

振動和周波発生分光で観るナトリウムポンプロドプシンの気水界面での構造および配向変化ダイナミクス

¹筑波大院数理, ²名工大, ³JSTさきがけ

○近藤正人¹, 奥野将成¹, 井上圭一^{2,3}, 神取秀樹², 石橋孝章¹

Dynamics of conformational and orientational change in sodium pump rhodopsin at the air/water interface monitored by vibrational sum frequency generation spectroscopy

○Masato Kondoh¹, Masanari Okuno¹, Keiichi Inoue^{2,3}, Hideki Kadori², Taka-aki Ishibashi¹

¹ Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Japan

² Nagoya Institute of Technology, Japan

³ PRESTO, JST

【Abstract】 We investigated conformational and orientational dynamics of a light-driven sodium ion pump (KR2) reconstituted in a phospholipid liposome at an air/water interface by vibrational sum frequency generation (VSFG) spectroscopy. A vibrational band at 1640 cm^{-1} was observed in a VSFG spectrum of the KR2 on aqueous buffer solution. We monitored a temporal profile of intensity of the 1640 cm^{-1} band after the KR2 sample was added on the solution. We found that the band intensity rose sharply at about 20 min after the addition of the sample. This observation indicates that conformation or orientation of KR2 shows step function-like dynamics at the air/water interface.

【序】 クロキノバクターロドプシン (KR2) は、海洋性細菌の持つ光駆動ナトリウムイオンポンプである。その発見以来、バルク溶液中でのタンパク質構造やレチナール発色団の光反応が調べられ、ポンプ機構の詳細が議論されてきた[1]。膜タンパク質であるロドプシンは、生体中において膜と水の界面で機能する。そのため、界面での構造や動きにも興味を持たれており、ウシロドプシンの系で、気水界面での配向や、その表面圧による違いが研究されている[2]。しかし、研究例は限られており、配向や構造の時間変化の詳細は分かっていない。特に、KR2について界面での研究例は全くない。本研究では、ヘテロダイン検出振動和周波発生 (HD-VSFG) 分光を用いて、脂質二重膜に再構成した KR2 を対象に、気水界面での配向や構造とその時間変化を調べた。

【実験方法】 リン脂質 POPE と POPG を 3:1 で構成したリポソームを作成し、KR2 を再構成させた。タンパク質と脂質の比は、1:50 とした。得られた KR2 再構成膜は、KR2 濃度が 0.03 mM 程度となるよう、Tris 緩衝液 ($[\text{Tris}] = 50\text{ mM}$, $[\text{NaCl}] = 100\text{ mM}$, pH 8) に懸濁させた。また、対照実験のため、リポソームだけの懸濁液も調製した。試料懸濁液をマイクロシリンジで Tris 緩衝液上に滴下させ、HD-VSFG スペクトルを測定した。HD-VSFG 測定では、可視光を 630 nm に、赤外光を CO 振動領域 ($1600\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$) あるいは、CH 振動領域 ($2700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) に設定した。SFG、可視、赤外光の偏光は、それぞれ、S、S、P とした (SSP 偏光配置)。

【結果と考察】 KR2 再構成膜を緩衝液上に滴下後、30 分以上の時間を置いてから得た HD-VSFG スペクトルの虚部を、脂質二重膜だけを滴下後、および、試料滴下前 (下層液だけ) に得たスペクトルと合わせて図 1 に示した。KR2 再構成膜のスペクトルには、 1640 cm^{-1} と 1724 cm^{-1} に振動バンドが観測された。これらのうち、 1640 cm^{-1} のバンドは、脂質二重膜だけの場合には現れなかったため、KR2 に由来するものである。

KR2 の VSFG スペクトルが観測された事実は、気水界面での KR2 の配向がランダムではなく、配向していることを示している。1724 cm^{-1} のバンドは脂質分子のエステル CO 伸縮振動だと帰属した。

この結果をもとに、KR2 再構成膜が気水界面で示すダイナミクスを調べた。まず、試料を滴下後の表面圧の時間変化を測定した (図 2A)。表面圧は試料滴下直後には上昇せず、滴下約 5 分を過ぎたところから徐々に上昇し始め、30 分後に約 $5(\pm 1) \text{mNm}^{-1}$ に達し、その後もゆっくり上昇した。この時間変化は、滴下後に一旦水中に沈んだ試料が、気水界面に集まる過程を反映したものだと考えられる。

次に、KR2 由来の 1640 cm^{-1} の VSFG バンドについて、試料滴下後の強度の時間変化を調べた (図 2B)。その結果、このバンドは、滴下から約 20 分後に急激に立ち上がり、その後一定の強度を示すことが分かった。また、同様の時間変化は、脂質由来の 1724 cm^{-1} バンドや、CH 振動領域の VSFG バンドでも観られていた。これらの時間変化は、表面圧の時間変化と完全には対応していない。以上をもとに、KR2 再構成膜のダイナミクスを議論する。

SFG 分光の原理を考えると、二重膜を形成した脂質分子は対称性が高いため、その SFG 信号は非常に弱いと予想される。試料滴下後、表面圧が上昇したにも関わらず、VSFG バンドが現れなかったことは、二重膜構造が保たれていることを反映している。一方で、滴下約 20 分後以降、脂質分子の VSFG バンドが予想に反して観られた事実は、二重膜構造が壊れたことを強く示唆している。この考察に基づく、KR2 由来の 1640 cm^{-1} バンドが同様の時間変化を示したことは、次のように解釈できる。二重膜が保たれた状態の KR2 には、そのリポソーム外側を、気体側と液体側それぞれに向けたものが、ほぼ同じ割合で存在する。このため、滴下直後には VSFG バンドが現れない。一方、二重膜構造が壊れると、KR2 の構造や配向に対する制限が小さくなり、KR2 は気水界面の誘電環境を反映した有利な向きに配向、あるいは構造を変化させる。結果、KR2 のバンドが現れる。

以上より、KR2 再構成膜が気水界面で示すダイナミクスとして、次の描像が提案される。KR2 再構成膜は、一旦水中に沈んだ後、二重膜構造を保ったまま、徐々に水上に集まる。これを反映して、表面圧が上昇する。滴下約 20 分後に二重膜構造が壊れる。この際に生じた脂質分子が気水界面で配向し、脂質由来の VSFG バンドが現れる。これを引き金に、KR2 の構造や配向が変化し、KR2 由来の 1640 cm^{-1} バンドが階段関数的に立ち上がる。表面圧がその後も上昇したことは、生じた一重膜の下部にさらに分子が集まったことを反映していると考えている。

【参考文献】 [1] K. Inoue *et al. Nature Commun.* **4**, 1678 (2013)., [2] C. Salesse *et al. Biochemistry*, **29**, 4567 (1990).,

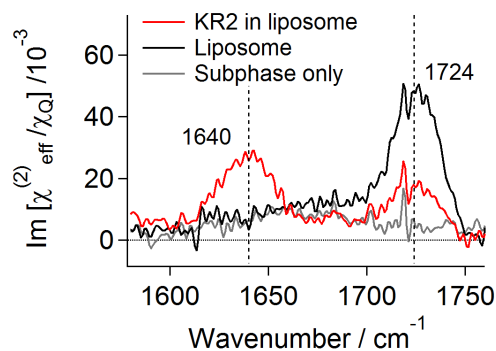


Fig. 1. HD-VSFG spectra obtained more than 30 min after adding the samples.

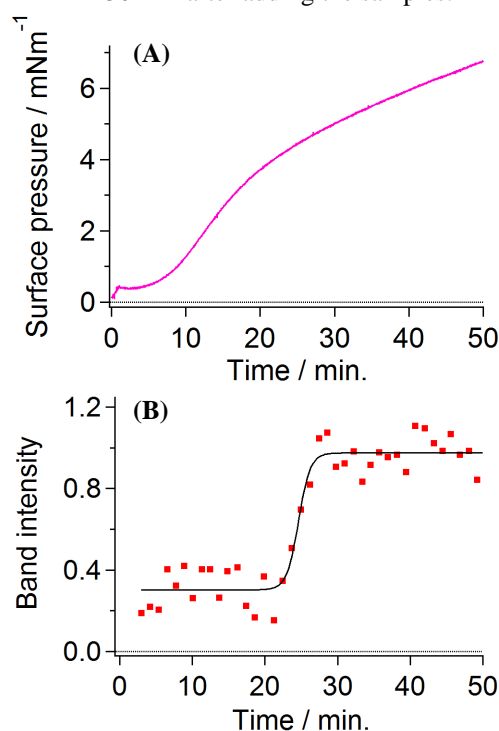


Fig. 2. Time profiles of (A) surface pressure and (B) VSFG band intensity at 1640 cm^{-1} observed after adding KR2 in liposome to buffer solution.