

## 硝酸イオン結合型ハロロドプシンによるアニオン輸送機構の解析

(名工大院工<sup>1</sup>・金沢大理工<sup>2</sup>・北大先端生命<sup>3</sup>) ○中島啓介<sup>1</sup>、柴田幹大<sup>1,2</sup>、出村 誠<sup>3</sup>、神取秀樹<sup>1</sup>

**【序】** 古細菌である高度好塩好アルカリ性菌 *Natronomonas pharaonis* の細胞膜には、ファラオニスハロロドプシン (*pharaonis* Halorhodopsin: *pHR*) という光駆動クロライドポンプ蛋白質が存在する。有名なバクテリオロドプシンと同様、世界最小の分子ポンプである *pHR* は、クロライドだけでなく他のハライドや硝酸イオンを能動輸送することが知られている。我々は赤外分光法を用いて輸送メカニズムの解明を目指しているが、単原子イオンであるハライドでは得られる振動情報が周辺のアミノ酸や水分子に限られる。

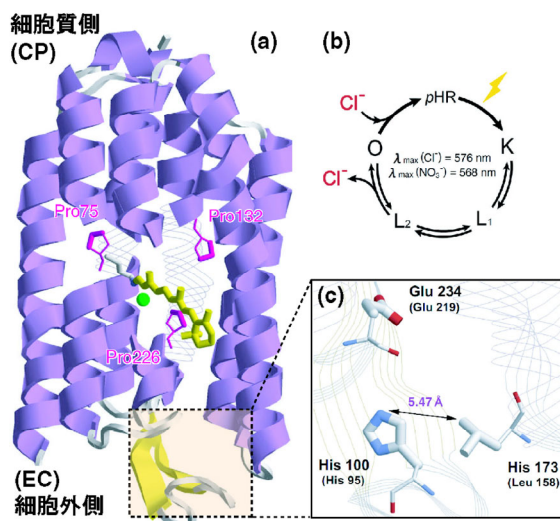


図1 (a)sHR (*salinarum* Halorhodopsin) の結晶構造 (66% の相同性を持つ *pHR* の構造は未解明) (b)*pHR* の photocycle (c)細胞外側における His, Glu の配置。括弧内は sHR に対応

*pHR* 試料を *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DM) により可溶化し、Ni-NTA アガロースカラムで精製した。その後、L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC) リポソームに再構成し (モル比 *pHR*:PC=1:50)、buffer (pH 7.0, 10 mM 硝酸ナトリウムを含む) に懸濁した。*pHR* 懸濁液を BaF<sub>2</sub> 製赤外窓板上に 60  $\mu$  L 滴下し、乾燥後、水和させたフィルム試料を実験に用いた。各中間体に応じて温度と照射する光波長を設定し、反応中間体と基底状態との赤外差スペクトルを得た(波数分解能: 2 cm<sup>-1</sup>, 256 scan の測定を 6-13 回、平均した)。

**【結果と考察】** これまで当研究室では、重水中における水分子の O-D 伸縮振動、レチナールシッフ塩基の N-D 伸縮振動のハライド依存性から、クロライドはシッフ塩基との直接的な水素結合相互作用により駆動されるのではなく、脱水和などの疎水性上昇により駆動されるという初期輸送モデルを提唱している<sup>(1)</sup>。硝酸イオン結合型においてもクロライド結合型と同様、レチナールシッフ塩基は異性化後の K 中間体で水素結合を強めることがわかったが、*pHR*(NO<sub>3</sub>) の N-O 伸縮振動の低波数シフト (図 2a) から硝酸イオンが水素結合アクセプターとして相互作用すると考えられる。L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 中間体は細胞質側への方向性を決定する重要な中間体であるが、予想に反して硝酸の N-O 伸縮振動は基底状態と全く変わらなかった(図 2b, c)。

そこで本研究では、輸送されるアニオン自身の環境変化をモニターするため、硝酸イオン結合型の実験を行った。硝酸イオンに由来する振動は <sup>15</sup>N 標識硝酸を用いることにより帰属が可能である。また我々は、クロライドイオン結合型では測定が困難な O 中間体が、硝酸イオン結合型では 240 K 以上で十分に蓄積することを見出した。この特性を利用して、細胞質側へのアニオン放出後の細胞外側部からのアニオンの取り込みに関する解析も行った。

**【実験方法】** 野生型 *pHR* 及び部位特異的変異体、それぞれの塩基配列を含むプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) に導入し、1 mM IPTG により発現誘導した。次に、膜画分に含まれる

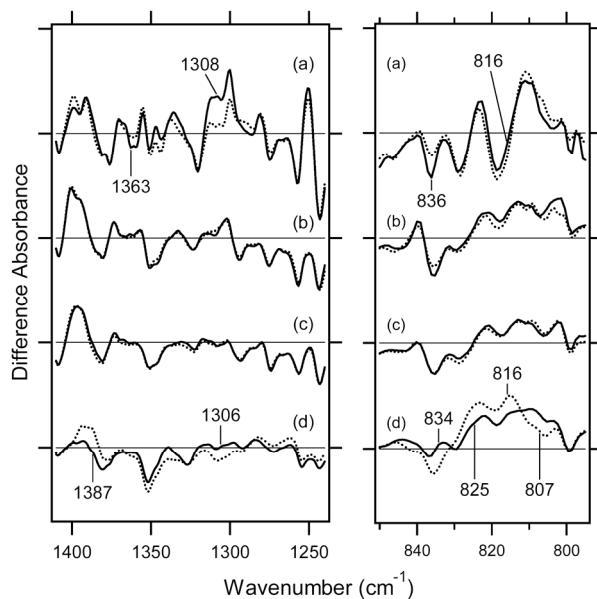


図 2  $pHR(NO_3^-)$  における各中間体との差スペクトルに含まれる硝酸の振動バンド

正が中間体、負が基底状態の信号を示す。(a) K 中間体 (77 K) (b)  $L_1$  中間体 (170 K) (c)  $L_2$  中間体 (230 K) (d) O 中間体 (273 K)。実線は  $^{14}NO_3^-$ 、点線は  $^{15}NO_3^-$  結合型。y 軸の一目盛は吸光度 0.0015 (左図)、0.00057 (右図) に対応する。

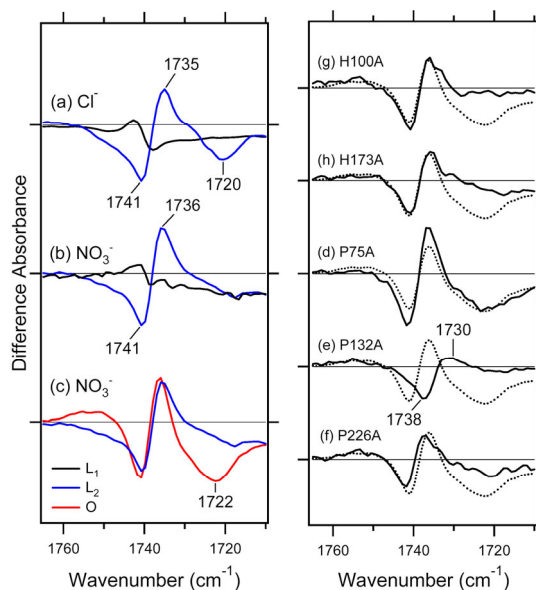


図 3  $pHR$  の赤外差スペクトルに含まれるプロトン化カルボン酸の C=O 伸縮振動領域

(a) 黒線:  $L_1/pHR(Cl^-)$ 、青線:  $L_2/pHR(Cl^-)$  (b) 黒線:  $L_1/pHR(NO_3^-)$ 、青線:  $L_2/pHR(NO_3^-)$  (c) 青線:  $L_2/pHR(NO_3^-)$ 、赤線:  $O/pHR(NO_3^-)$  (d)~(h) 各変異体の硝酸結合型における O 中間体との差スペクトル (点線は野生型)。y 軸の一目盛は吸光度 0.0003 に対応する。

硝酸イオンは基底状態と同様の比較的、水素結合の弱い環境に存在するという以上の情報を得ることができなかった一方、アニオンが細胞質側へ放出された後の O 中間体では K 中間体と同様、N-O 伸縮振動の低波数シフトが観測された (図 2d)。

我々は次に硝酸結合型で O 中間体が安定化されるという性質を利用し、光反応サイクルにおける後期中間体の解析を行った。クロライドイオン結合型では  $L_2$  中間体で観測される Glu234 の脱プロトン化 ( $1720\text{ cm}^{-1}$ ; 図 3a) は、クロライドの一方方向への輸送に関わっていると考えられる<sup>(2)</sup>。興味深いことに、Glu234 の脱プロトン化は硝酸イオン結合型では  $L_2$  中間体ではなく、O 中間体で観測された (図 3b, c)。この結果から、クロライドは  $L_2$  中間体において細胞質側に移動する一方、硝酸結合型の  $L_2$  中間体では移動が起こっていない可能性がある。Glu234 の脱プロトン化の信号は、BC-loop に存在する His100 やその近傍の His173 (図 1c) の変異体で消失しており (図 3d, e)、2 つの His と Glu234 との静電相互作用が示唆される。一方、3 つのプロリンのうち P132A 変異体 (C-helix) においても Glu234 の脱プロトン化が消失した (図 3g)。

以上の結果をもとに、ハロロドプシンのアニオン輸送メカニズムについて議論したい。

## 【参考文献】

- (1) M. Shibata et al. (2005) *Biochemistry* **44**, 12279-12286
- (2) M. Shibata et al. (2006) *Chem. Phys. Lett.* **432**, 545-547