

Interaction between Na^+ ion and carboxylates of the PomA-PomB stator unit studied by ATR-FTIR spectroscopy

Yuki Sudo, Yuya Kitade, Yuji Furutani, Masaru Kojima, Seiji Kojima, Michio Homma & Hideki Kandori

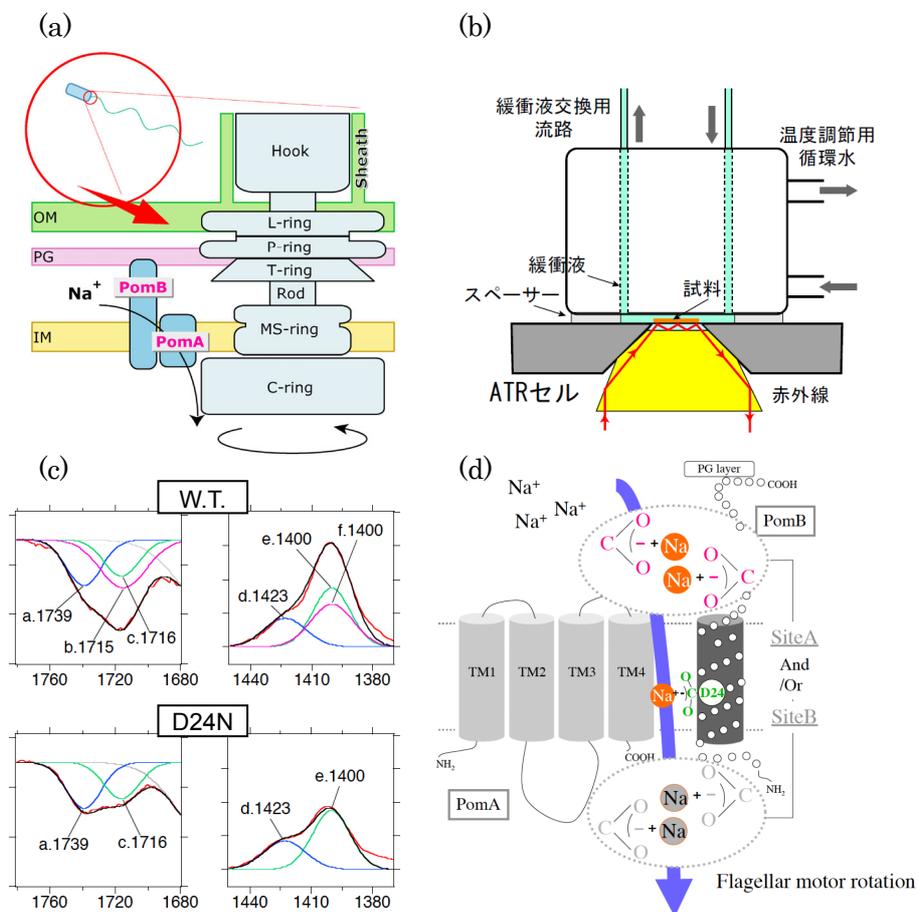
Biochemistry, 2009, 48 (49), 11699-705.

須藤雄気^{1,2}、北出祐也³、古谷祐詞^{3,#}、小嶋勝¹、小嶋誠司¹、本間道夫¹、神取秀樹³

(¹名大・院理、²さががけ・JST、³名工大・院工、[#]現所属;分子研・生命錯体)

【研究の目的・背景】

べん毛の回転モーターは複数のサブユニットからなる巨大な超分子複合体を形成している。PomA/PomB 複合体は、イオンチャネルを構成し、イオンの流れを回転運動に変換する(図 a)。菌体の移動速度などの機能解析から PomB の膜貫通ドメインに存在する Asp24 が Na^+ イオンの輸送に重要であると考えられてきたが、構造情報の不足から実際にイオンを結合するのかわ不明であった。本研究では、試料が液中に浸された状態での計測も可能な全反射型赤外分光計測を駆使して、 Na^+ イオンと PomA/PomB タンパク質との相互作用について分光学的研究を行った。



【実験方法】

PomA/PomB 複合体タンパク質を *V. alginolyticus* で発現し、界面活性剤で可溶化した後に、*E. coli* polar lipids と混合し、透析により界面活性剤を除去して脂質二重膜に再構成した。5 μ L の試料(タンパク質濃度;約 1mg/ml)を ATR セル上に乗せ、 N_2 ガスにより乾燥させた後、図 b のように恒温セルを組み立て、緩衝液(50 mM BisTris(pH5.5))で膨潤および洗浄した。その後、NaCl を含む緩衝液と含まない緩衝液を交互に試料に流しながら、それぞれの状態における赤外吸収スペクトルを計測し、差スペクトルを計算した。また、試料が存在しない条件下での差スペクトルも計測し、NaCl の水和による影響や、緩衝剤である BisTris 由来の信号などを除去し、最終的なイオン結合誘起赤外差スペクトルを得た。

【実験結果と考察】

図 c は、 Na^+ イオン非存在下でのプロトン化カルボン酸の COOH 基の振動と Na^+ イオン存在下での解離したカルボン酸の COO^- 基の振動を捉えたものである。バンド分解により、D24N 変異体において b. 1715 および f. 1400 のバンドが消失していることが分かり、これらのバンドが Asp24 に由来すると結論づけた。また、NaCl 濃度を 5, 10, 20, 50, 100, 200 mM と変えて行った実験から、その結合定数は 85~98 mM であり、菌体の遊泳速度の K_m 値である 78 mM に近い値であることが分かった。同様の解析により、D24N 変異体においても存在する2つのカルボン酸は、 Na^+ への結合定数が 117-142mM 程度であることがわかった。この2つのカルボン酸は、PomA/PomB に存在する Asp24 以外の Asp および Glu(総数 80 個)の中で、おそらく Na^+ イオンをチャンネルへと集めるフィルターの役割を果たしているものに由来するのではないかと考えられる(図 d)。疎水的な膜貫通ドメインへ Na^+ イオンを透過させるために必須な Asp24 だけでなく、 Na^+ イオンを集めるアンテナのような役割をする Asp もしくは Glu の働きにより、高効率なイオン流から回転運動へのエネルギー変換がなされているものと推測される。

【今後の展望】

イオン結合誘起赤外差スペクトル法は、膜タンパク質におけるイオン結合部位の構造情報を抽出できる有望な計測系である。現在は、平成 19, 20 年度公募班であった村田武士博士(千葉大学・院理)との共同研究として V 型 ATPase の Na^+ および Li^+ イオン結合の解析を進めているところである。

【追記】

本研究は、A01 班計画班員の本間道夫(名大・院理)と、A01 班公募班員(平成 19, 20 年度および平成 21, 22 年度)の古谷祐詞(分子研・生命錯体)との共同研究によってなされたものである。