

ナトリウムイオン輸送機能を有するレチナールタンパク質 KR2 の
超高速ダイナミクス

(¹理研・田原分子分光、²東工大・生命理工、³理研・光量子工学研究領域
⁴名工大・院工、⁵JST・さきがけ)

田原 進也^{1,2}、○竹内 佐年^{1,3}、吉住 玲⁴、井上 圭一^{4,5}、大谷 弘之²
神取 秀樹⁴、田原 太平^{1,3}

Ultrafast dynamics of a sodium-ion-pumping retinal protein KR2

(¹Molecular Spectroscopy Lab., RIKEN, ²Biomol. Eng., Tokyo Tech., ³RAP, RIKEN
⁴Dept. Frontier Materials, Nagoya Institute of Technology, ⁵PRESTO, JST)

Shinya Tahara^{1,2}, ○Satoshi Takeuchi^{1,3}, Rei Yoshizumi⁴, Keiichi Inoue^{4,5}
Hiroyuki Ohtani², Hideki Kandori⁴, Tahei Tahara^{1,3}

【序】レチナールタンパク質は光駆動のイオン輸送やセンサー機能を有する光受容タンパク質である。その発色団であるレチナールはリシン残基側鎖のアミノ基とプロトン化シッフ塩基結合している。バクテリオロドプシンなどのプロトン輸送レチナールタンパク質は、シッフ塩基のプロトンを送り出し、その反対側からプロトンを受け取ることで、その機能を発揮している。一方、プロトン化シッフ塩基は正の電荷を持ち、静電反発を生じるため、プロトン以外のカチオンをポンプするレチナールタンパク質は存在しないと考えられてきた。ところが近年、ナトリウムイオンを輸送する新しいレチナールタンパク質 KR2 が発見された[1]。KR2 はその機能からオプトジェネティクスツールとしても期待されている。そのため KR2 のナトリウムイオン輸送機構は赤外吸収分光、X線回折、マイクロ-ミリ秒の時間分解吸収分光により活発に研究されている。

典型的な微生物型レチナールタンパク質であるバクテリオロドプシン(bR)では、Asp85 がレチナールプロトン化シッフ塩基のカウンターイオンである(図1上)。M中間体においてプロトン化シッフ塩基のプロトンはAsp85に移動する。これに続くプロトンの授受によって最終的にプロトン輸送を達成する。一方、KR2のプロトン化シッフ塩基のカウンターイオンはAsp116である(図1下)。M中間体においてプロトン化シッフ塩基のプロトンはAsp116に移動する。これによりAsp116側鎖がSer70の方向を向くことがX線回折の結果から示唆されている[2]。このダイナミクスがシッフ塩基とナトリウムイオンの間の静電反発を弱めるため、ナトリウムイオンがシッフ塩基近傍を通過できると考えられている。このようにKR2のプロトン化シッフ塩基周辺のアミノ酸配置は、KR2に特異な反応ダイナミクスを生じさせ、ナトリウムイオン輸送を可能にしていると考えられる。したがってKR2の光反応ダイナミクスの研究は、ナトリウムイオン輸送機構の理解に重要である。本研究ではフェムト秒時間分解吸収分光法により、KR2の超高速光反応ダイナミクスの観測を初めて行った。

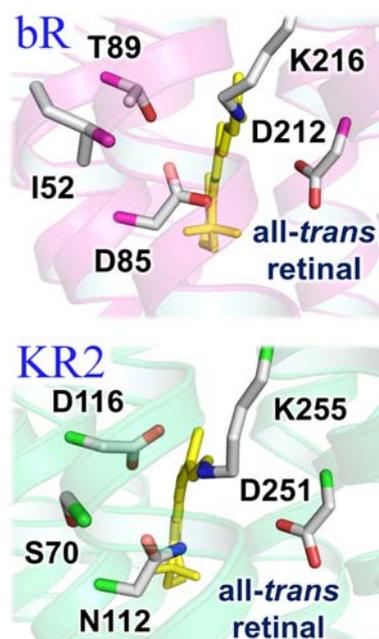


図1 bR, KR2の発色団周辺アミノ酸配置

【実験】KR2 を大腸菌 C41(DE3)株に大量発現させ、それを可溶化、精製した。バッファーは 100 mM NaCl, 0.05% n-Dodecyl- β -D-maltoside(DDM)を含む 50 mM Tris-HCl(pH 8)溶液を用いた。575 nm の励起パルス光、超広帯域プローブパルス光をこの試料に集光し、透過したプローブ光をポリクロメーターにより分光し、CCD カメラによって検出した。励起パルス光とプローブパルス光の間の光路差を掃引することにより、各遅延時間における時間分解吸収スペクトルを得た。時間分解能は約 100 fs であった。

【結果および考察】図 2 に KR2 のフェムト秒時間分解吸収スペクトルを示した。KR2 の励起直後、460 nm 付近に S_1 状態からより高い電子励起状態 (S_n 状態)への励起状態吸収帯、550 nm 付近に S_0 状態 KR2 の減少を反映したブリーチング、720 nm 付近に S_1 状態から S_0 状態への誘導放出帯が観測された。励起状態吸収帯および誘導放出帯は 1 ps 以内にほとんど 0 に減衰した。それに伴い、620 nm 付近に吸収帯が現れた。これは光反応生成物に由来すると考えられる。したがって光反応生成物は 1 ps 以内に S_1 状態から直接生成することが示唆される。さらにこの光反応生成物の吸収帯はピコ秒の時間領域で短波長シフトを示した。このような短波長シフトはバクテリオロドプシンやセンサーロドプシン I の超高速ダイナミクスにおいても観測されており、光サイクルの最初の間中帯である J 中間体から K 中間体への反応に帰属されている。これに基づき、KR2 において観測されたピコ秒領域の短波長シフトを KR2 の J 中間体から K 中間体への反応に帰属した。200 ps における時間分解吸収スペクトルは、すでに報告されている K 中間体と S_0 状態 KR2 の差スペクトルにほぼ一致する。

本研究から S_1 状態の KR2 は直接 J 中間体を与え、そこから K 中間体を生成することが明らかとなった。反応時定数解析の結果も含め、KR2 の超高速光反応ダイナミクスのスキームを図 3 に示した。このダイナミクスはバクテリオロドプシンなどの典型的なレチナルタンパク質に比べ、数倍速い。これは KR2 のプロトン化シッフ塩基周辺のアミノ酸配置の特異性によるものと考えられる。

発表では解析の詳細についても説明する。

【参考文献】

- [1] Inoue, K., et al., *Nat. Commun.*, **4**, 1678 (2013)
- [2] Kato, H. E., et al., *Nature*, **521**, 48-53 (2015)

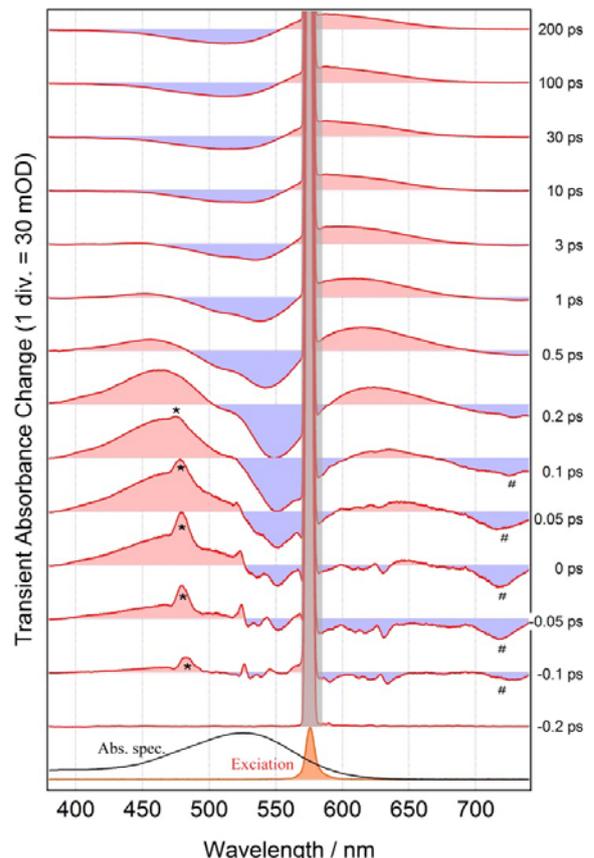


図 2. KR2 のフェムト秒時間分解吸収スペクトル。*は水の OH 伸縮振動の逆ラマン信号、#はその誘導ラマン利得が誘導放出に重なっている。

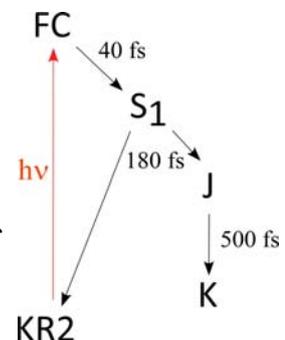


図 3. KR2 の超高速光反応ダイナミクス