

光駆動型ナトリウムポンプのイオン輸送機構

(名工大・院工¹)○小崎裕子¹, 角田 聡¹, 神取秀樹¹

Ion transport mechanism of NaRs.

(Nagoya.Inst.Tech¹)○Yuko Kozaki¹, Satoshi Tsunoda¹, Hideki Kandori¹

【序】

生体を形作る細胞は周囲の環境からの様々な情報入力により機能を進行させる。例えば神経細胞においては神経伝達物質等の特定の分子の結合という入力シグナルが、細胞膜に存在するナトリウムチャンネルの活性化を引き起こし活動電位の発生(神経発火)という機能を発揮する。近年こういった神経活動を光で制御する手法であるオプトジェネティクス(光遺伝学)が注目されている。チャンネルロドプシンやハロロドプシンのような光感受性イオントランスポータータンパクを細胞に導入することで、細胞膜電位やイオン環境を光操作する試みである。

2013年に海洋性細菌である *Krokinobacter eikastus* からナトリウムイオンをポンプするロドプシンである KR2 が発見され、光駆動型ナトリウムポンプ(NaR)の存在が初めて明らかとなった¹。KR2は520 nmの光を吸収すると、発色団である *all-trans* レチナールが *13-cis* 型へと異性化し Na⁺を輸送するためのタンパク質の構造変化を引き起こす。また、競合的に H⁺輸送も行うハイブリッド型のポンプである²。これらの特性は他の多くの NaR に共通するものである。我々は電気生理学的手法を用いることで NaR の Na⁺及び H⁺輸送メカニズムを明らかにすることを目的に以下の実験を行った。

【実験】

電気生理学的手法として、パッチクランプ法を用いた。Fig. 1に示すように哺乳類細胞にガラス電極を挿入することで、細胞膜に存在するイオントランスポーターの活性を電流値、電位値として直接観察する。パッチクランプ法では数 pA(ピコアンペア)という微小電流を検出することが可能な上、数十マイクロ秒オーダーの比較的高い時間分解能を持つ。また、細胞膜電位や、細胞内側と外側の溶液環境を目的に応じて変化させることが可能な事も大きな利点である。

今回の測定にはラットとマウスのキメラ

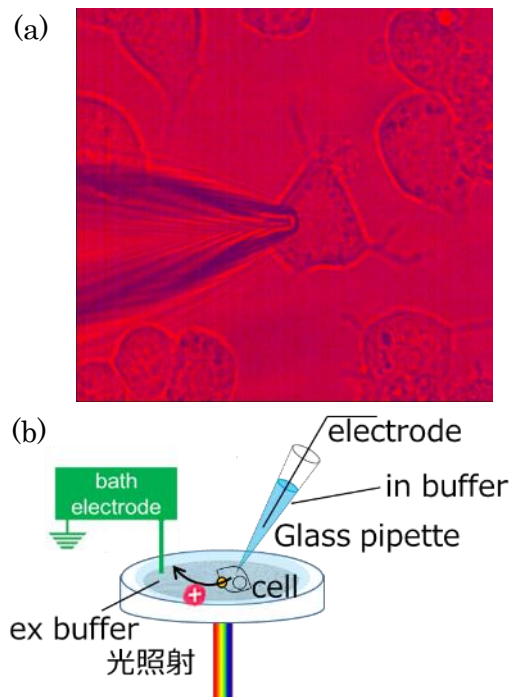


Fig. 1 Patch clamp image of ND7/23 (a) and image of patch clamp method (b).

神経細胞である ND7/23 細胞を用いた。海洋性細菌 *Flagellimonas* sp_DIK 由来の NaR である FdNaR と *Krokinobacter eikastus* 由来の KR2、*Salinarimonas rosea* 由来の SrNaR を ND7/23 細胞に発現させ、イオン輸送活性を測定した。細胞外側と内側を様々なナトリウムイオン環境に変化させ、その際の輸送活性を比較した。

[結果と考察]

KR2 は基底状態において細胞外側の D102 や Y25 周辺にナトリウムイオンを結合している(Fig. 2)³。この外側ナトリウム結合サイトはアミノ酸配列の相同性から FdNaR にも同じく存在すると考えられる。この外側ナトリウム結合サイトへの Na⁺結合・非結合はこれまで Na⁺や

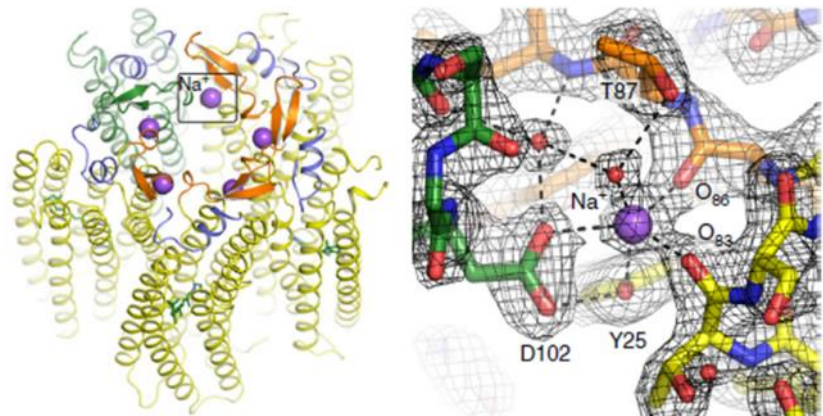


Fig. 2 Position of the sodium ion relative to the pentamerization interface in the KR2 structure.³

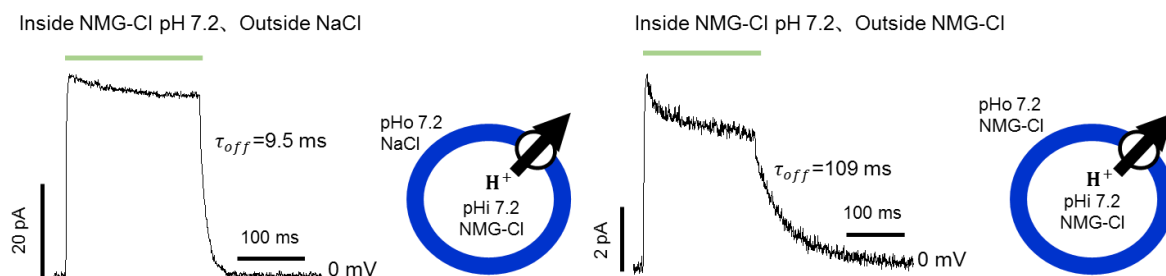


Fig. 3 Representative photocurrent traces of FdNaR recorded in ND7/23 cells. Membrane voltage was clamped 0 mV.

H⁺輸送活性に影響を与えないと報告された。しかし、FdNaR を用いたパッチクランプ測定において、細胞外溶液から Na⁺を除くことで外側ナトリウム結合サイトを Na⁺非結合状態にした場合、H⁺輸送の著しい減少やフォトサイクルの遅延といった興味深い現象が観察された(Fig. 3)。KR2 についても同条件で測定を行ったところ、FdNaR と比べ H⁺輸送の減少は見られなかったものの、フォトサイクルが遅くなっており、輸送活性が減少すると考えられる。これらの結果から、NaR において外側ナトリウム結合サイトは H⁺輸送活性に影響を及ぼしており、Na⁺結合・非結合型で異なったフォトサイクルを有することが予測される。なお、外側ナトリウム結合サイトを持たない SrNaR においては H⁺輸送だけでなく Na⁺輸送の減少も見られたことから、外側ナトリウム結合サイトが Na⁺輸送にも影響を与えていることが示唆された。

(1) Inoue, et al., *Nat Commun.* (2013) **1678**

(2) Y. Kato, et al., *J. Phys. Chem. Lett.*, 2015, *6*(24), pp 5111–5115

(3) Gushchin, et al., *Nat Struct Mol Biol.* 2015 May;22(5):390-5.