

3P090

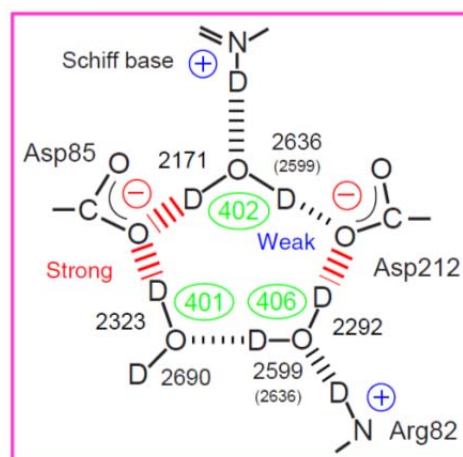
光駆動ナトリウムポンプロドプシンの低温赤外分光

(名古屋工業大学¹, JST さきがけ²) 大野 光¹, Faisal H. M. Koua¹, 吉住 玲¹, 井上圭一^{1,2},
○神取秀樹¹

Low-temperature FTIR spectroscopy of a light-driven sodium ion pumping rhodopsin

(Nagoya Institute of Technology¹, JST PREST²) Hikaru Ono¹, Faisal H. M. Koua¹, Rei Abe-Yoshizumi¹,
Keiichi Inoue^{1,2}, ○Hideki Kandori¹

【序】光駆動イオンポンプとして機能する微生物型ロドプシンの内部には、正負 2 個の電荷からなる電気四重極が存在し、イオンのベクトル輸送に関わることが知られている [1, 2]。図にはプロトンポンプとして有名なバクテリオロドプシン (BR) の例を重水中での水素結合構造 [3] とともに示した (数字は水分子の伸縮振動)。光を吸収するレチナールは Schiff 塩基がプロトン化しているため正電荷を持っており、Arg82 と合わせた 2 個の正電荷が 2 個のカルボン酸 (Asp85, Asp212) の負電荷と 3 個の水分子によって安定化されている。レチナールが光を吸収し異性化反応を起こすと、マイクロ秒の時間領域で Asp85 へプロトンが移動し、外向き (図で下向き) のプロトンポンプが実現する。内向きクロライドポンプは Asp85 が中性化された部位にクロライドが結合して電気四重極を構成し、光異性化後に図で上向きにクロライドが移動する結果として実現する。このように正電荷をもったレチナール発色団との相互作用変化がプロトンやクロライドのポンプを担うため、発色団近傍に結合できないナトリウムのポンプは存在しない、というのが長い間の分野の常識であった。



ところが光駆動ナトリウムポンプは存在した。海洋性細菌 *Krokinobacter eikastus* に含まれる *Krokinobacter rhodopsin 2* (KR2) が外向きにナトリウムイオンを輸送することを我々は昨年の 4 月に報告したのであるが、その存在に加えて 2 つの意外な事実が明らかになった [4]。

(1) ナトリウムイオンの結合部位は出口 (細胞外) 側表面にあるが、アミノ酸変異により結合できなくさせてもナトリウムイオンをポンプできる。

(2) ナトリウムイオン以外にリチウムイオンもポンプできるが、陽イオンがカリウム以上の大きさになるとプロトンポンプになる。

KR2 では BR の Asp85 が中性化されている (Asn112) 一方、レチナール近傍の Thr89 の位置に新たなアスパラギン酸が存在する (Asp116)。新たな配置をもった電気四重極がどのようなはたらきでレチナール近傍には結合しないナトリウムイオンをポンプできるのか、興味は尽きない。本研究では、低温赤外分光解析を KR2 に対して試みることで、新規ロドプシンとしてどのような構造の特徴を持つのか検討した。

【実験】KR2 試料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 C 末端側に His タグを導入し Co^{2+} -NTA カラムで精製した。ナトリウムポンプとしてはたらく NaCl、プロトンポンプとしてはたらく KCl の存在下で水和フィルムを作製、レチナール近傍の構造変化が捉えられる 77 K で光誘起赤外差スペクトルを測定し、それぞれのイオンポンプとして機能する際の構造及び初期構造変化を比較した。

【結果と考察】実験の結果、全トランスから 13 シス型への異性化反応が観測され、長波長産物 (K 中間体) が生成した [5]。さらに異性化反応に伴うレチナール分子の捻れや水分子を含む水素結合構造の変化が観測され、KR2 も他の微生物型ロドプシンと同様の光誘起初期反応を示すことが明らかになった。K 中間体に観測されたレチナールの水素面外変角振動はそのほとんどが重水素効果を示したが、このことは H/D 置換するシッフ塩基近傍の振動であることを示している。これまでの研究により、異性化が起こるとポンプはシッフ塩基近傍に、センサーはより広がった部位に捻れが起こることがわかっているが [6]、ナトリウムポンプもポンプとしての性質を備えていることがわかった。

一方、驚いたことに、NaCl 中と KCl 中で全く同一のスペクトルが得られた [5]。室温での過渡吸収実験から、水和フィルムの光反応サイクルは NaCl 中と KCl 中で異なっていたので、初期反応における構造変化が同一であり、K 中間体の緩和以降に異なる構造変化が起こると解釈できる。ナトリウムの結合部位は出口側表面に存在するので妥当な結果に思えるかもしれないが、BR において 77 K でレチナールから 11 Å 以上離れた部位の構造変化が観測されており [7]、機能の異なる二状態が同一の初期反応を示すという事実は興味深い。このロドプシンは、光を吸収して異性化をした段階では自分がどのイオンをポンプするのかかわからない、と言うことができる。

今回のポスター発表では、変異タンパク質に対する新たな結果も示し、光駆動ナトリウムポンプの構造の特徴について議論したい。

【参考文献】 [1] 神取秀樹, *Mol. Sci.* **5**, A0043 (2011). [2] O. Ernst et al. *Chem. Rev.* **114**, 126 (2014). [3] M. Shibata, H. Kandori *Biochemistry* **44**, 7406 (2005). [4] K. Inoue et al. *Nature Commun.* **4**, 1678 (2013). [5] H. Ono et al. *J. Phys. Chem. B* **118**, 4784 (2014). [6] D. Suzuki et al. *Biochemistry* **47**, 12750 (2008). [7] H. Kandori et al. *PNAS* **97**, 4643 (2000).

