

ナトリウムイオンポンプの発色団構造と光駆動カチオン輸送機構

¹阪大院理, ²名工大院工
西村 尚¹, ○水野 操¹, 神取 秀樹², 水谷 泰久¹

Light-driven cation pumping mechanism of a sodium ion pump derived by its chromophore structure

Nao Nishimura¹, ○Misao Mizuno¹, Hideki Kandori² and Yasuhisa Mizutani¹
¹ Graduate School of Science, Osaka University, Japan
² Nagoya Institute of Technology, Japan

【Abstract】 *Krokinobacter* rhodopsin 2 (KR2) is a light-driven sodium ion pump. Similarly to other ion pumps, it is likely that the protonated Schiff base (PSB) in the retinal chromophore is in part of ion transport pathway. In this study, to discuss ion pumping mechanism of KR2, we measured time-resolved resonance Raman spectra of its chromophore and successfully identified the chromophore structures at every steps during the photocycle for the first time. We found that the PSB is deprotonated in the M intermediate following quite strong hydrogen-bond formation to avoid the electrostatic repulsion between positive charges on a transported sodium ion and PSB. We also noted that the polyene chain remains distortion during the whole photocycle. The polyene chain distortion controls the direction of the proton transfer, resulting in decrease of positive charge density upon deprotonation. In addition, the spectra except for the M intermediate were cation dependent, suggesting that the sodium ion locates near PSB and moves away from the chromophore only in the M intermediate.

【序】 *Krokinobacter* rhodopsin 2 (KR2) は、光駆動ナトリウムイオンポンプである[1]。タンパク質中におけるナトリウムイオンの輸送経路には、他のイオンポンプ同様、レチナル発色団のプロトン化シッフ塩基 (PSB) があると考えられている。ナトリウムイオンは、発色団付近を移動するとき、PSB 上の正電荷と静電反発を生じる。KR2 においてナトリウムイオンがどのように静電反発を避けて輸送されるかを理解するため、光サイクル反応の全段階の発色団構造を明らかにする必要がある。本研究でわたしたちは、KR2 のレチナル発色団の時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定した。光サイクルに現れるすべての中間体の過渡共鳴ラマンスペクトルをはじめて観測し、各段階での発色団構造を同定した。また、光サイクルにおけるスペクトルのカチオン依存性を調べ、タンパク質中のナトリウムイオンの結合サイトについて議論した。

【実験方法】 KR2 は大腸菌中で発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。時間分解共鳴ラマン測定では、ナトリウムイオンを含む緩衝液 (pH 8.0) に界面活性剤をもちいて可溶化した試料をフローセルで循環させた。ポンプ光には、波長 514.5 nm または 532 nm の光をもちいた。プローブ光には、それぞれ中間体の吸収に共鳴する波長の光 (未反応状態・K 中間体 532 nm、L 中間体 475 nm、M 中間体 405 nm、O 中間体 594 nm) をもちいた。プローブ光波長および遅延時間は、時間分解吸収測定を行い、それぞれ各中間体の吸収バンドおよび吸光度変化から決定した。

【結果と考察】 Fig. 1 に、光サイクル全段階の過渡共鳴ラマンスペクトルを示す。レチナル発色団の構造を議論するために、構造マーカーである 1610–1660 cm⁻¹ に現れ

る C=N 伸縮振動バンド、および 800–1000 cm^{-1} に現れるポリエン鎖の C-H 面外 (hoop) 振動バンドに注目した。PSB における C=N 伸縮振動は、N-H 変角振動と強くカップルするため、その振動数は PSB での水素結合強度に敏感である。水素結合が強いと、C=N 伸縮振動数は高くなり、また重水素置換による低波数シフトが大きいことが知られている[2]。KR2 では、C=N 伸縮振動バンドが、M 中間体を除くすべての状態で、振動数が高く、かつ重水素置換により大きく低波数シフトした。一方、M 中間体では、重水素置換による低波数シフトが観測されなかった。これらのことから、PSB では強い水素結合が形成され、M 中間体での PSB の脱プロトン化を促進することが示唆された。また、すべての状態で、多くの hoop 振動バンドが観測された。これは、これまでに測定された微生物型ロドプシンの光サイクルではみられず、KR2 のスペクトルに特徴的であった。振動モードの帰属[3]より、観測されたバンドは PSB に近い部位における hoop 振動によるものであることがわかった。hoop 振動の共鳴ラマンバンドは、ポリエン鎖がねじれているときのみに強度増大する。このため、KR2 は光サイクルを通じて PSB 付近のポリエン鎖がねじれた構造をとっていることがわかった。

さらに、M 中間体を除くすべての状態において、C=C および C=N 伸縮振動数にカチオン依存性がみられた。これは、シッフ塩基がプロトン化していても、ナトリウムイオンの結合サイトが PSB 付近にあることを示している。一方、カチオン依存性を示さない M 中間体では、ナトリウムイオンが PSB から遠ざかることが示された。

本研究において、M 中間体で脱プロトン化が起きていること、ポリエン鎖がねじれていることが明らかになった。ナトリウムイオンが PSB 付近を通過するとき起こる静電反発を避けるためには、PSB の脱プロトン化が必須である。これに加えて、PSB からのプロトン移動の向きが重要であると考えられる。それは、KR2 では PSB の脱プロトン化におけるプロトンアクセプターが、プロトンポンプタンパク質とは異なる方向にある Asp116 残基であると結晶構造[4]から考えられているからである。本研究で得られた結果より、ポリエン鎖のねじれが、PSB からのプロトン移動の向きをコントロールするという機構を提案する。

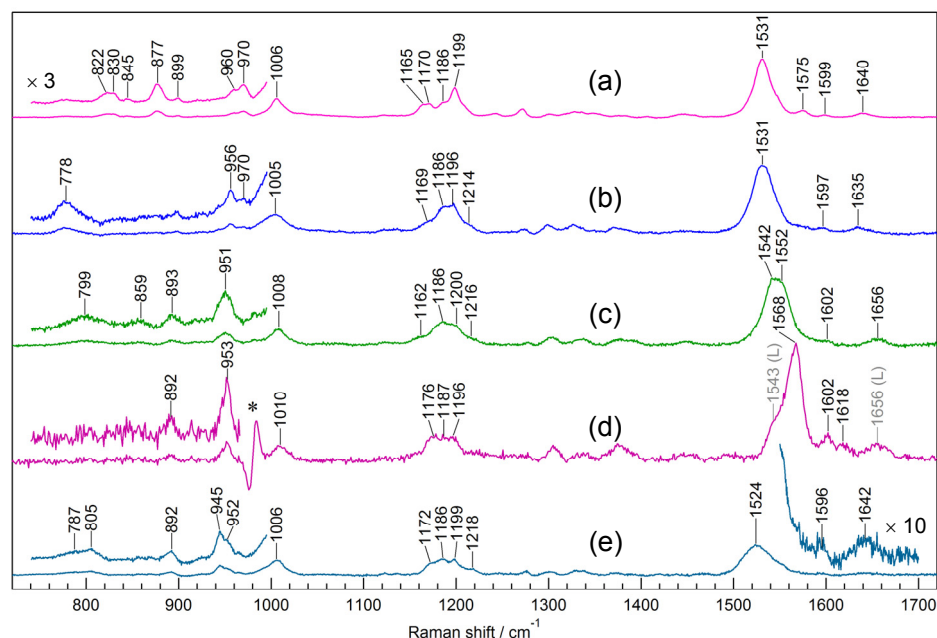


Fig. 1 Transient resonance Raman spectra of KR2. (a) Unphotolyzed state, (b) K (delay time < 20 ns), (c) L (delay time 80 μs), (d) M (delay time 100 μs), and (e) O (delay time 1 ms) intermediates. Spectra in the 740–1000 cm^{-1} region for all the states and in 1540–1700 cm^{-1} region for O are multiplied by 3 and 10, respectively. The asterisk represents the band of sulfate ion added as an internal intensity standard.

【参考文献】 [1] Inoue *et al.* *Nat. Commun.* **4**, 1678 (2013). [2] Baasov *et al.* *Biochemistry* **26**, 3210 (1987). [3] Smith *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3108 (1987); Smith *et al.* *J. Phys. Chem.* **91**, 804 (1987). [4] Kato *et al.* *Nature* **521**, 48 (2015); Gushchin *et al.* *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 390 (2015).