

光駆動型内向きプロトンポンプロドプシンの プロトン輸送メカニズムの分光研究

¹名工大院工, ²名工大オプトバイオ, ³JSTさきがけ,
⁴金沢大新学術創成, ⁵金沢大バイオAFM先端研究センター, ⁶名大院理
○井上 圭一^{1,2,3}, ・伊藤 奨太¹・加藤 善隆¹・野村 祐梨香¹・
柴田 幹大^{4,5}・内橋 貴之⁶・角田 聡^{1,3}・神取 秀樹^{1,2}

Spectroscopic study on the proton transport mechanism of light-driven inward proton pump rhodopsin

○Keiichi Inoue^{1,2,3}, Shota Ito¹, Yoshitaka Kato¹, Yurika Nomura¹, Mikihiro Shibata^{4,5},
Takayuki Uchihashi⁶, Satoshi P. Tsunoda^{1,3}, Hideki Kandori^{1,2}
¹Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Japan
²OptoBio Technology Research Center, Nagoya Institute of Technology, Japan
³PRESTO, JST, Japan
⁴Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University, Japan
⁵Bio-AFM Frontier Research Center, Kanazawa University, Japan
⁶Graduate School of Science, Nagoya University, Japan

【Abstract】 Deep-sea marine bacterium, *Parvularcula oceani*, has three types of genes of microbial rhodopsin, photo-receptive membrane protein. Here, we revealed that one of them (*PoXeR*) functions as a novel class of light-driven inward H⁺ pump. The photocycle of *PoXeR* showed deprotonated state (the M-intermediate) of the chromophore (retinal Schiff-base). FTIR spectroscopy identified cytoplasmic Asp216 as the H⁺ acceptor for retinal Schiff-base. For typical outward H⁺ pump such as bacteriorhodopsin, reprotonation of deprotonated retinal Schiff-base is governed by a H⁺ transfer from H⁺ donor. In contrast, the rate-limiting process of retinal reprotonation of *PoXeR* is second retinal isomerization from 13-*cis*-15-*anti* to 13-*cis*-15-*syn* form. That is, the pKa of retinal Schiff-base is controlled by its configuration and it is important for the vectorial inward H⁺ transport by *PoXeR*.

【序】 微生物型ロドプシンは光受容型の膜タンパク質であり、細菌や古細菌、そして一部の藻類や真菌類などの、主に単細胞微生物に幅広く分布している。全ての微生物型ロドプシンは7回膜貫通ヘリックスからなる共通構造を持ち、分子の中央に発色団として all-*trans* レチナールを結合する。その中でも最も多くの生物種が分布するのが、バクテリオロドプシン (BR) に代表される、外向きに H⁺を能動輸送する、光駆動型外向き H⁺ポンプロドプシンである。そしてこれまで数多くの研究により、これら外向き H⁺ポンプについてはその輸送メカニズムはほぼ完全に解明されている。

これに対し最近深海 800 m で発見された海洋性の細菌である *Parvularcula oceani* がゲノム中に三つの微生物型ロドプシンを有することが報告された。その内、二つの分子については、その配列から外向き Na⁺ポンプおよび内向き Cl⁻ポンプロドプシンに分類されると考えられたが、一方で *PoXeR* と名付けた三つ目の遺伝子については、既知の機能を持つロドプシンとは大きく異なるアミノ酸配列を有していた。そこで今回我々はこの *PoXeR* について新たにその機能とメカニズムについて研究を行った。

【方法 (実験・理論)】 *PoXeR* のイオン輸送活性は、大腸菌膜上にタンパク質を発現

させ、光照射時に起こる細胞外液の pH 変化を測定することで評価した。またナノ秒パルス Nd³⁺:YAG レーザーを励起光として、過渡吸収測定を行い、光反応中に現れる中間体の過渡吸収スペクトルと寿命を決定した。さらに低温フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光によって、光反応に伴う、赤外吸収スペクトル変化を測定した。

【結果・考察】 *PoXeR* を大腸菌に発現させ光を照射すると、細胞外液の pH の上昇が起こった (Fig. 1(a))。しかしここへ H⁺ の脱共役剤である CCCP を加えたところ、pH 上昇が消失したことから、*PoXeR* は細胞内側へ H⁺ を光依存的に輸送していることが示された。さらに *PoXeR* をホ乳類細胞である ND7/23 細胞に発現し、パッチクランプ測定を行ったところ、光電流が細胞内外の pH 差に依存しなかったことから、*PoXeR* は一方向的に H⁺ を細胞内へと輸送する内向きポンプであることが示された。

次に精製したタンパク質について、高速 AFM 測定を行ったところ、膜中で三量体構造を取ることが明らかになった。また過渡吸収法によって中間体の生成に伴う過渡吸収変化を測定したところ Fig. 1(b) の様に吸収波長の異なる複数の光反応中間体からなる光サイクル反応を示すことが明らかになった。この時 400 nm に吸収を持ち、レチナールの Schiff 塩基が脱 H⁺ 化した状態である M 中間体が観測された。このことから始状態でレチナールに結合していた H⁺ が輸送されることで、内向き H⁺ ポンプ機能が達成されていることが示唆された。そしてさらに FTIR 分光によって、M 中間体においてレチナールから他のロドプシンにはない細胞質側のアスパラギン酸 (Asp216, Fig. 2) への H⁺ 移動が観測された。その後この H⁺ が細胞質側に放出された後、別の H⁺ が細胞外側からレチナールに再供給されるが、このときレチナールの二段階目の異性化である 15-*anti* 型から 15-*syn* 型への変化が律速過程であることがわかった。即ち *PoXeR* は他のロドプシンにはない *anti*-to-*syn* の異性化によって Schiff 塩基の pKa を上昇させ、効率的に細胞外側から H⁺ が取り込むという。特徴的なイオン輸送機構を持っていることが明らかとなった。[1]

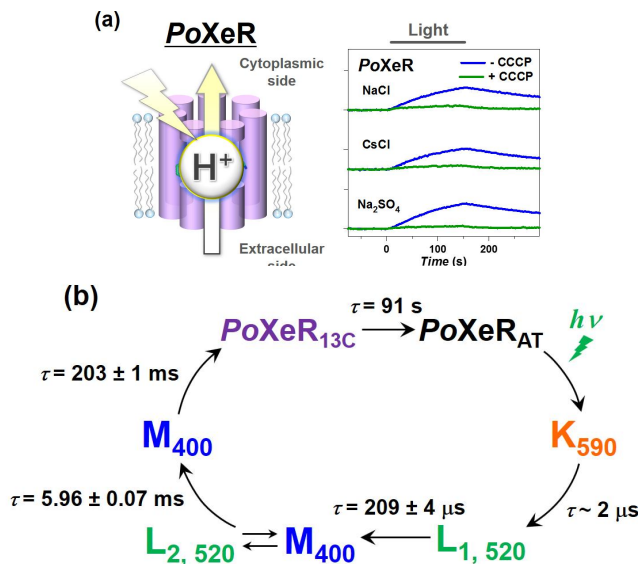


Fig. 1. (a) Inward H⁺ pump transport by *PoXeR*
(b) The photocycle of *PoXeR* determined by transient absorption measurement.

【参考文献】

[1] K. Inoue *et al.* *Nature Commun.* **7**, 13415 (2016).

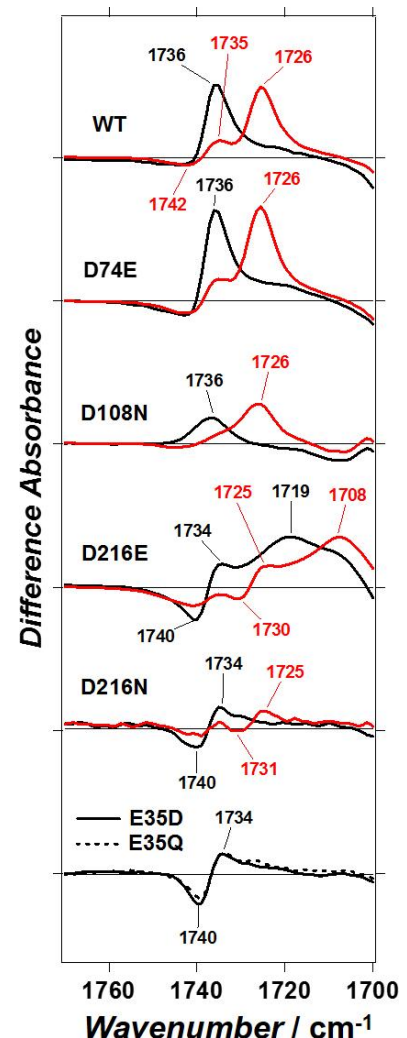


Fig. 2. FTIR difference spectra of *PoXeR* and its mutants upon the M accumulation at 1700-1770 cm⁻¹.