

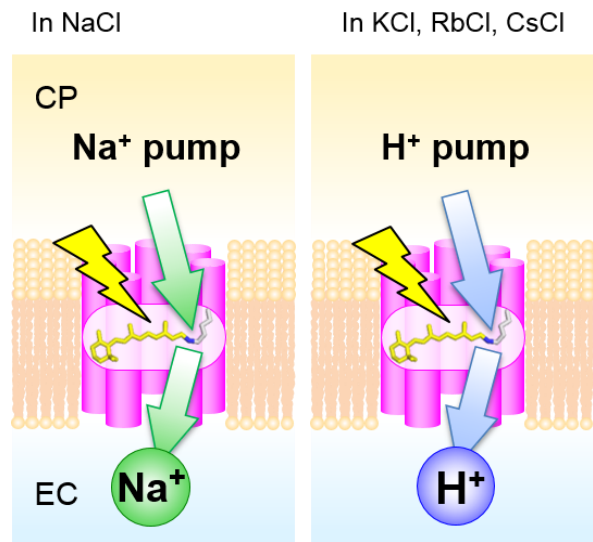
光駆動ナトリウムポンプの速度論的研究

(名古屋工業大学¹、JST さきがけ²) ○加藤善隆¹、井上圭一^{1,2}、吉住 玲¹、神取秀樹¹Kinetic study of light-driven Na⁺ pump(Nagoya Institute of Technology¹, JST PREST²) ○Yoshitaka Kato¹, Keiichi Inoue^{1,2},
Rei Abe-Yoshizumi¹, Hideki Kandori¹

【序】光駆動外向きプロトンポンプ機能を持つバクテリオロドプシン (BR)、内向きクロライドポンプ機能を持つハロロドプシン (HR) は、1970 年代に高度好塩古細菌から発見された。多くの分光実験や X 線結晶構造解析の結果から、機能メカニズムについての理解が深まっている[1]。これらの微生物型ロドプシンはタンパク質内部に発色団としてレチナールをシッフ塩基結合している。BR の場合、内部に結合したレチナールが光異性化を起こすと、シッフ塩基に結合した H⁺ の移動が起こる。また、HR の場合はプロトン化シッフ塩基と相互作用した Cl⁻ の移動が起こる。このように、シッフ塩基周辺でのイオンの動きがポンプ機能を可能にしているため、プロトン化したシッフ塩基に結合できない Na⁺ をポンプすることはないと考えられていた。

そのような中、我々は海洋性細菌 *Krokinobacter eikastus* 由来の新規ロドプシン KR2 が Na⁺ を細胞外側へとポンプするナトリウムポンプ型ロドプシンであることを 2013 年に報告した [2]。KR2 は K⁺, Rb⁺, Cs⁺ 等の大きなカチオンを輸送できず、それらのカチオンを含む溶液中では H⁺ を外向きにポンプすることもわかっている (図 1)。また、それぞれの条件下で光反応サイクルを比較すると、NaCl 中ではミリ秒スケールの速い光反応を示し、KCl 中では数百ミリ秒の遅い光反応を示すことがわかった [2, 3]。その後、77 K での光誘起赤外差スペクトルの測定により、KR2 はレチナール異性化が起きた段階では同一の構造を持ち、どのイオンを輸送するかはわからないという結果が得られた [4]。今年 4 月には東大濡木研との共同研究により KR2 の結晶構造を報告した [5]。この構造から、シッフ塩基近傍に存在するアスパラギン酸側鎖の動きが Na⁺ 輸送を可能にしていることが示唆された。また、イオンの取込みが起こる細胞質側に親水性キャビティの存在が確認され、変異体実験を組み合わせることで、カチオン選択性に関わるアミノ酸を特定した [5]。

このように Na⁺ の輸送メカニズムに関しては徐々に明らかになっている。しかしながら、もう一つの機能である H⁺ ポンプメカニズムや Na⁺ と H⁺ の選択性についてはほとんど情報がなかった。本研究では KR2 に対して紫外可視過渡吸収測定を行い、Na⁺ と H⁺ の選択性を反応速度論的に解析した。

図 1 Na⁺ と H⁺ をポンプする KR2

【実験】C末端に His タグ配列を導入した KR2 を、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。細胞膜に発現した KR2 を界面活性剤によって可溶化し、Co²⁺-NTA カラムを用いて精製した。可溶化状態にある精製 KR2 を脂質膜に再構成した後に、測定用のバッファーに交換した。バッファーに含まれる pH や NaCl の濃度を調節し、室温で光励起後の過渡吸収変化を測定し、光反応中間体の生成・減衰の速度を解析した。

【結果と考察】様々な NaCl 濃度・pH における紫外可視過渡吸収測定の結果、NaCl 濃度の低い条件では KCl 中と類似した遅い光反応を示すことがわかった。また、光反応中に形成される M 中間体の減衰速度が NaCl 濃度の増加、pH の低下（プロトン濃度の増加）によって加速されることが確認され、Na⁺と H⁺の取込みが共に M 中間体の減衰時に起こることが明らかになった。400 nm 付近に吸収極大をもつ M 中間体は、シッフ塩基が脱プロトン化した状態であるため、M 中間体減衰の促進はシッフ塩基の再プロトン化が促進されることを意味している。

そこで M 中間体の減衰時に H⁺と Na⁺との取込みが競合的に起こるという反応モデルを立て、H⁺と Na⁺の選択性を、Na⁺取込みと H⁺取込みの反応速度定数の比 (k_H / k_{Na}) として求めたところ、その比は 8,000 前後であることが明らかになった。この結果は、ナトリウムイオンとプロトンが同濃度である場合に KR2 は H⁺を 8,000 倍も取り込みやすいことを示している。しかしながら、KR2 が発見された海洋では、[Na⁺] = 4 × 10⁻¹ M、pH 8 ([H⁺] = 10⁻⁸ M) とナトリウムイオン濃度が圧倒的に高く、8,000 倍という速度定数の比を乗り越えて Na⁺の取込みが優先的に起こると考えられる。

ポスター発表では、過渡吸収測定で観察された Na⁺および pH 依存性について詳しく紹介し、光駆動ナトリウムポンプの光反応モデルを提案する。

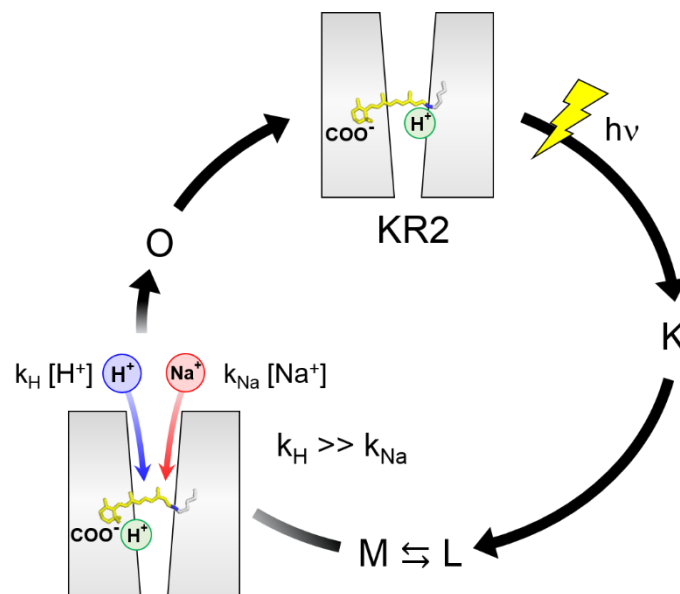


図2 Na⁺と H⁺の競合取込みモデル

【参考文献】 [1] O. Ernst et al. *Chem. Rev.* **114**, 126 (2014). [2] K. Inoue et al. *Nat. Commun.* **4**, 1678 (2013). [3] K. Inoue et al. *Trends Microbiol.* **23**, 91 (2014). [4] H. Ono et al. *J. Phys. Chem. B* **118**, 4784 (2014). [5] H. E. Kato et al. *Nature* **521**, 48 (2015).