

光駆動ナトリウムポンプロドプシンの Na⁺輸送ダイナミクスの研究

(名古屋工業大学¹, JST さきがけ²) ○井上圭一^{1,2}, 吉住 玲¹, 加藤善隆¹, 神取秀樹¹

Dynamics of Na⁺ Transport of Light-driven Sodium Pump Rhodopsin

(Nagoya Institute of Technology¹, JST PREST²) ○Keiichi Inoue^{1,2}, Rei Abe-Yoshizumi¹,

Yoshitaka Kato¹, Hideki Kandori¹

【序】 ナトリウムポンプロドプシン (NaR) は光のエネルギーを使って、細胞内側から外側へナトリウムイオン (Na⁺) を濃度勾配に逆らって能動輸送する、光駆動型のナトリウムポンプである[1]。このとき光を吸収するのが発色団である *all-trans* レチナールであり、光吸収に伴って *13-cis* 型へと異性化し Na⁺輸送に必要なタンパク質の構造変化を誘起する。我々は昨年東京湾に棲息する海洋性細菌 *Krokinobacter eikastus* より、最初の NaR である *Krokinobacter rhodopsin 2* (KR2) を発見し、その機能や光反応サイクルについて研究を行ってきた[1, 2]。その中で KR2 は生理学的な条件に近い NaCl 溶液中では Na⁺ を輸送するが、溶媒中の陽イオンを Li⁺ に置き換えると、Li⁺ も輸送する。しかしそれに対してサイズの大きい陽イオンである K⁺, Rb⁺, Cs⁺ が溶媒中に存在する場合には、それらのイオンの代わりに H⁺ が輸送される。このことは KR2 は周りの環境によってナトリウムポンプおよびプロトンポンプの2つの機能を持つ、ハイブリッド型のポンプであることを意味している。

一方、過去の研究例の多い光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (BR) などと比べて、KR2 は以下のような特徴的な配列を持つ。BR の場合、N 末端側から3つめのヘリックスにあたる Helix C には2つの酸性アミノ酸 (Asp85, Asp96) が存在し、プロトンポンプ機能において非常に重要であることが知られている。しかし KR2 ではこれらがアスパラギン (Asn112) およびグルタミン (Gln123) に置き換わっており、また BR で Asp85 と水素結合を形成する Thr89 の位置に新たなアスパラギン酸が存在する (Asp116) (図1)。このことから KR2 は既知のロドプシンとは完全に異なった配列を持ち、それらが Na⁺ の輸送に重要だと予想される。実際に Asp116 はレチナールの根元にあるプロトン化シッフ塩基から H⁺ を受け取るプロトンアクセプターとして働くことが示され、その過程が Na⁺ 輸送に極めて重要なことが明らかとなっている[1]。そこで本研究ではそれ以外の Asn112 や Gln123 について変異体を作製し、機能測定や光反応サイクルの測定により、Na⁺ の輸送におけるこれらの残基の役割の解明を試みた。

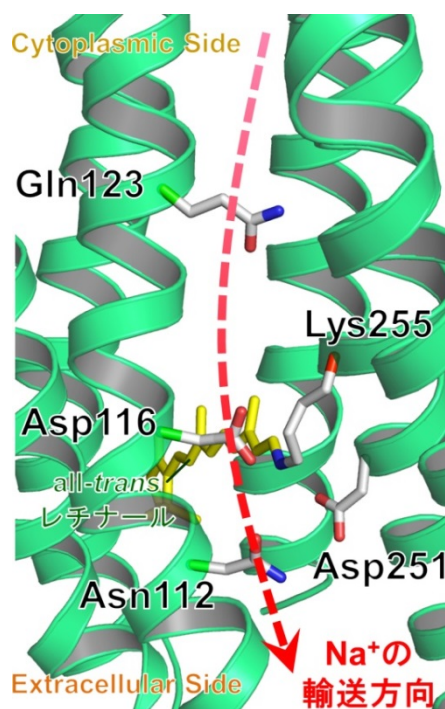


図1. NaRで保存されているレチナール周辺のアミノ酸残基の予想される位置。(構造は Xanthorhodopsin のもの (PDB code: 3DDL) を使用)

【実験】KR2 の変異体は大量発現用に形質転換した大腸菌・C41(DE3)株を用いて発現した。また精製のため C 末端側に His タグを導入し Co²⁺-NTA カラムで精製した。また光反応サイクルは CCD Linear Detector Array を用いたレーザーフラッシュフォトリシスシステムを用いて、過渡吸収スペクトルの時間変化を見ることで調べた。励起光にはナノ秒 Nd³⁺:YAG レーザーの二倍波 ($\lambda = 532$ nm, 1 mJ/pulse) を用いた。

【結果と考察】今回 Asn112 と Gln123 をそれぞれ Alanine に変異させた KR2 N112A および Q123A 変異体について研究を行った。これまでに Q123A については Na⁺ 輸送活性が野生型の 1/3 程度になるのに対し、N112A では Na⁺ の輸送能が完全に消失する一方で NaCl 溶媒中でも H⁺ を輸送するようになることが分かっている[1]。これらの輸送機能の違いがどのように生じるのか、光反応サイクルを野生型のものと比較することで、その理由の解明を試みた。

まず野生型 KR2 の光反応サイクルは図 2 のように 3 つの中間体を経由する形で表される。このうち L \rightleftharpoons M から O 中間体の過程において Na⁺ が細胞質側から KR2 の中に取り込まれる。これに対し Q123A の光反応サイクルを過渡吸収変化から調べたところ、全体のサイクルの戻り速度が野生型の 3 倍程度遅くなっていることを示す結果が得られた (図 3A)。ここから Q123A の Na⁺ 輸送活性が減少した理由は Turn over 速度の低下が主要な要因であることが分かる。一方でこの残基は Na⁺ の取り込み経路上に存在すると予想されるが、その過程に対応する L \rightleftharpoons M \rightarrow O の速度が野生型の 5 倍程度遅くなっており、実際に効率的な Na⁺ の取り込みに Gln123 が関与していることが分かる。次に N112A の過渡吸収変化をみると、野生型と比べて 100 倍以上の L \rightleftharpoons M 中間体の長寿命化がみられ、一方で O 中間体の蓄積がなくなっていた (図 3B)。これは野生型の KCl 溶液中での H⁺ 輸送に対応する光反応と類似している。従って Asn112 は Na⁺ と H⁺ のうち特に前者の輸送に重要な役割を果たしており、この残基を変異するとレチナル近傍への過渡的な Na⁺ の結合が阻害され、O 中間体が消失し、代わりに NaCl 溶液中でも H⁺ が輸送されるようになったと考えられる。

講演ではさらに Asn112、Gln123 以外の残基の変異体についても結果を報告し、NaR の Na⁺ 輸送におけるより詳細なメカニズムについて議論する。

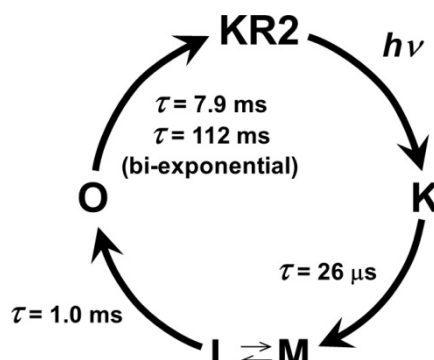


図 2. 野生型 KR2 光反応サイクル

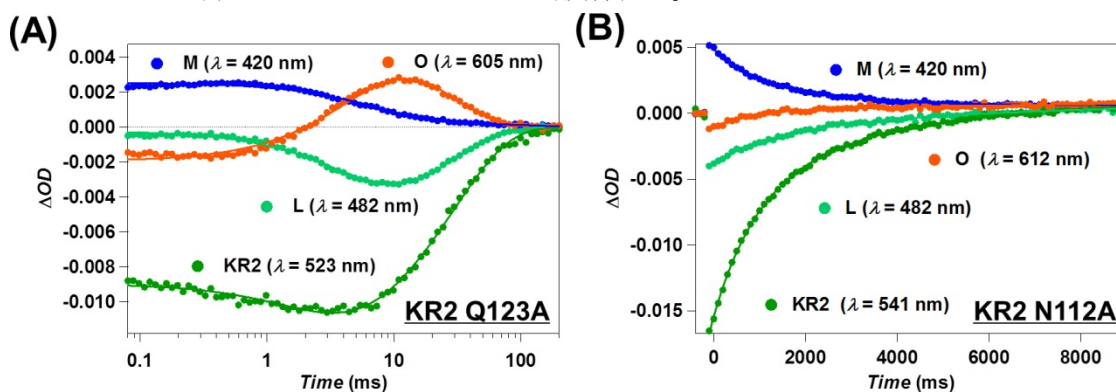


図 3. 野生型 KR2 光反応サイクル

- 【参考文献】 1. Inoue K, et al. (2013) *Nat. Commun.* **4**, 1678.
2. Ono H, et al. (2014) *J. Phys. Chem. B* **118**, 4784-4792.