

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18519

研究課題名(和文) 高度好熱菌ロドプシンにおける構造安定性の追求

研究課題名(英文) Understanding the mechanism of structural stability for thermophilic rhodopsin

研究代表者

塚本 卓 (Tsukamoto, Takashi)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：30744271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らが高度好熱菌から初めて発見した、光受容体タンパク質・サーモフィリックロドプシン(TRと略)について、(1)TRの高い熱安定性を生み出す構造的要因を明らかにすること、(2)熱以外のさまざまな物理的・化学的刺激に対する構造安定性を調べることを目的として研究を行った。

目的(1)について、可視吸収分光法、X線結晶構造解析法、分子動力学計算法を併用し、TRの構造は分子内部で形成される疎水性相互作用によって高く安定化されていることを明らかにした。目的(2)について、種々の化学物質による構造安定性への影響を網羅的に評価し、熱安定性との相関を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research was carried out for a photoreceptor protein called thermophilic rhodopsin (abbreviated as TR), which we have discovered from a thermophilic bacterium for the first time in 2013, (1) to reveal the structural factor for the high thermal stability of TR, and (2) to evaluate the structural stability against some physical and chemical stimuli other than heat. For the purpose (1), it was revealed that TR was highly stabilized by hydrophobic interactions inside the protein by combining the analyses of UV-Vis absorption spectra, X-ray crystallography, and molecular dynamics simulation. For the purpose (2), the exhausted evaluation for the structural stability by using some chemical reagents revealed the correlation between the mechanism for stabilizing the TR structure against heat and that against some chemical stimuli.

研究分野：生物物理学

キーワード：ロドプシン 膜タンパク質 イオンポンプ 構造安定性 高度好熱菌

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析によって、レチナールを発色団とする光受容膜タンパク質・ロドプシンが、微生物から動物まで幅広く、数多く存在することがわかってきた。2013年、研究代表者らは、約75°Cの温泉に生息する高度好熱菌 (*Thermus thermophilus* JL-18株) から初めてロドプシンを発見し、サーモフィリックロドプシン (thermophilic rhodopsin ; TRと略) と命名した。TRは、既知のロドプシンと比べて40°C以上も熱安定性が高く、75°Cで4時間熱してもほとんど失活しない (Tsukamoto et al. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 21581-21592.)。

なぜTRは熱に対して安定なのか、そのメカニズムは未解明であった。また、熱以外の刺激に対する安定性についても未解明であった。こうした性質を明らかにすることにより、タンパク質構造を安定化する一般的な方法を確立したいと考えた。さらに、TRの安定性を利用し、通常のタンパク質では難しい過酷な条件下での計測や、材料応用に向けた研究の発展が期待された。加えて、近年、脳神経科学分野で汎用されている、細胞応答を光で制御する技術 (光遺伝学) に対して、TRを利用することをめざした。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) TRの高い熱安定性を生み出す構造的要因を明らかにすること、(2) 熱以外のさまざまな物理的・化学的刺激に対する構造安定性を調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究試料は、大腸菌を宿主とする組換えタンパク質発現系を用いて発現・精製したものをを用いた。活性型のTR試料は、530 nmの緑色光を吸収するため、見た目には赤色に呈色する。一方、不活性型のTRは、緑色光の吸収を失うため、見た目の色は透明に近づく。この性質を利用し、刺激を加えた前後の

吸収の変化、あるいは加えた後の吸収の減衰を、紫外可視吸収分光法を用いて観測することにより、安定性を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 高い熱安定性を生む構造的要因の解明

高い熱安定性を生み出す構造的要因を探るため、X線結晶構造解析法によりTRの立体構造を行った。良好な結晶およびX線回折データを取得することができ、2.8Åの分解能でTRの立体構造を決定した (下図)。得られた立体構造から、TRは細胞外側領域に疎水性アミノ酸が密集するコア構造を形成することがわかった。さらに、構造データを利用し、分子動力学計算によって、高温環境におけるTRの構造変化をシミュレーションした。その結果、過渡的な疎水性コア構造の形成が確認された。一方、これまでに実施した可視吸収を用いて測定した熱安定性評価の実験から、TRは疎水性相互作用に代表されるエントロピー的な作用により、構造が安定化されていることが示されている (Tsukamoto et al. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 21581-21592.)。以上の結果より、TRの高い熱安定性を生み出す構造的要因は、分子内の疎水性コア構造が作り出す疎水性相互作用であると結論した (Tsukamoto et al. (2016) *J. Biol. Chem.* 291, 12223-12232.)。

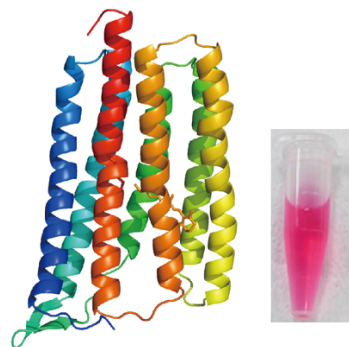


図. TRの立体構造 (左; PDB ID 5AZD) と精製TR試料 (右)

TRのような高い安定性を示すロドプシン分子を探索した。その中で、熱水処理施設より単離された *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941<sup>T</sup>株より、新規プロトンポンプ型ロドプシン RxR を発見した。RxR は、細菌のプロトンポンプ型ロドプシンであるにも関わらず、進化系統的に古細菌のものと類似している特徴を持っていた。RxR の熱安定性を TR と同じ方法で計測したところ、RxR は TR の約 16 倍も安定であることがわかった (Kanehara et al. (2017) *Sci. Rep.* 7, 44427.)。

### (2) 化学的刺激に対する構造安定性の調査

熱以外の刺激に対する TR の安定性を評価するため、ヒドロキシルアミン (HA)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、エタノールを添加した後の可視吸収の変化を計測した。HA は疎水性の TR 分子内部へ侵入し、レチナールを脱離させる試薬として、SDS はタンパク質構造を崩壊させる試薬として、エタノールは TR 内部の水分子の影響を調べる試薬として使用した。さらに、TR に加えて 4 種類の微生物型ロドプシンを用いて、網羅的な解析を行った。

それぞれの試薬を加えた後の吸収変化の解析から、熱に対する安定性と SDS に対する安定性に正の相関が見られた。このことは、TR が疎水性相互作用によって強く安定化されていることを反映するものであると結論した。一方、HA やエタノールに対する安定性と、熱に対する安定性との間には、有意な相関は見られなかった。このことから、個別の刺激に対しては安定性が異なっていることが示唆された (Honda et al. (2017) *Chem. Phys. Lett.* 682, 6-14.)。

### (3) その他

本研究課題に付随して、新規ロドプシンの探索・物性研究を実施した (Nakajima et al.

(2018) *Microbes. Environ.* 33, 89-97; Inoue et al. (2017) *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 3172-3183; Niho et al. (2017) *J. Am. Chem. Soc.* 139, 4376-4389; **Tsukamoto\*** et al. (2017) *J. Phys. Chem. B* 121, 2027-2038; Doi et al. (2017) *Sci. Rep.* 7, 41879.)

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件、査読あり)

1. Nakajima, Y., **Tsukamoto, T.**, Kumagai, Y., Ogura, Y., Hayashi, T., Jaeho, S., Kikukawa, T., Demura, M., Kogure, K., Sudo, Y., Yoshizawa, S. (2018) “Presence of a Haloarchaeal Halorhodopsin-Like Cl<sup>-</sup> Pump in Marine Bacteria” *Microbes. Environ.* 33, 89-97.
2. Inoue, S., Yoshizawa, S., Nakajima, Y., Kojima, K., **Tsukamoto, T.**, Kikukawa, T., Sudo, Y. (2017) “Spectroscopic characteristics of *Rubricoccus marinus* xenorhodopsin (RmXeR) and a putative model for its inward H<sup>+</sup> transport mechanism” *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 3172-3183.
3. Honda, N., **Tsukamoto, T.**, Sudo, Y. (2017) “Comparative evaluation of the stability of seven-transmembrane microbial rhodopsins to various physicochemical stimuli” *Chem. Phys. Lett.* 682, 6-14.
4. Niho, A.<sup>†</sup>, Yoshizawa, S.<sup>†</sup>, **Tsukamoto, T.<sup>†</sup>**, Kurihara, M., Tahara, S., Nakajima, Y., Mizuno, M., Kuramochi, H., Tahara, T., Mizutani, Y., Sudo, Y. (2017) “Demonstration of a Light-Driven SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Transporter and Its Spectroscopic Characteristics” *J. Am. Chem. Soc.* 139(12), 4376-4389. (†同等の筆頭)
5. **Tsukamoto, T.\***, Yoshizawa, S., Kikukawa, T., Demura, M., Sudo, Y. (2017)

- “Implications for the Light-Driven Chloride Ion Transport Mechanism of *Nonlabens marinus* Rhodopsin 3 by Its Photochemical Characteristics” *J. Phys. Chem. B* 121(9), 2027-2038. (\*責任著者)
6. Kanehara, K., Yoshizawa, S., **Tsukamoto, T.**, Sudo, Y. (2017) “A phylogenetically distinctive and extremely heat stable light-driven proton pump from the eubacterium *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941<sup>T</sup>” *Sci. Rep.* 7, 44427.
  7. Doi, S., **Tsukamoto, T.**, Yoshizawa, S., Sudo, Y. (2017) “An inhibitory role of Arg-84 in anion channelrhodopsin-2 expressed in *Escherichia coli*” *Sci. Rep.* 7, 41879.
  8. **Tsukamoto, T.**, Mizutani, K., Hasegawa, T., Takahashi, M., Honda, N., Hashimoto, N., Shimono, K., Yamashita, K., Yamamoto, M., Miyauchi, S., Takagi, S., Hayashi, S., Mutara, T., Sudo, Y. (2016) “X-ray Crystallographic Structure of Thermophilic Rhodopsin: Implications for High Thermal Stability and Optogenetic Function” *J. Biol. Chem.* 291, 12223-12232.

〔学会発表〕(計 7 件、抜粋)

1. **塚本卓**, 菊地ちひろ, 鈴木拓, 相沢智康, 菊川峰志, 出村誠 “塩濃度に依存したアニオンチャネルロドプシンの光化学的性質の変化” 日本生物物理学会北海道支部例会(2018年3月17日、札幌市)
2. **Tsukamoto, T.**, Yoshizawa, S., Kikukawa, T., Demura, M. “Light-driven Cl<sup>-</sup> transport mechanism of *Nonlabens marinus* rhodopsin-3 studied by static and time-resolved spectroscopy” 日本生物物理学会第 55 回年会 (2017 年 9 月 19-21 日、熊本市)
3. **塚本卓** “好熱性バクテリアのレチナールタンパク質: 発見と物性解析のこれまでとこれから” 第 54 回日本生化学会北

海道支部例会 (招待講演、2017 年 7 月 7 日、札幌市)

4. **Tsukamoto, T.**, Yoshizawa, S., Kikukawa, T., Demura, M., Sudo, Y. “Cl<sup>-</sup>-pumping photoreaction of a bacterial halide-ion pumping rhodopsin with an archaeal-type TSA motif”, 日本生物物理学会第 54 回年会 (2016 年 11 月 25-27 日、つくば市)
5. **Tsukamoto, T.**, Mizutani, K., Hasegawa, T., Takahashi, M., Honda, N., Hashimoto, N., Shimono, K., Miyauchi, S., Takagi, S., Hayashi, S., Murata, T., Sudo, Y. “Structural basis for high thermal stability and efficient optogenetic function of thermophilic rhodopsin”, 日本生物物理学会第 54 回年会 (2016 年 11 月 25-27 日、つくば市)
6. **塚本卓**, 本田尚也, 西川佳吾, 林重彦, 村田武士, 須藤雄気 “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来サーモフィリックロドプシンの物性研究”, 日本生物物理学会中四国支部講演会 (2016 年 5 月 28-29 日、高松市)
7. **Tsukamoto, T.**, Mizutani, K., Takahashi, M., Hasegawa, T., Hashimoto, N., Hayashi, S., Takagi, S., Murata, T., Sudo, Y. “X-ray Crystal Structure of TR: Implications for High Thermal Stability and High-Performance Optogenetic Availability”, 日本生物物理学会第 53 回年会 (2015 年 9 月 13-15 日、金沢市)

〔図書〕(計 1 件)

1. **塚本卓**, 須藤雄気 (2015) “好熱性細菌のレチナールタンパク質” *生物物理*, vol. 55, 92-94, 日本生物物理学会.

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/infana/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

塚本 卓 (TSUKAMOTO, Takashi)  
北海道大学・先端生命科学研究院・助教  
研究者番号：30744271