

## 2P091

### 真正細菌の Cl<sup>-</sup>ポンプと H<sup>+</sup>ポンプの機能転換の構造基盤の赤外分光研究

(名工大・院工<sup>1</sup>, JST さきがけ<sup>2</sup>)

○野村 祐梨香<sup>1</sup>, 井上 圭一<sup>1,2</sup>, 伊藤 奨太<sup>1</sup>, 神取 秀樹<sup>1</sup>

### Infrared spectroscopic study of structural basis of functional conversion of eubacterial Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> pump

(Nagoya. Inst. Tech.<sup>1</sup>, JST PREST<sup>2</sup>)

○Yurika Nomura<sup>1</sup>, Keiichi Inoue<sup>1,2</sup>, Shota Ito<sup>1</sup>, Hideki Kandori<sup>1</sup>

**【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は過去に古細菌から見つかり、光のエネルギーを使って H<sup>+</sup>をポンプするバクテリオロドプシン(BR)や Cl<sup>-</sup>をポンプするハロロドプシン(HR)が知られている。BRは1つのアミノ酸変異により Cl<sup>-</sup>ポンプに機能転換できるが[1]、HRの同じ部位を変異しても H<sup>+</sup>ポンプにはならない[2]。このような古細菌型ロドプシンにおける機能転換の非対称性については、活性中心における水素結合構造が要因であると考えられている[2]。一方、近年、真正細菌からも H<sup>+</sup>ポンプ[3]、Cl<sup>-</sup>ポンプ[4]が見つかり、

ポンプ機能に重要と考えられているのが三本目の  $\alpha$ -helix (Helix C)上に存在するアミノ酸残基である。H<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンではレチナールから H<sup>+</sup>を受け取る Asp とその後でレチナールに H<sup>+</sup>を渡す酸性残基 (古細菌では Asp、真正細菌では Glu) が保存され、その間にある Thr と合わせて DTD(E)モチーフと呼ばれる。古細菌の Cl<sup>-</sup>ポンプが TSA モチーフを持つ一方、真正細菌の Cl<sup>-</sup>ポンプでは H<sup>+</sup>ポンプの酸性残基が Asn と Gln に置き換わっており NTQ モチーフと呼ばれる (Fig. 1)。これらのモチーフは保存性が高く機能に重要と考えられているが、モチーフだけで輸送するイオンの選択性が決まるのか、他の要因が機能の決定に関わるのかは不明である。これに対し一方の分子のアミノ酸を別のタイプのロドプシンのアミノ酸に順次置換し機能の転換を試みることで、イオン選択性の違いを生み出しているアミノ酸を明らかにすることができると考えられる。そこで今回、真正細菌の Cl<sup>-</sup>ポンプと H<sup>+</sup>ポンプについて相互に機能転換することで機能を決定する要因の解析を試み、さらに過渡吸収測定とフーリエ変換赤外分光 (FTIR)測定を行い、その光反応の解析およびそれらの分子構造を調べた。

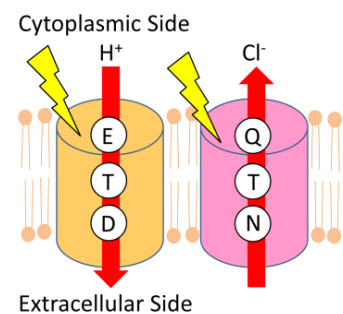


Fig. 1 H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> pump rhodopsins

**【実験】** 本研究では、H<sup>+</sup>ポンプである *Gloeobacter violaceus* 由来の *Gloeobacter* rhodopsin (GR)、Cl<sup>-</sup>ポンプである *Fulvimarina pelagi* 由来の *Fulvimarina* rhodopsin (FR)を鋳型としてアミノ酸変異を導入した。変異を導入したロドプシンを大腸菌で発現させ、大腸菌懸濁液の光照射に伴う pH 変化を pH 電極で測定することでイオン輸送活性を評価した。また、変異したロドプシンの光反応については過渡吸収測定、FTIR 測定を行った。

**【結果と考察】** 最初に、Cl<sup>-</sup>ポンプをH<sup>+</sup>ポンプに機能転換するために、FRのNTQモチーフをH<sup>+</sup>ポンプ型のDTEモチーフにしたロドプシンを大腸菌で発現し、大腸菌の懸濁液の光照射に伴うpH変化をpH電極で測定した。その結果FR DTEはCl<sup>-</sup>ポンプ活性が消失し、H<sup>+</sup>ポンプ活性も現れない結果となった。しかし、このFR DTEに細胞質側に存在するアミノ酸残基Ser255をH<sup>+</sup>ポンプで保存されているPheに変異したところ、H<sup>+</sup>ポンプ活性が見られた(Fig. 2b)。一方、H<sup>+</sup>ポンプからCl<sup>-</sup>ポンプへの機能転換は、さらに多くの変異を導入しても機能を変えることはできなかった(Fig. 2d)。このH<sup>+</sup>ポンプへの機能転換に成功した変異体を過渡吸収測定により光反応を観測すると、H<sup>+</sup>ポンプに機能転換した変異体では、H<sup>+</sup>ポンプに特徴的な、シッフ塩基が脱プロトン化し短波長に吸収を持つM中間体の存在が観測され、天然のH<sup>+</sup>ポンプと同様のフォトサイクルを示した(Fig. 2e)。一方、Cl<sup>-</sup>ポンプに機能転換できない変異体では、Cl<sup>-</sup>イオン結合部位周辺のアミノ酸をCl<sup>-</sup>ポンプ型に置換してもCl<sup>-</sup>の結合は見られず、フォトサイクルも天然のCl<sup>-</sup>ポンプのCl<sup>-</sup>非結合型に似通った光反応を示した。また、より詳細な構造情報を得るため、FTIR測定を行った。古細菌型ロドプシンの研究では、H<sup>+</sup>ポンプ機能を持つロドプシンは活性中心に2400 cm<sup>-1</sup>以下のO-D伸縮振動を持つ強い水素結合をする水分子を持つことが示されている。古細菌型Cl<sup>-</sup>ポンプをH<sup>+</sup>ポンプ型に近づけたが機能転換が達成できない10重変異体では強い水素結合をする水分子は観測されない。従ってH<sup>+</sup>ポンプ機能を示すには、強い水素結合をする水分子が必須であることが知られている。そこで、まずFR WTのFTIR測定で、O-D伸縮振動領域を観測し、水分子の水素結合環境を調べた。その結果、FR WTは2400 cm<sup>-1</sup>以下の波数を持つ強い水素結合をする水分子が存在することが観測された。さらにH<sup>+</sup>ポンプに機能転換した変異体でもより低波数にそのような水分子を持つ信号を得た。

今回、真正細菌のCl<sup>-</sup>ポンプおよびH<sup>+</sup>ポンプを相互に機能転換を試みた結果、Cl<sup>-</sup>ポンプからH<sup>+</sup>ポンプへの機能転換は達成された。このことはモチーフだけで機能は決定されず、さらにモチーフ以外のアミノ酸を変異することでイオンの選択性が決まることを示唆している。一方、H<sup>+</sup>ポンプからCl<sup>-</sup>ポンプへは、Cl<sup>-</sup>ポンプからH<sup>+</sup>ポンプへの機能転換で行った変異より多くの変異を加えても機能転換されず、古細菌と真正細菌が全く逆の非対称性を示した結果となった[5]。また真正細菌のCl<sup>-</sup>ポンプであるFRは活性中心に比較的に強い水素結合をする水分子を持つことが、容易にH<sup>+</sup>ポンプに機能転換できた要因であると考えられる。今後は、それぞれの詳細な輸送メカニズムを調べていく予定である。

**【引用文献】** 1. Sasaki et al., *Science*, **269**, 73-75 (1995).

2. Muroda et al., *Biochemistry*, **51**, 4477-4684 (2012). 3. Ernst et al., *Chem. Rev.*, **114**, 126-163 (2014).

4. Inoue et al., *JPCB*, **118**, 11190-11199 (2014). 5. Inoue et al., *J. Biol. Chem.*, **291**, 9883-9893 (2016).

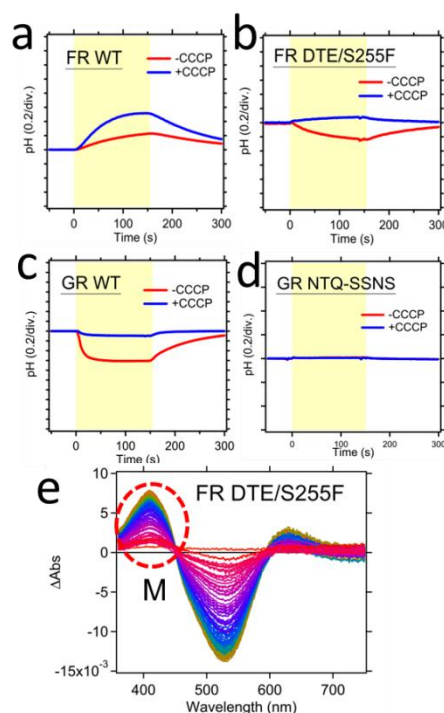


Fig. 2 Pump activity and transient absorption spectra of mutants