

青色受容型アーキロドプシン 3 変異体の イオン輸送特性と光化学反応

(名古屋工業大学¹, JST さきがけ², 名古屋大学³, 東邦大学⁴, 京都大学⁵, JST CREST⁶, 分子科学研究所⁷) ○井上圭一^{1,2}, 谷ヶ崎仁³, 下野和実⁴, 宮内正二⁴, 林重彦⁵, 神取秀樹¹, 須藤雄気^{3,6,7}

Ion Transport Function and Photochemical Reaction of Blue-Absorbing Archearhodopsin 3

(Nagoya Institute of Technology¹, JST PREST², Nagoya Univ.³, Toho Univ.⁴, Kyoto Univ.⁵, JST CREST⁶, Institute for Molecular Science⁷) ○Keiichi Inoue^{1,2}, Jin Yagasaki³, Kazumi Shimono⁴, Seiji Miyauchi⁴, Shigehiko Hayashi⁵, Hideki Kandori¹, Yuki Sudo^{3,6,7}

【序】アーキロドプシン 3 (AR3) は古細菌 *Halorubrum sodomense* の持つ、光駆動型外向きプロトン (H⁺) ポンプであり、光による H⁺濃度勾配は膜電位の産生や ATP の合成に利用される。AR3 は 7 回膜貫通型の構造を持ち、その中央に発色団として all-trans 型レチナールを結合する。この光でイオンの濃度勾配を作るメカニズムは古くから分子科学的な研究対象となってきた。最近では、AR3 やチャネルロドプシンなどの微生物型ロドプシンを動物細胞に異種発現させ、光による細胞の過分極・脱分極を介して、神経活動（行動）を制御する光操作ツールとしての利用が盛んである。この分野はオプトジェネティクスと呼ばれ、AR3 は緑色光による神経抑制分子として、広く利用されている。

このような利用の際には、幅広い励起波長でのタンパク質の活性化が求められており、AR3 においても吸収波長の制御が必要となっている。そしてこれまでに、我々は分子科学的な知見を拠り所に、吸収波長を 50 nm 短波長シフトさせた変異体を作製し、青色光での神経抑制を可能とした¹。このとき量子化学計算により、発色団レチナールのβ-イオノン環と周辺残基との立体反発により、6-s 結合が回転し、π電子の共役系が短くなることが、Blue-shift の最も大きな要因であることが明らかとなった。その後さらなる量子化学計算により、4 本目のヘリックス（ヘリックス D）に存在する Gly 132 を変異することで、より大きな 6-s 結合の回転とそれに伴う短波長シフトが予想された（図 1）ことから、今回実際に変異体を作製し、その性質を研究した。

【実験】AR3 の野生型および変異体は全て大腸菌を用いて発現した。精製のため C 末に His タグを導入し、必要に応じて Ni-NTA カラムで精製した。AR3 の野生型および変異体のプロトン輸送活性は pH メーターを用いて、光照射に伴う pH の変化をみることで評価した。また光反応フォトサイクルは Linear Detector Array を用いた過渡吸収測定により決定し、励起光にはナノ秒 Nd³⁺:YAG レーザーの三倍波を OPO を通して可視光に波長変換したものをを用いた。

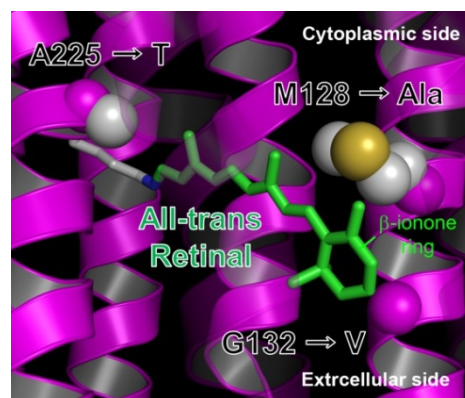


図 1. 今回変異を導入したレチナール周辺のアミノ酸残基（構造はアーキロドプシン 2 のもの (PDB code: 2EI4) を使用)

【結果と考察】図 2(A)に AR3 の野生型と最も短波長シフトした変異体 (M128A/G132V/A225T) の吸収スペクトルを示す。これを見ると野生型のものと比べ M128A/G132V/A225T の極大吸収波長は 100 nm 近く短波長シフトしており、予想通り、これまでのもの¹よりも 50 nm 近く吸収を短波長化することに成功した。これにより天然にも人工的にもない、最短波長に吸収を持つ微生物型ロドプシンの作成に成功したことになる。次に H⁺輸送活性を調べた (図 2(B))。野生型 AR3 については光照射に伴い、外液の pH の減少が観測され、外向き H⁺ポンプ活性が確認された。一方、興味深いことに M128A/G132V/A225T 変異体 (以下三重変異体) は、光照射により、野生型とは逆に pH の上昇が見られ、さらに光照射を止めると更なる pH の上昇が約 1 分間にわたってみられた。この結果は三重変異体については吸収変化と共にその機能が野生型と大きく変わっていることを示している。ここに H⁺の膜透過性を上昇させる carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) を加えたところ、外液の pH 変化が完全に消失したことから、この三重変異体は内向き H⁺透過活性を持つものと考えられる。この pH 変化は細胞外が細胞内に比べて酸性条件での測定であり、輸送が能動的か受動的かを確定させることが出来ない。そこで、さらに三重変異体について電気生理学的な実験を行った。その結果、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた三重変異体は、輸送方向が逆転するリバースポテンシャルがほぼゼロであることがわかった。つまり、これらの結果から、三重変異体は光ゲート型のチャネルとして働いていることが示唆された。

最後にこの変異体のフォトサイクルを調べるため、大腸菌膜中での過渡吸収測定を行ったところ図 3(A)の様な過渡吸収スペクトルが得られた。これを見ると変異体は野生型 ($\tau = 46$ ms) よりもかなり遅い反応サイクル ($\tau = 1.45$ s) を示した。また強い連続光を照射した実験では、二段階の光励起過程による

(A) と思われる、さらなる長寿命中間体が生成し、この過程が光 OFF 時のゆっくりとした pH の上昇と関与していると思われる。講演ではさらに Single および Double 変異体の結果とも合わせて、青色受容型 AR3 のイオン輸送機構について詳細な議論を行う。

(B)

【参考文献】 1. Sudo Y, et al. (2013) *J Biol Chem.* **288**, 20624-20632.

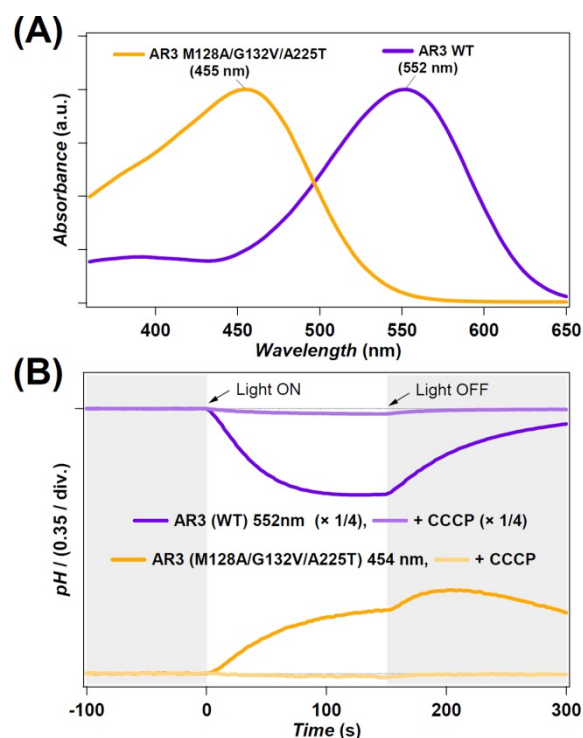


図 2. (A) 野生型 AR3 と M128A/G132V/A225T 変異体の吸収スペクトルおよび (B) H⁺輸送活性

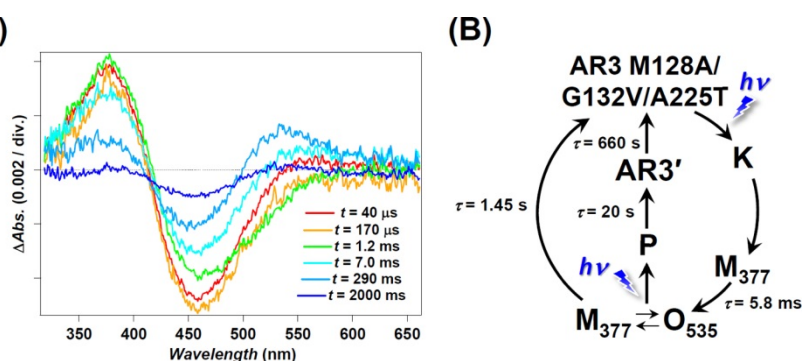


図 3. (A) AR3 M128A/G132V/A225T 変異体の過渡吸収スペクトルと (B) 光反応サイクル