

# 光駆動ナトリウムポンプロドプシンの イオン輸送メカニズムの解明と新規機能性分子創成

(名古屋工業大学, JST・さきがけ) ○井上 圭一

## The Study on the Ion-transport Mechanism of Light-driven Sodium Pump Rhodopsin and the Creation of New Functional Molecules

(Nagoya Inst. Tech., JST・PRESTO) ○Keiichi Inoue

【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ち、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いる。そして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(図1)。中でも最も早くに発見され、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<sup>+</sup>ポンプであるバクテリオロドプシン (BR) や内向き Cl<sup>-</sup>ポンプのハロロドプシン (HR) である。これに加え近年では、電気化学勾配に従って、双方向にイオンの輸送が可能な光開閉式のカチオンチャネルやアニオンチャネルなどが報告されている。

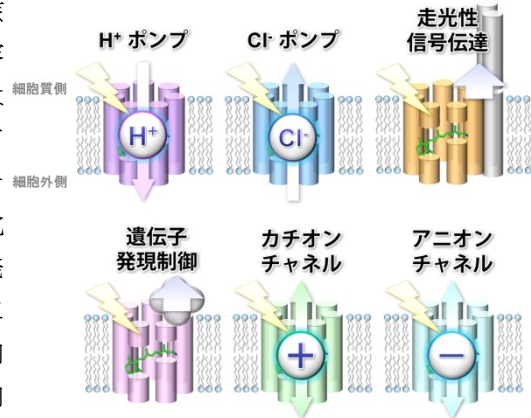


図1. 様々な微生物型ロドプシン

【光駆動 Na<sup>+</sup>ポンプロドプシン】その中で我々は東京湾に棲む海洋性細菌の一種である、*Krokinobacter eikastus* の持つロドプシン (KR2) が、それまでに報告されたものと大きく異なるアミノ酸配列を持つことに注目した。特に H<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンの持つ、レチナール Schiff 塩基への H<sup>+</sup>アクセプターおよび H<sup>+</sup>ドナーとして働く二つの酸性アミノ酸残基が Asn と Gln に置換され (KR2 Asn112, Gln123)、H<sup>+</sup>の解離が起こらなくなっている一方で、その間のレチナールに近い位置に新たなアスパラギン酸 (Asp116) を持つという他には無い特徴を有していた。そこでこの KR2 の機能を調べるため、タンパク質を大腸菌に発現させ、光を照射したところ、細胞外の pH が大きく上昇した。ここへ細胞膜の膜透過性を上昇させる CCCP を加えたところ、その変化が大きくなり、一方で細胞内膜電位を TPP<sup>+</sup>で消失させると光依存的な pH 変化が見られなくなった(図2)。この結果は光依存的な pH の上昇が、KR2 による H<sup>+</sup>以外のイオンを輸送することによって引き起こされる膜電位変化を打ち消すための、二次的な H<sup>+</sup>移動によるものであることを示唆している。またさらに溶液中のアニオンを変化させても、得られる信号に変化は見られなかったが、Na<sup>+</sup>を K<sup>+</sup>以上のサイズを持つカチオンに置き換えたところ、光照射とともに pH の低下が見られ、さらに CCCP でその変化が消失するという結果になった。従ってこの活性のカチオンのサイズ依存性から、KR2 は生理学的条件下では光で Na<sup>+</sup>を細胞外側へ輸送する、光駆動型の Na<sup>+</sup>ポンプであり、Na<sup>+</sup>が存在しない場合代わりに H<sup>+</sup>を輸送する興味深い性質を持つ分子であることが明らかとなった [1]。

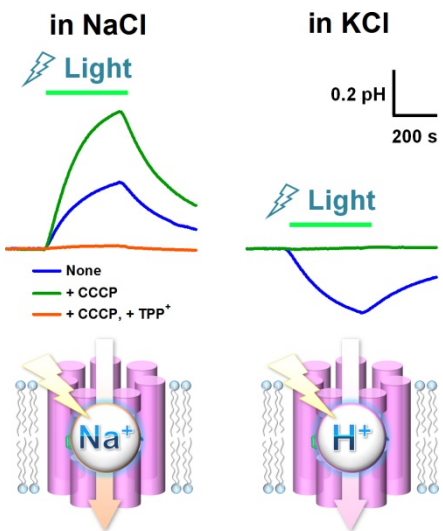


図2. KR2 のイオン輸送機能

**【Na<sup>+</sup>ポンプロドプシンのイオン輸送メカニズム】**大腸菌を用いた実験により、KR2がNa<sup>+</sup>ポンプであることが示されたが、その輸送機構については発見当初から大きな問題があった。即ち微生物型ロドプシンのレチナールはタンパク質部分とH<sup>+</sup>化 Schiff 塩基を介して結合するが、その正電荷をどのようにしてNa<sup>+</sup>が乗り越えて、タンパク質中を輸送されるのか上記の実験では説明することができない。そこで過渡吸収測定を行い、KR2の光反応を調べたところ、まずレチナールが13-*cis*型へと光異性化し[2]、それに続いてSchiff塩基のプロトンがAsp116へと移動することが示された[1, 3, 4]。さらにより詳細な構造情報を得るため、東京大学・濡木グループとの共同研究を通じてX線結晶構造解析を行ったところ、H<sup>+</sup>化したAsp116はその側鎖の配向をSchiff塩基側から変化させ、Ser70やAsn112と水素結合を形成し、細胞質側からのNa<sup>+</sup>の取込み経路を開くことが示唆された[5]。実際にアミノ酸変異によってSer70やAsn112の水素結合を阻害すると、Na<sup>+</sup>輸送活性が消失することから、レチナールからのH<sup>+</sup>移動とAsp116の配向の変化がNa<sup>+</sup>輸送に重要であることが分かり、これによって当初から問題となっていたH<sup>+</sup>化Schiff塩基をどのように乗り越えNa<sup>+</sup>が輸送されるのか、その主要なメカニズムが明らかとなった(図3)。

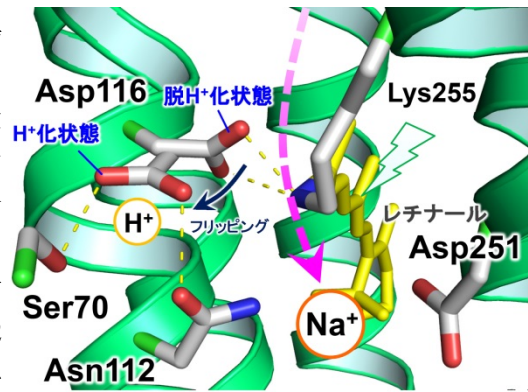


図3. Na<sup>+</sup>ポンプロドプシンのイオン輸送メカニズム

**【Na<sup>+</sup>ポンプロドプシンを用いた新規機能性分子デザイン】**我々はさらに結晶構造を詳しく解析したところ、細胞質側にNa<sup>+</sup>取入口と思われる空隙構造が存在することが明らかとなった(図4)。この空隙にはAsn61とGly263から形作るボトルネック構造があり、この二つの残基に変異を導入したところ、野生型のKR2では見られなかったK<sup>+</sup>やCs<sup>+</sup>といった大きなカチオンの輸送が可能な変異体の作製に成功した(図4)[5, 6]。これらについては今後オプトジェネティクスなどでの幅広い応用が期待される。

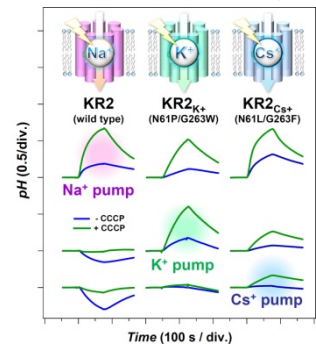
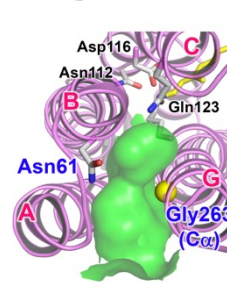


図4. 細胞質側イオン取入口(左)とK<sup>+</sup>およびCs<sup>+</sup>ポンプの作製(右)

現在ゲノム研究の進歩により多様な生物から新奇なロドプシンが次々と発見されているが、今回の結果はその理解に分子科学的なアプローチが重要であることを示すものであり、さらにその知見をもとに分子改変を行うことで、より多様な分子ツールの開発が実現すると期待される。

**【謝辞】**本研究は大変多くの共同研究者のご協力のもと実現することができました。とりわけ、名古屋工業大学・神取秀樹教授、吉住玲博士、今野雅恵博士、加藤善隆博士、大野光さん、東京大学・濡木理教授、石谷隆一郎准教授、加藤英明博士(現スタンフォード大)、木暮一啓教授、吉澤晋博士、飯野雄一教授、東北大学・八尾寛教授、細島頌子博士(現名工大)の皆様には実験や解析、議論など様々な面で多大なご尽力をいただき、この場を借りて、深く御礼申し上げます。

#### 【参考文献】

- [1] K. Inoue, H. Ono, R. Abe-Yoshizumi, S. Yoshizawa, H. Ito, K. Kogure, H. Kandori\* *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1678.
- [2] H. Ono, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, H. Kandori\* *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4784-4792.
- [3] K. Inoue, M. Konno, R. Abe-Yoshizumi, H. Kandori\* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11536-11539.
- [4] Y. Kato, K. Inoue, H. Kandori\* *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 5111-5115.
- [5] H. E. Kato, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, Y. Kato, H. Ono, M. Konno, T. Ishizuka, M. Razuanul Hoque, S. Hososhima, H. Kunitomo, J. Ito, S. Yoshizawa, K. Yamashita, M. Takemoto, T. Nishizawa, R. Taniguchi, K. Kogure, A. D. Maturana, Y. Iino, H. Yawo, R. Ishitani, H. Kandori\*, O. Nureki\* *Nature* **2015**, *521*, 48-53.
- [6] M. Konno, Y. Kato, H. Kato, K. Inoue, O. Nureki, H. Kandori\* *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 51-55.