

ナトリウムポンプ型ロドプシンの光反応中間体構造のカチオン依存性

(1 阪大院理、2 名工大院工)

○西村 尚¹、水野 操¹、神取 秀樹²、水谷 泰久¹

Cation dependence of the chromophore structure in the photointermediates of sodium ion pump rhodopsin

(1Osaka University, 2Nagoya Institute of Technology)

ONao Nishimura¹, Misao Mizuno¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

【序】ナトリウムポンプ型ロドプシン (NaR) は光照射によりナトリウムイオンを細胞内から細胞外へ能動輸送する光駆動型カチオンポンプである。また、ナトリウムイオン非存在下ではリチウムイオンやプロトンを送る。その輸送機構はまだ解明されていないが、他の光駆動型イオンポンプと同様に、いくつかの反応中間体を経るサイクル反応を示すことが知られている[1]。イオン輸送機構を明らかにするためには、各反応中間体のレチナール発色団の構造を明らかにすることが重要である。本研究では時間分解共鳴ラマン測定を行い、NaRの反応中間体におけるレチナール発色団の構造、およびそのカチオン依存性を調べた。その結果、NaRはいずれの中間体においてもレチナール発色団のシッフ塩基が強い水素結合を形成していることがわかった。また、反応中間体のスペクトルはカチオン依存性をもつことがわかった。

【実験】実験に用いたNaRは*Krokionobacter eikastus*由来で、KR2とも呼ばれている。大腸菌中で発現したNaRをカラムクロマトグラフィーにより精製した。この試料を、界面活性剤を含んだバッファー (pH 8.0) に可溶化し、フローセル中に循環させて時間分解共鳴ラマン測定を行った。K中間体の測定では波長532 nmのパルス光を使用し、パワーの強弱差により過渡種のスペクトルを得た。L中間体の測定にはポンプ光に波長532 nmの光を、プローブ光には波長475 nmの光を使用し、ポンプ-プローブ法で時間分解測定を行った。

【結果と考察】図1に、ナトリウムイオン存在下での、未反応状態のNaRおよび反応中間体の共鳴ラマンスペクトルを示す。これらのスペクトルには、共鳴効果によってレチナール発色団のラマンバンドが選択的に観測されている。未反応状態のスペクトルにおいて、レチナール発色団の構造を示すマーカーバンドであるC-C、C=C、C=N伸縮振動バンドが1199、1531、1639 cm^{-1} に観測された。K中間体のスペクトルでは、後者2つのバンドはそれぞれ1531、1635 cm^{-1} に観測され、C-C伸縮振動バンドは1186、1197 cm^{-1} に2本観測された。1186 cm^{-1} のバンドはレチナール発色団が13-*cis*形構造をとっていることを示すマーカーバンドであり、K中間体までの段階で、レチナール発色団がall-*trans*形から13-*cis*形に構造変化していることを示す。また、C=N伸縮振動バンドは1639 cm^{-1} から1635 cm^{-1} に低波数シフトした。C=N伸縮振動はN-H変角振動とカップルしているため、その振動数はシッフ塩基が形成している水素結合の強度を反映する[2]。水素結合が強いとC=N伸縮振動バンドの振動数は高くなり、重水素置換したときの波数シフトがより大きくなる。このことからK中間体では光反応前と比べて水素結合が弱くなっていることがわかった。L中間体のスペクトルではC=C、C=N伸縮振動バンドが、それぞれ1546、

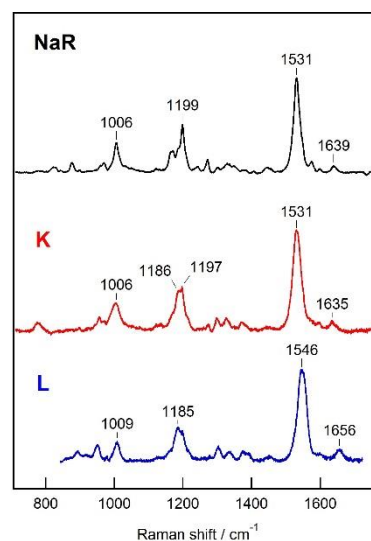


図1. NaRの共鳴ラマンスペクトル。

1656 cm^{-1} に観測された。C=N伸縮振動バンドは、未反応状態、およびK中間体に比べて高波数側にあり、これらと比べてL中間体では、より強い水素結合を形成していることがわかった。また、未反応状態、K、およびL中間体のC=N伸縮振動バンドは重水素置換による波数シフトを示し、それぞれのシフト幅は21、20、35 cm^{-1} であった。これらの値は他のロドプシンのものと比べても大きく、C=N伸縮振動バンドの振動数自体も高いことから、未反応状態、K、およびL中間体すべてにおいて、プロトン化シッフ塩基は強い水素結合を形成することがわかった。

L中間体においてC=C伸縮振動バンドは、未反応状態と比べると高波数側にシフトした。C=C伸縮振動バンドの振動数はレチナール発色団の吸収極大波長と相関があり、吸収極大が長波長側にシフトするとC=C伸縮振動バンドは低波数シフトする。NaRの定常状態の吸収極大波長は525 nm、L中間体の吸収極大波長は505 nmであることがわかっており、この実験事実はいままで知られている相関関係で説明できる。

図2に、バッファー中のカチオンの種類が異なるNaRの共鳴ラマンスペクトルを示す。未反応状態のスペクトルをカチオン間で比較するとC=C伸縮振動バンドがナトリウムイオン、リチウムイオン、カリウムイオン存在下で、それぞれ1531、1532、1534 cm^{-1} に観測された。各試料の吸収極大波長は525、520、517 nmであり、上述したC=C伸縮振動の振動数と、吸収極大波長の相関関係を満たしていた。1640 cm^{-1} 付近に観測されているC=N伸縮振動バンドの振動数、および1200 cm^{-1} 付近に観測されているC-C伸縮振動バンドの形も、カチオン間で異なっていた。このように、未反応状態のNaRのスペクトルにはカチオン依存性が見られ、レチナール発色団の構造にカチオンが影響を及ぼしていることがわかった。K中間体では、ナトリウムイオン、リチウムイオン存在下でのスペクトルは、互いによく似ているが、カリウムイオン中でのスペクトルは他の2つのスペクトルとは異なっていた。一方、L中間体のスペクトルにはカチオン依存性が見られなかった。NaRは、ナトリウムイオン、あるいはリチウムイオン存在下では、これらを輸送するが、カリウムイオン存在下では、プロトンを輸送することが知られている[1]。本研究で観測された、スペクトルのカチオン依存性は、K中間体において、輸送されるカチオンが発色団に近づき、L中間体においては、それらが発色団から遠ざかることを示唆している。

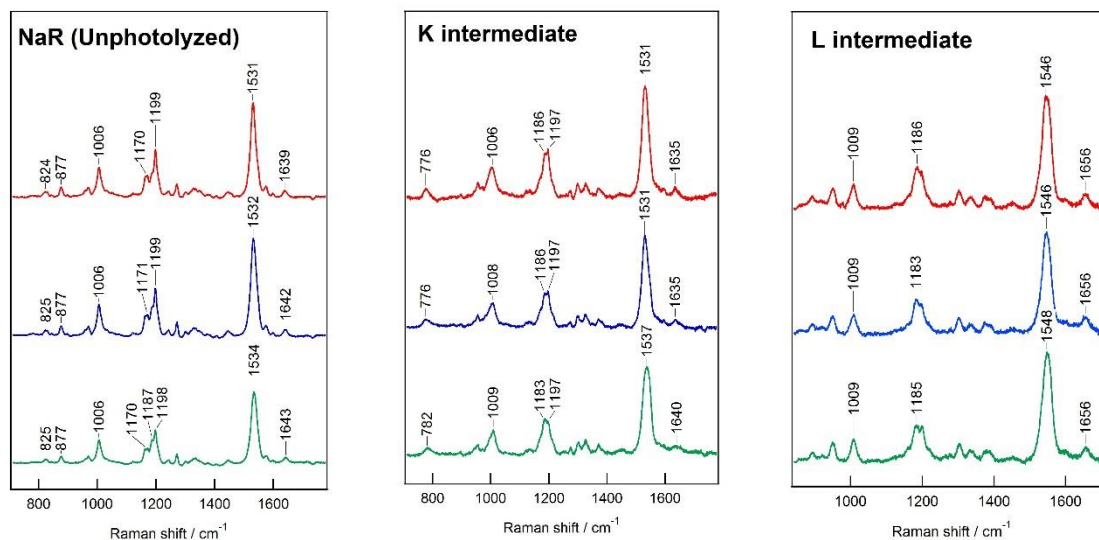


図2. NaRの共鳴ラマンスペクトルのカチオン依存性。左から未反応状態、K中間体、L中間体のスペクトルで、各パネル中の赤、青、緑のスペクトルは、それぞれナトリウムイオン、リチウムイオン、カリウムイオン存在下のスペクトルを示す。

- 参考文献 [1] K. Inoue et al., *Nature Communication* **2013**, 4, 1678.
 [2] T. Baasov et al., *Biochemistry* **1987**, 26, 3210.