

異なる環境下における光駆動ナトリウムイオンポンプの安定性

¹阪大院・理, ²名工大院・工, ³東大・物性研○大友章裕¹, 水野操¹, 吉住玲², 井上圭一³, 神取秀樹², 水谷泰久¹

Factors influencing oligomeric stability of light-driven sodium ion pump

○Akihiro Otomo¹, Misao Mizuno¹, Rei Abe-Yoshizumi², Keiichi Inoue³,
Hideki Kandori², Yasuhisa Mizutani¹¹ Graduate School of Science, Osaka University, Japan² Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Inst. Tech., Japan³ The Institute of Solid State Physics, The University of Tokyo, Japan

【Abstract】 *Krokinobacter* rhodopsin 2 (KR2) is the first light-driven Na⁺ pump rhodopsin reported. KR2 is a family of membrane proteins. For the spectroscopic studies on membrane proteins, solubilized samples by detergent have been in common use. We have revealed that the solubilized KR2 shows the monomerization ($K_d = 4.1$ mM) upon decreasing [Na⁺] based on resonance Raman spectra of the retinal chromophore of KR2. In this study, we investigated the [Na⁺] dependence on KR2, which reconstituted in nanodiscs. In contrast to the solubilized KR2, KR2 reconstituted in nanodiscs did not show the oligomeric transition and kept the oligomer. It is known that KR2 forms oligomer in the lipid bilayers. Thus, these results demonstrate that the oligomeric stability of KR2 in detergent is lower than that in the physiological environment.

【序】 *Krokinobacter* rhodopsin 2 (KR2) は光駆動 Na⁺ポンプとして初めて報告されたタンパク質である。KR2は膜タンパク質である。膜タンパク質の分光研究には主に界面活性剤によって可溶化された試料が用いられてきた。われわれはこれまでに、KR2のレチナル発色団の共鳴ラマンスペクトル測定より、可溶化されたKR2がNa⁺濃度の減少に伴い、単量体化することを明らかにした ($K_d = 4.1$ mM) [1]。今回あらたに、KR2をナノディスクへ再構成した試料を用いて、そのNa⁺濃度依存性を調べた。再構成したKR2では、Na⁺濃度によって会合状態は変化せず、多量体を維持していた。KR2は脂質二重膜リポソーム中では多量体を形成して機能していることが報告されている[2]。今回の結果は、界面活性剤中ではKR2の多量体安定性が天然の環境下に比べて低くなることを示している。

【方法】 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。可溶化されたKR2にリン脂質アズレクチンと膜骨格タンパク質を加えた後、バイオビーズを用いて界面活性剤を除去することで、ナノディスク再構成試料を得た。可溶化試料、再構成試料ともに透析によって様々な濃度のNa⁺を含むタンパク質溶液を調製し、測定用試料とした。共鳴ラマンスペクトル測定には、波長 532 nm の連続光をプローブ光として用いた。

【結果・考察】 図1に100 mMのNa⁺を含む緩衝液中における、再構成したKR2(赤)および可溶化されたKR2(青)の共鳴ラマンスペクトルを示す。スペクトルには、レチナル発色団に由来するラマンバンドが観測された。各バンドの振動数や強度は両者でほとんど変わらなかったことから、100 mMのNa⁺存在下ではKR2の構造は周辺環境の影響を受けないことがわかった。

図2は0.1 – 500 mMの広範囲のNa⁺存在下における共鳴ラマンスペクトル測定によ

って得られた C=C 伸縮振動バンドの振動数と C=N 伸縮振動バンドの振動数の Na⁺濃度依存性である。

C=C 伸縮振動バンドの振動数 (A) は、可溶化試料 (青三角) では Na⁺濃度に依存して 2 段階の変化を示したのに対し、再構成試料 (赤丸) では、10 – 500 mM の Na⁺濃度領域でのみ変化した。可溶化した KR2 は Na⁺濃度の減少に伴い $K_d = 4.1$ mM で単量体化する[1]。したがって、図 2 (A) で観測された 0.1 – 10 mM の Na⁺濃度領域での振動数シフトは、会合状態の変化を反映していると考えられる。このシフトが再構成試料では観測されなかったことから、脂質中の KR2 は Na⁺濃度の変化に対して多量体構造を保つことが示唆される。

C=N 伸縮振動バンドの振動数 (B) は、KR2 の状態によらずよく似た変化を示した。このバンドの振動数変化はいずれも約 20 mM の K_d 値をもっており、過去の研究との比較からサブユニット界面に存在するカチオン結合部位へのカチオンの結合・解離を反映していると考えられる[3]。この振動数は、発色団のシッフ塩基が形成する水素結合の強さを反映する。したがって、サブユニット界面で生じるカチオンの結合・解離はサブユニット内部にある発色団に対して構造変化を誘起していることがわかる。また、2 種類の試料の間で振動数変化に差はなかったことから、カチオン結合部位の解離平衡は、周辺環境の影響を受けないことがわかった。

本研究では、界面活性剤で可溶化された KR2 は、高濃度の Na⁺存在下では脂質中と同様の濃度応答を示したのに対して、Na⁺濃度が低い場合にはその安定性を低下させることを示した。KR2 が機能する生理的な Na⁺濃度は 10 mM オーダーである。すなわち今回の結果は、天然とは異なる環境下では、可溶化による膜タンパク質の安定性を十分考慮する必要があることを示している。

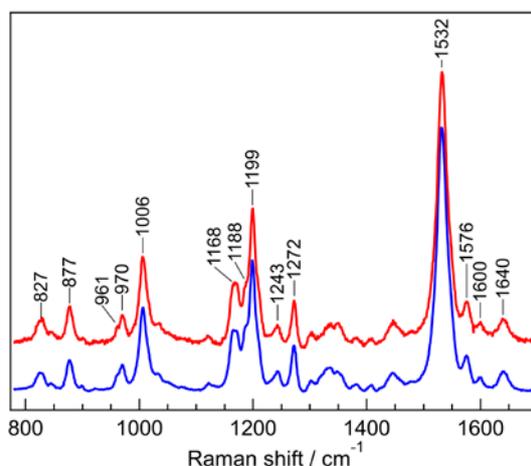


Fig. 1 Resonance Raman spectra of KR2 in 100 mM NaCl. Red and blue traces represent the reconstituted KR2 with nanodiscs and the solubilized KR2, respectively.

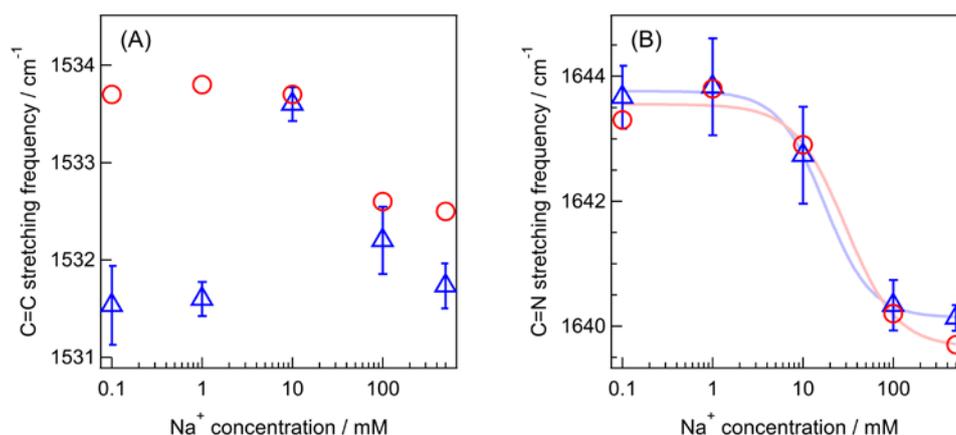


Fig. 2 Plots of (A) C=C and (B) C=N stretching frequency against Na⁺ concentration. Red circles and blue triangles represent the band frequency of the reconstituted KR2 and the solubilized KR2, respectively. The light-red and light-blue lines show the fitting results by Hill equation. Bars represent standard deviation (n=3).

【参考文献】

[1] 大友ら, 第11回分子科学討論会, 2P077 (2017). [2] M. Shibata, *et al. Sci. Rep.* **8**, 8262 (2018). [3] K. Inoue, *et al. Nat. Commun.* **4**, 1678 (2013).