

## 光駆動型ナトリウムイオン輸送タンパク質KR2の イオンに依存した立体構造の違い

<sup>1</sup>阪大院理, <sup>2</sup>名工大院工

○大友 章裕<sup>1</sup>, 水野 操<sup>1</sup>, 井上 圭一<sup>2</sup>, 神取 秀樹<sup>2</sup>, 水谷 泰久<sup>1</sup>

### Ion-dependent structural changes of light-driven sodium ion pump KR2

○Akihiro Otomo<sup>1</sup>, Misao Mizuno<sup>1</sup>, Keiichi Inoue<sup>2</sup>, Hideki Kandori<sup>2</sup>, Yasuhisa Mizutani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate school of science, Osaka University, Japan

<sup>2</sup> Graduate school of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Japan

**【Abstract】** *Krokinobacter* rhodopsin2 (KR2) functions as a light-driven Na<sup>+</sup> pump in the presence of Na<sup>+</sup> while works as a H<sup>+</sup> pump in the absence of Na<sup>+</sup> or Li<sup>+</sup>. Thus, KR2 transports different ions depending on the cation concentration. So far, changes in protein structures in response to the cation concentration changes have not been clarified. Here we investigated the structure of KR2 in a wide range of Na<sup>+</sup> concentrations using absorption spectroscopy, visible and ultraviolet resonance Raman spectroscopy and size exclusion chromatography. KR2 showed a characteristic absorption maximum wavelength shift with two different dissociation constants as Na<sup>+</sup> concentration increased. In this presentation, we discuss the formation of oligomeric KR2 and the structural change of retinal chromophore depending on Na<sup>+</sup> concentration which leads to the characteristic shift of absorption maximum wavelength.

**【序】** 光駆動型ナトリウムイオンポンプ KR2 は、Na<sup>+</sup>あるいはLi<sup>+</sup>存在下では、これらのイオンを輸送するのに対し、非存在下では H<sup>+</sup>を輸送する。このように、KR2 は溶媒環境に応じて異なるイオンを輸送するが、そのイオンに依存したタンパク質構造の違いは明らかになっていない。本研究では、可視・紫外共鳴ラマン分光法、可視吸収分光法およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いて、広範囲の Na<sup>+</sup>濃度 (0–1000 mM) 中における KR2 の構造について詳細に調べた。KR2 は Na<sup>+</sup>濃度が上昇するにつれて、異なる 2 つの解離定数を持つ二段階の吸収極大波長のシフトを示した。本発表では、この特徴的な吸収極大波長のシフトを導く、Na<sup>+</sup>濃度に依存した KR2 の多量体構造形成とレチナル発色団の構造変化について議論する。

**【方法 (実験)】** 大腸菌中で発現した KR2 を、カラムクロマトグラフィーにより精製し、界面活性剤を用いて可溶化した。可溶化した KR2 を、限外ろ過によって様々な濃度の Na<sup>+</sup>を含む緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) へと交換し、測定用試料とした。各 Na<sup>+</sup>濃度における KR2 の分子量は SEC カラムを用いて決定した。可視共鳴ラマンスペクトル測定には、波長 532 nm の連続光を、紫外共鳴ラマンスペクトル測定には、波長 233 nm のパルス光をプローブ光としてそれぞれ用いた。

**【結果・考察】** Fig. 1 に、KR2 の吸収極大波長の Na<sup>+</sup>濃度依存性を示す。KR2 の吸収極大波長は、Na<sup>+</sup>濃度の増加に伴い 0 から 10 mM において短波長側へ、10

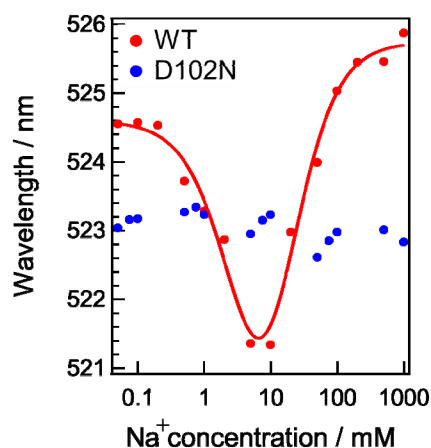


Fig. 1 Plots of absorption maximum wavelengths of WT and D102N against Na<sup>+</sup> concentration.

から 1000 mM において長波長側へシフトした。ヒル関数でこれらをフィッティングした結果、2つの解離定数 (3.8, 15.5 mM) を得た。次に、KR2 の会合状態を調べるために、各 Na<sup>+</sup>濃度における分子量を SEC によって測定した。試料を SEC カラムに通すと、試料とカラム内の充填剤との相互作用によって、分子量の大きなものから順に溶出されるため、溶出時間から分子量を見積もることができる。SEC で得られた分子量から、KR2 は、Na<sup>+</sup>が 0 mM のときには単量体を、10 mM のときには主に三量体を形成していることが明らかとなった。したがって、吸収極大の短波長シフトは、単量体と三量体の違いに由来すると考えられる。興味深いことに、一度単量体化した KR2 に Na<sup>+</sup>を加えても、吸収極大のシフトおよび三量体の形成は観測されず、三量体から単量体の変化は不可逆であることが示唆された。

KR2 には、複数のアミノ酸残基からなる Na<sup>+</sup>結合部位が存在する[1]。この結合部位を構成するアミノ酸のうち、102 位のアスパラギン酸をアスパラギンへと置換させた D102N 変異体を用いて同様の実験を行った。この変異体では、Na<sup>+</sup>は KR2 に結合しないことが報告されている[2]。D102N では、野生型で観測された Na<sup>+</sup>濃度に依存した吸収極大の波長シフトは観測されず (Fig. 1)、また、SEC から常に三量体を形成していることがわかった。このことは、野生型で観測された 10 から 1000 mM への Na<sup>+</sup>濃度増加に伴う吸収極大の長波長シフトは、イオン結合部位への Na<sup>+</sup>の結合に由来することを示唆する。長波長シフトから見積もられた解離定数 15.5 mM が、過去に報告された Na<sup>+</sup>結合部位の解離定数 11.4 mM[3]とほぼ一致することもこの考えを支持する。

次に、様々な Na<sup>+</sup>濃度におけるレチナール発色団の構造を調べるために、KR2 の可視共鳴ラマンスペクトルを測定した。Fig. 2 に Na<sup>+</sup>濃度が異なる条件 (1 mM または 10 mM) における野生型と D102N のラマンスペクトルを示す。(A) は、ポリエーニ鎖における hydrogen-out-of-plane (HOOP) バンドを、(B) はシッフ塩基の C=N 伸縮振動バンドをそれぞれ表す。2つの Na<sup>+</sup>濃度間において、野生型では HOOP バンドの強度および C=N 伸縮振動バンドのバンド幅が異なっていた。一方、D102N では両バンドともに大きな差は観測されなかった。HOOP バンドは、レチナール発色団のポリエーニ鎖のねじれに関するマーカーバンドである。野生型で Na<sup>+</sup>濃度 1 mM と 10 mM において、HOOP バンドが変化したことは、単量体と三量体とでレチナール発色団のねじれ状態が変化していることを意味する。C=N 伸縮振動バンドは、シッフ塩基が形成している水素結合の強さを反映する。Na<sup>+</sup>濃度 1 mM でのバンド幅が大きいことから、単量体ではシッフ塩基まわりの構造が不均一であることが示唆された。

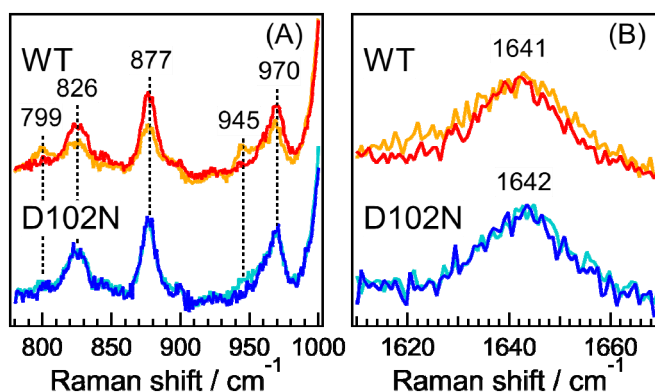


Fig. 2 Visible RR spectra of KR2 in 1 and 10 mM NaCl. The traces are for WT in 1 mM (orange) and 10 mM (red), D102N in 1 mM (cyan) and 10 mM (blue). Panel A and B shows the regions of HOOP and C=N stretching bands, respectively.

KR2 のレチナール発色団は、光駆動 H<sup>+</sup>ポンプであるバクテリオロドプシン (BR) と比較すると、ポリエーニ鎖のねじれが大きいことが結晶構造より報告されている[1, 2]。KR2 では、シッフ塩基からの H<sup>+</sup>アクセプターとして働くアミノ酸残基のシッフ塩基に対する相対位置が BR とは異なっており、ポリエーニ鎖のねじれによって、レチナール発色団が H<sup>+</sup>移動に最適な構造を調節していると考えられる。本研究より、H<sup>+</sup>移動を促すポリエーニ鎖のねじれが三量体形成によって生じることが明らかになった。

## 【参考文献】

- [1] I. Gushchin, *et al. Nat. Struct Mol Biol.* **22**, 390-395 (2015). [2] H. Kato, *et al. Nature* **521**, 48-53 (2015).  
 [3] K. Inoue, *et al. Nat. Commun.* **4**, 1678 (2013).