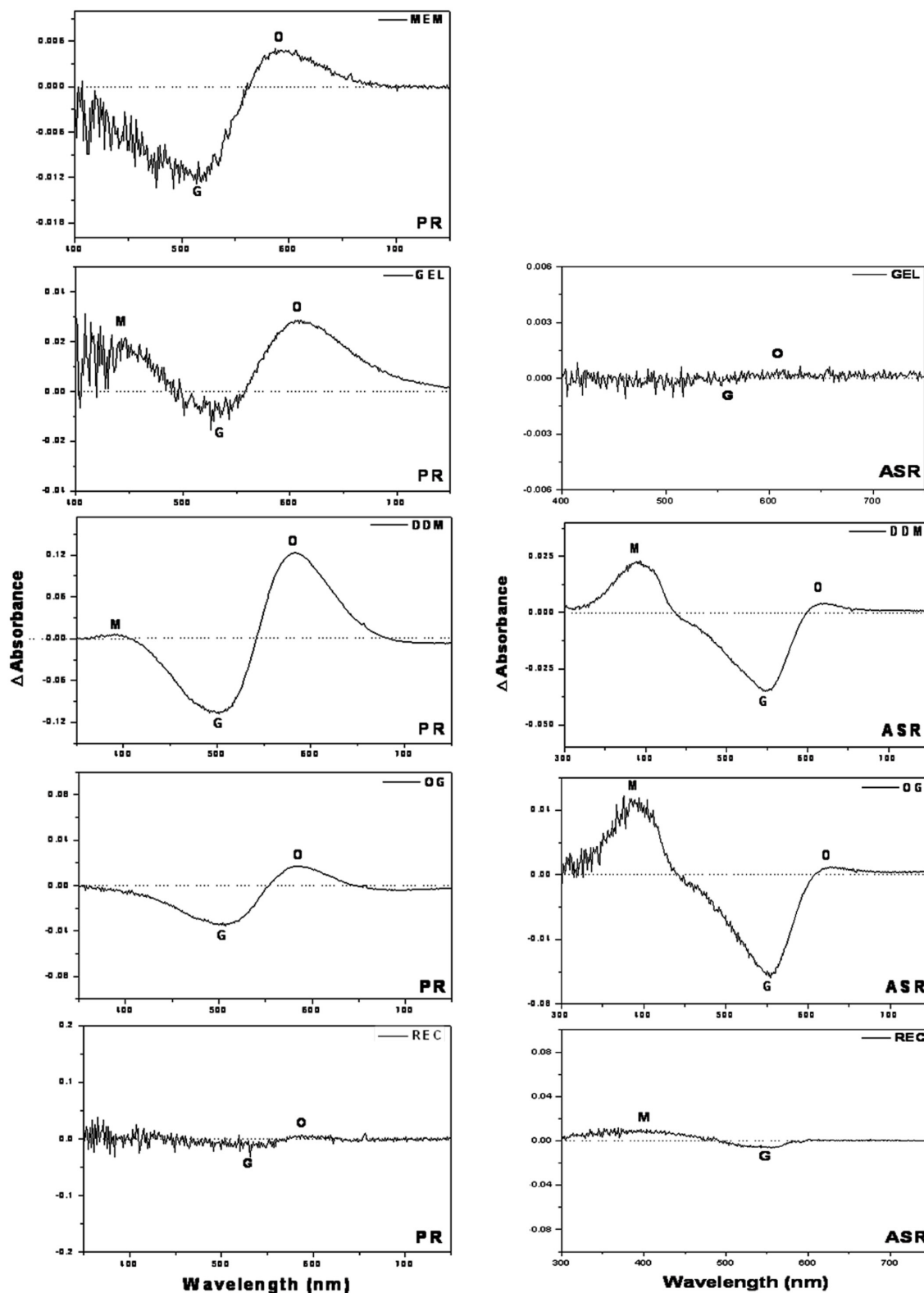
PR, ASR 모두 DDM에서 빠른 포토사이클 half time을 가지는 것을 확인 할 수 있다. PR GEL의 O decay는 2개의 시간으로 계산되었는데,  $T_1$ 값은 약 10 ms로 빠르지만,  $T_2$ 값은 40 ms로 길게 나왔기 때문에 DDM의 half time 보다는 느린 것을 알 수 있다. 반면 PR, ASR 모두 OG에서는 가장 느린 포토사이클 half time을 가진다.

### 고찰

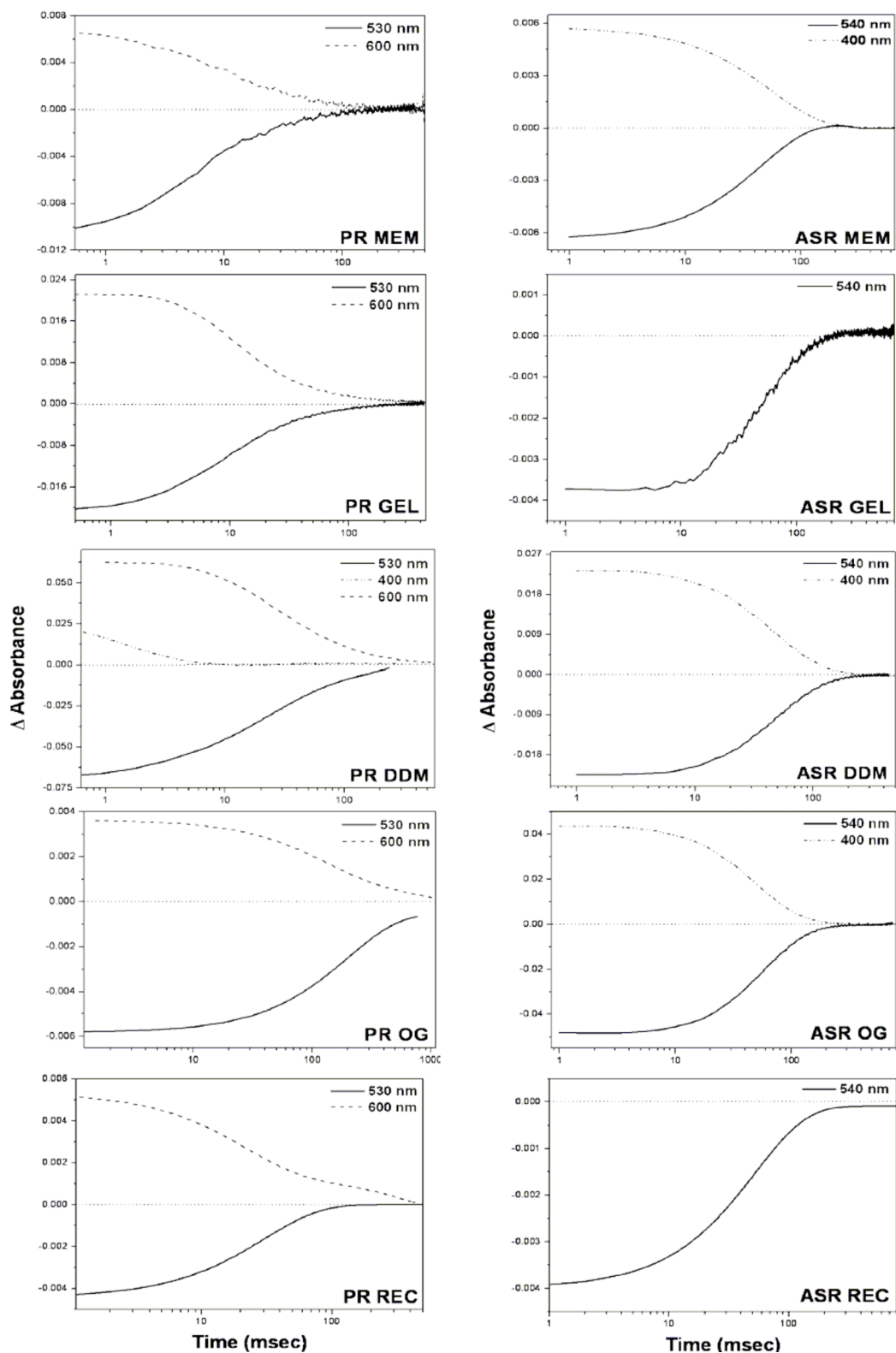
본 연구에서는 PR과 ASR이 과발현 된 막분획 상태, PR과 ASR이 과발현 된 light membrane을 polyacrylamide-gel로 고정시킨 상태, 각 로돕신을 정제하여 DDM에 녹인 상태, OG에 녹인 상태, 정제된 각 단백질을 *E. coli* lipid인 DOPC로 재조립한 상태로 준비해서 흡수 스펙트럼, 광감응 차스펙트럼, 레이저 감응 포토사이클을 측정했다.

**Table 1.** The absorption spectra and photocycle rates of PR and ASR in different sample conditions

	PR				ASR			
	$\lambda$ max	M <sub>400</sub> decay	G <sub>530</sub> formation	O <sub>600</sub> decay	$\lambda$ max	M <sub>400</sub> decay	G <sub>540</sub> formation	O <sub>600</sub> decay
MEM	525	ND	39.61	36.18	553	38.14	ND	ND
GEL	523	ND	49.1	10.37	553	ND	39.42	ND
DDM	520	1.25	12.43	23.36	543	33.18	36.25	ND
OG	528	ND	139.12	77.81	543	34.72	40.62	ND
REC	529	ND	21.12	14.77	529	ND	37.96	ND
	nm		msec		nm		msec	



**Fig. 3.** Intermediates formation by flash-induced photochemical analysis of PR and ASR. All PR samples represent ground state, O-intermediate at 530 nm, 600 nm respectively. A little amount of M-intermediates showed at 400 nm. A significantly distinct signal was detected in PR soaked in 0.02% DDM. In the case of ASR, light induced the formation of many M-intermediates instead of O-intermediates at pH 9.0. Likewise PR, the ASR in 0.02% DDM represents the difference of absorption.



**Fig. 4.** Laser flash-induced absorption changes of PR and ASR. After a brief illumination of 532 nm laser, transient light absorption changes caused by depletion or formation of photo intermediates were observed. Transient depletion species turned up at 530 nm and the trace of transient absorption increased at 600 nm in the case of PR. It is possible to observe O-intermediate in PR, otherwise, M-intermediates are abundant in ASR after energy transfer since the measurement was performed at pH 9.0.

두 로돕신 모두 MEM, GEL, REC 환경과 DDM, OG 환경에 따라 광화학/생물리학적 성질이 바뀌는 것을 확인 할 수 있었다. 최대 흡수 파장의 경우, 자연 상태와 가장 비슷한 조건인 MEM, GEL, REC 환경에서는 두 단백질 모두 좀 더 안정한 상태인 blue shift 형태로 존재 했고, detergent에 용해시킨 DDM, OG에서는 조금 불안정한 상태인 red shift 형태로 존재했다. 이는 로돕신이 detergent에 용해되어 micelle을 형성하는 것 보다는, 소수성 부분이 많으면서 이중 막 구조를 이루는 *E. coli* membrane에 끼워 있는 것이 막 단백질인 로돕신의 구조적 측면에서는 더 안정하다는 것을 보여 준다.

MEM, GEL, REC에서는 단백질이 구조적으로 안정할지는 모르지만, 광감응 스펙트럼 결과를 보면, 빛을 흡수한 로돕신이 구조변화를 하는 데는 *E. coli* 지질에 의해 방해 받는 것을 볼 수 있다. 따라서 DDM과 OG에 정제된 상태로 있는 로돕신이 빛을 효율적으로 흡수하고, chromophore인 레티날이 photo-isomerization 과정을 하면서, 레티날과 binding 되어 있는 단백질이 함께 움직이면서 구조변화를 좀 더 쉽게 하는 것이라 예상된다.

보통 레이저 감응 포토사이클을 측정할 때 로돕신을 gel에 고정시켜서 실험을 진행한다(16). 하지만, 로돕신이 깨끗하게 발현되지 않으면 gel을 만들어 포토사이클을 재면, 깨끗한 시그널을 얻기가 쉽지 않다. 반면에, DDM은 정제된 로돕신의 포토사이클을 측정하기 때문에 깨끗한 시그널이 나온다. PR DDM의 경우 gel보다 약 4배 빠른 포토사이클 시그널을 얻을 수 있었다. 만약 다른 종에서 얻은 수소 이온 로돕신을 정제해서 DDM 상태에서 포토사이클을 측정했지만, gel 상태에서는 얻을 수 없었다면, PR의 것과 비교해서 gel 상태의 포토사이클 속도를 예상할 수 있을 것이다.

1999년 지놈 프로젝트 이후, 많은 생물 종의 지놈 유전자 배열을 알 수 있다. 따라서, 여러 종 생물에서 로돕신 유전자를 분리 및 클로닝할 수 있다. 이를 통해 얻은 다양한 로돕신의 성질을 규명하는데 있어, 본 연구에서 얻은 결과가 좋은 표준 참고 자료 역할을 할 것이라 생각된다.

## 적요

Chromophore로 레티날(vitamin A)을 사용하는 막 단백질인 로돕신은 7개의 막 단백질로 이루어진다. 최근 광화학/생물리학적 측정 방법이 다양해지면서, 그에 따른 새로운 특성도 함께 다양하게 보고되고 있다. 하지만, 다양한 측정 환경에 따른 그 광화학/생물리학적 특성의 차이점에 대한 비교연구는 없는 상태이다. 첫째, 빛 에너지를 이용하여 수소 이온 펌프 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있는 proteorhodopsin (PR)은 해양 proteobacteria에서 발견 되었다. 둘째, 한 오페론에서 14 kDa 전달자와 같이 발현되면서 신호 전달 기능을 하는 *Anabaena* sensory rhodopsin (ASR)이 있다. 이에 본 연구에서는 이 두 미생물 로돕신을 이용하여 다양한 조건에서 그 차이를 살펴본다. 각 단백질이 막에 끼어 있는 상태(membrane state), polyacrylamide gel에 고정되어 있는 상태, nonionic detergent

일종인 DDM (n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside)과, OG (octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside)에 녹아 있는 상태, 좀더 자연상태와 유사한 환경을 위해 단백질만 깨끗하게 정제한 다음 다시 *Escherichia coli*의 지질인 DOPC (1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)에 재조립한 상태, 이렇게 5가지 조건에서 각각의 광화학/생물리학적 특징을 흡수스펙트럼(absorption spectrum), 빛-어둠 차이 흡수스펙트럼(light-induced difference spectrum), 포토사이클(photocycle)을 측정하였다. 그 결과 DDM에 녹아 있는 PR과 ASR에서 각 다른 파장에서 M과 O state와 같은 선명한 photointermediate를 가지고, 가장 signal/noise 비율이 좋았다. 본 연구를 통해 막단백질의 다양한 측정 환경에 대한 그 특성의 차이점을 살펴봄으로써 앞으로 다양한 종류의 로돕신 연구에 기초 기반이 될 것으로 사료된다.

## 감사의 말

본 연구는 교육과학기술부(2008-0060997, 331-2008-1-C00242, 2010-616-C00029)와 국토해양부 소관 연구개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. Beja, O., E.N. Spudich, J.L. Spudich, M. Leclerc, and E.F. DeLong. 2001. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 411, 786-789.
2. Bogomolni, R.A. and J.L. Spudich. 1982. Identification of a third rhodopsin-like pigment in photoactive *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4308-4312.
3. Brown, L.S. 2004. Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 555-565.
4. Choi, A.R., S.Y. Kim, S.R. Yoon, K. Bae, and K.H. Jung. 2007. Substitution of Pro206 and Ser86 residues in the retinal binding pocket of *Anabaena* sensory rhodopsin is not sufficient for proton pumping function. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 138-145.
5. Choi, A.R., S.Y. Kim, S.R. Yoon, and K.H. Jung. 2005. Glu-56 in HtrI is critical for phototaxis signaling in *Halobacterium salinarum*. *Integrative Biosciences* 9, 139-144.
6. Jung, J.Y., A.R. Choi, Y.K. Lee, H.K. Lee, and K.H. Jung. 2008. Spectroscopic and photochemical analysis of proteorhodopsin variants from the surface of the Arctic ocean. *FEBS* 582, 1679-1684.
7. Jung, K.H. 2007. The distinct signaling mechanism of microbial sensory rhodopsins in Archaea, Eubacteria and Eukarya. *Photochem. Photobiol.* 83, 63-69.
8. Jung, K.H., V.D. Trivedi, and J.L. Spudich. 2003. Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria. *Mol. Microbiol.* 47, 1513-1522.
9. Kawanabe, A., Y. Furutani, K.H. Jung, and H. Kandori. 2007. Photochromism of *Anabaena* sensory rhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8644-8649.
10. Kim, S.Y., S.A. Waschuk, L.S. Brown, and K.H. Jung. 2008. Screening and characterization of proteorhodopsin color-tuning mutations in *Escherichia coli* with endogenous retinal synthesis. *BBA*. 1777, 504-513.

11. Matsuno-Yagi, A. and Y. Mukohata. 1977. Two possible roles of bacteriorhodopsin: a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 78, 237-243.
12. Mylene, M.R.M., A.R. Choi, L. Shi, A.G. Bezerra, Jr., K.H. Jung, and L.S. Brown. 2009. The photocycle and proton translocation pathway in a cyanobacterial ion-pumping rhodopsin. *Biophys. J.* 96, 1471-1481.
13. Oesterhelt, D. and W. Stoechenius. 1973. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2853-2857.
14. Ovichinnilov, YuA. 1982. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relations. *FEBS Lett.* 148, 179-191.
15. Sehobert, B. and J.K. Lanyi. 1982. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* 257, 10306-10313.
16. Shi, L., S.R. Yoon, A.G. Bezerra Jr., K.H. Jung, and L.S. Brown. 2006. Cytoplasmic shuttling of protons in anabaena sensory rhodopsin: implications for signaling mechanism. *J. Mol. Biol.* 358, 686-700.
17. Spudich, E.N. and J.L. Spudich. 1982. Control of transmembrane ion fluxes to select halorhodopsin-deficient and other energy-transduction mutants of *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4308-4312.
18. Spudich, J.L. and K.H. Jung. 2005. Microbial rhodopsin: phylogenetic and functional diversity, Handbook of Photosensory Receptros, pp. 1-24. In W.R. Briggs and J.L. Spudich (eds.), Wiley-VCH.
19. Spudich, J.L., C.S. Yang, K.H. Jung, and E.N. Spudich. 2000. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 365-392.
20. Takahashi, T., Y. Mochizuki, N. Kamo, and Y. Kobatake. 1985. Evidence that the long-lifetime photointermediate of s-rhodopsin is a receptor for negative phototaxis in *Halobacterium halobium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 99-105.