3C08

# $H^+$、$Na^+$、$Cl^-$、三種の光駆動型イオンポンプの機能転換

(名古屋工業大学[1], JST さきがけ[2]) ○井上圭一[1,2], 野村祐梨香[1]、神取秀樹[1]

# Functional conversion among light-driven $H^+$, $Na^+$ and $Cl^-$ pumps

(Nagoya Inst. Tech.[1], JST PRESTO[2]) ○Keiichi Inoue[1,2], Yurika Nomura[1], Hideki Kandori[1]

【序】微生物型ロドプシンは真正細菌や古細菌、真核生物など主に単細胞微生物の細胞膜に存在する光受容型膜タンパク質である。全ての微生物型ロドプシンは共通の 7 回膜貫通型構造を持つ。また発色団として all-*trans* 型のレチナールを分子内部に結合しており、レチナールが光を吸収すると 13-*cis* 型へと異性化し、その光反応をトリガーとして様々な生理機能が発現される。中でも最も早く発見され、詳細に研究されているのが高度好塩古細菌の持つ光駆動外向き $H^+$ポンプであるバクテリオロドプシン（BR）と内向き $Cl^-$ポンプのハロロドプシン（HR）である。

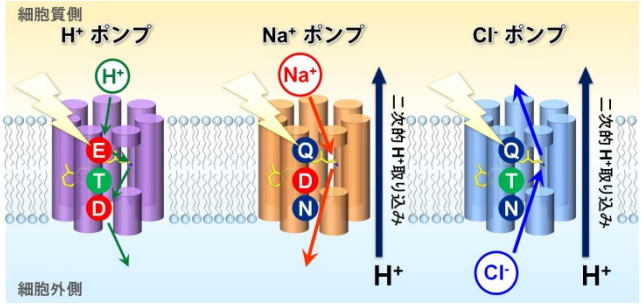


**図 1.** 真正細菌の持つ三種類（$H^+$, $Na^+$, $Cl^-$）の光駆動型イオンポンプロドプシン[1]

一方で近年これらとは別に、海洋に棲む真正細菌から BR とは全く異なる $H^+$ポンプであるプロテオロドプシン（PR）が発見された。またさらに HR と同様に真正細菌も独自の $Cl^-$ポンプを持つことも明らかになっている[1]。そして 2013 年に我々は真正細菌が、古細菌には存在しない外向きの $Na^+$ポンプを持つことを報告した[2]。すなわち真正細菌は**図 1** に示すような三種類の光駆動イオンポンプを用いて、光のエネルギーで様々なイオンの輸送を行っている。

過去の研究により、これら光駆動型イオンポンプがそれぞれの機能に応じたイオンを輸送する際に、三本目の膜貫通ヘリックス（ヘリックス C）上の残基が重要であることが分かっている[1,3]。例えば BR や PR ではレチナールを挟んで細胞外側と内側にそれぞれ一残基ずつ $H^+$移動に関わる酸性残基が存在する（BR では両方とも Asp、PR では前者が Asp で後者が Glu）。またその間に存在する Thr も機能に重要であり、これら 3 つの残基は DTD(E)モチーフと呼ばれる。一方で真正細菌の $Cl^-$ポンプは $H^+$ポンプの酸性残基が Asn と Gln に変わった、NTQ モチーフを持つ。そして $Na^+$ポンプのモチーフは、さらに NTQ 型の Thr が Asp に置き換わった NDQ 型であり[3]、各イオンポンプにはその機能に応じて保存されたモチーフがある（**図 1**）。

ここから光駆動型イオンポンプにはモチーフの三残基が重要であるとされているが、本当にモチーフのみで機能が決定されるのか、モチーフは必要条件でそれ以外の残基も機能決定に関わるのかは不明である。これに対し、我々は特定の機能を持つタンパク質のアミノ酸を、別の機能を持つ分子の相同な位置にある残基と入れ替え、その時の機能の変化を調べる「機能転換実験」を行えば、三種類のポンプの機能を分ける鍵となるアミノ酸を同定し、機能決定の必要十分条件を明らかにできると考えた。そこで本研究ではまず互いのポンプのモチーフ部分のみを入れ替え、それによる機能の変化を見た後、さらにそれ以外の残基を変異した時の影響を見ることで、イオンポンプの機能を決定する要因を明らかにすることを目指した。

**【実験】**全てのロドプシンとその変異体は、大腸菌（C41(DE3)株）に遺伝子を導入し、タンパク質を発現させてイオン輸送活性測定に用いた。ロドプシンのイオン輸送活性は、pH 電極を用いてイオン輸送に伴う大腸菌懸濁液の pH 変化を測定することで評価した。

**【結果と考察】**今回 $H^+$、$Na^+$、$Cl^-$ポンプである GR、KR2、FR の三種類のロドプシンを実験に用いた。まず野生型のロドプシンについて、$H^+$ポンプの場合は光照射により、細胞外の溶液の pH が低下し、$Cl^-$と $Na^+$ポンプではイオンの輸送に伴い、二次的な$H^+$の取り込みが起こり、pH が上昇する。これに対し、各ポンプのモチーフを残りの二種類のものに置き換えたところ、大部分で活性が失われた（**図 2**）。その中で唯一活性を示しものは DTE モチーフを導入した KR2 のみであり、弱い $H^+$ポンプ活性がみられた。これは野生型 KR2 は $Na^+$がない環境下で $H^+$を輸送する機能を持っているため、モチーフの転換だけで、容易に $Na^+$中でも $H^+$を輸送する $H^+$ポンプに機能転換されたと考えられる。ここからモチーフのみでポンプの機能は決まらないことが分かった。

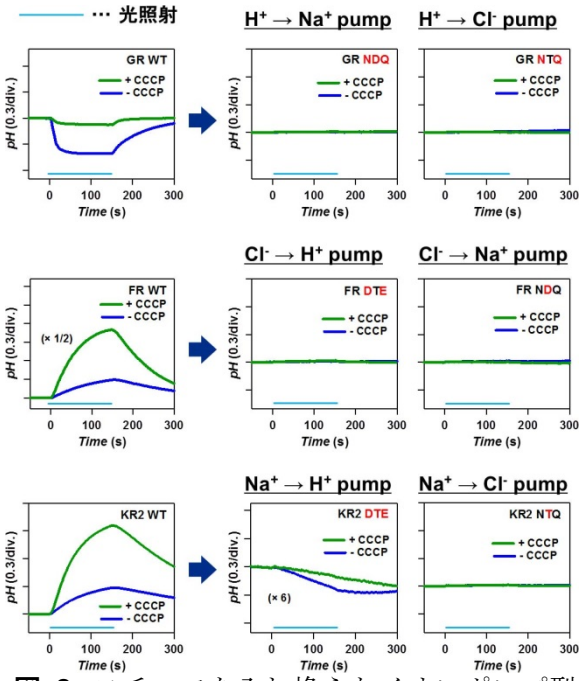


**図 2.** モチーフを入れ換えたイオンポンプ型ロドプシンのイオン輸送活性

そしてモチーフに加え、さらなる変異を導入した。まず KR2 は細胞外側に $Na^+$を結合するが、それに関わる Asp102 を Asn に変異すると KR2 DTE の $H^+$ポンプ活性が増大し、また KR2 NTQ に D102N 変異を加えると $Cl^-$ポンプ活性が現れた。これは $Na^+$の結合が $H^+$や$Cl^-$の輸送を阻害していることを意味する。一方 FR DTE について $Cl^-$ポンプで保存性が高い細胞質側の Ser255 を Phe に変異したところ、$H^+$ポンプ活性が見られた。また興味深いことに DTE ではなく古細菌型の DTD モチーフを用いると KR2 も FR もより強い $H^+$ポンプに機能転換された。

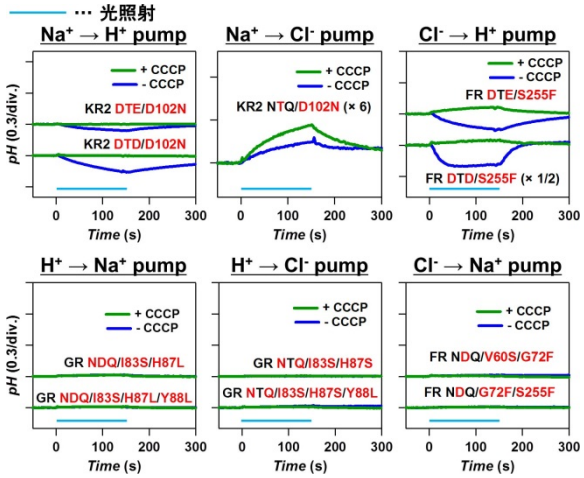


**図 3.** モチーフに加え、さらなるアミノ酸の入れ替えを行った変異体のイオン輸送活性

このように $Na^+ \rightarrow H^+$, $Na^+ \rightarrow Cl^-$, $Cl^- \rightarrow H^+$の三種の機能転換については「モチーフ+1 残基」の変異により実現された。しかしそれらとは逆向きの三種の機能転換（$H^+ \rightarrow Na^+$, $H^+ \rightarrow Cl^-$, $Cl^- \rightarrow Na^+$）についてはより多くの変異を加えても活性が現れなかった（**図 3**）。すなわち今回検討したモチーフ＋数残基の変異では、常に一方向的にしか機能転換が成功しないという結果となった。これは過去の BR と HR の機能転換の研究で、BR はわずか 1 残基の変異で $Cl^-$ポンプになるのに対し、HR は 10 残基変異しても $H^+$ポンプにはならないものと共通の傾向である。講演では微生物型ロドプシンの機能転換の一方向的な非対称性をもたらす要因についても議論する。

**【参考文献】**1. K. Inoue, Y. Kato, H. Kandori (2015) *Trends Microbiol.* **23**, 91-98.
2. K. Inoue, H. Ono, R. Abe-Yoshizumi, S. Yoshizawa, H. Ito, K. Kogure, H. Kandori. (2013) *Nat. Commun.* **4**, 1678.
3. K. Inoue, M. Konno, R. Abe-Yoshizumi, H. Kandori. (2015) *Angew. Chem. Int. Ed.* published on the web.