

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07326

研究課題名(和文) 光駆動型ナトリウムポンプ：イオン輸送素過程の解明と機能改変の試み

研究課題名(英文) Analysis of elementary processes in the photocycle of sodium ion-pumping rhodopsin and an attempt to expand the substrate ion

研究代表者

菊川 峰志 (Kikukawa, Takashi)

北海道大学・先端生命科学研究院・講師

研究者番号：20281842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：光で駆動されるNa⁺ポンプ(NaR)の分子機構解明を目指した研究を行い、以下のことを明らかにした。1) 光励起されたNaRは、K、L、M、O1、O2、N、NaR' 中間体を順に経由する光反応サイクルを周り、O1生成時にタンパク質内部の水和とともにNa⁺を取り込み、その後、不可逆的な過程でO2に移行し、その崩壊時にNa⁺を放出する。2) N末端が短い新規のNaRは、Na⁺に加えて、K⁺をも輸送する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜には、多くの物質輸送タンパク質が存在し、細胞の恒常性維持に貢献している。本研究で研究対象としたNa⁺ポンプ型ロドプシン(NaR)は、そのような輸送タンパク質の一つであるが、通常のタンパク質とは異なり、光で瞬間的に活性化できる利点がある。この特徴を生かした解析を行い、Na⁺輸送時に起こる一部の要素反応を明らかとした。また、新規のNaRの分子特性解析を通して、輸送イオン選択機構の一端を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of Na⁺-pumping rhodopsin (NaR) was analyzed by employing time-resolved detection techniques and through functional characterization of novel NaR. The results are summarized in two topics. 1) NaR undergoes the photoreaction cycle containing K, L, M, O1, O2, N and NaR' intermediates, in which Na⁺ is captured during O1 formation through the hydrated cytoplasmic channel and then released during O2 decay through extracellular channel without further hydration. 2) A novel NaR lacking N-terminal helix can pump not only Na⁺ but also K⁺.

研究分野：生物物理学

キーワード：ロドプシン ナトリウムポンプ 過渡吸収分光法 フォトサイクル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物型ロドプシンは、発色団レチナルをリジン残基とのシッフ塩基結合によって内包する光受容膜タンパクであり、イオンポンプ、チャネル、光センサー、酵素等、多岐にわたる機能をもつ。Na⁺ポンプロドプシン(NaR)は、2013年に初めてその存在が報告されたタンパク質であり、光エネルギーを受けて細菌の細胞内からNa⁺を外向きに輸送する機能をもつ(Inoue *et al.*, *Nat. Commun.*)。生理的条件下において、上述のシッフ塩基はプロトン化しており、これによって、微生物ロドプシンは初めて可視域に吸収を持ち、かつ、機能を発現する。このルールは、既知のイオンポンプ型ロドプシンであるH⁺ポンプロドプシンとCl⁻ポンプロドプシンでも守られていた。H⁺ポンプロドプシンでは、シッフ塩基に結合していたH⁺自身が運ばれ、一方、Cl⁻では、プロトン化シッフ塩基の対イオンとして結合したCl⁻が運ばれる。プロトン化によって、シッフ塩基は正電荷を持つ。よって、暗状態において、カチオンがシッフ塩基付近に結合することは不可能であり、そのため、H⁺以外のカチオンポンプは存在しないと考えられてきた。NaRは、この予測を覆した存在であり、H⁺ポンプやCl⁻ポンプとは異なり、光反応を開始した後に、Na⁺を取り込み、ついで放出することで輸送を行っていると考えられている。このように、NaRが他のイオンポンプとは全く異なる輸送機構を持つことは明らかであり、従って、その分子機構解明は大変興味深い課題である。

Cl⁻ポンプロドプシンは、Br⁻やI⁻のハロゲンイオンに加え、NO₃⁻やSCN⁻などの多原子イオンも輸送可能であるが、この基質選択性は、Cl⁻ポンプごとに異なることが知られている。NaRにおいても、変異導入によって、基質イオンがCs⁺まで拡張されることが報告された(Konno *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* 2016)。よって、さらなる変異導入や、自然界からの新規NaRの探索を通して、基質イオンの選択性を修飾する、あるいは、有害な重金属イオンを輸送させることが可能となるかもしれない。

2. 研究の目的

- (1) Na⁺輸送反応を詳細に解析し、Na⁺輸送に関わる中間状態の性質を明らかとすること。
- (2) 変異導入によって、輸送イオンを拡張すること。
- (3) 自然界からの新規NaRの探索とその分子特性解析によって、輸送機構に関するさらなる知見を得ること。

3. 研究の方法

(1) 試料調製

NaRはIacUV5プロモーター下で大腸菌細胞膜へ発現させた。細胞を破砕、可溶化後に、Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。後述のNa⁺濃度変化の測定には、卵黄脂質に再構成したNaRを用いた。一方、過渡吸収分光測定には、大腸菌脂質と膜骨格タンパク質からなるナノディスクに再構成したNaRを用いた。

(2) Na⁺選択膜を用いた光誘起Na⁺濃度変化の測定

Na⁺イオノフォアを取り込ませた膜によって二つの溶液を隔てると、溶液間のNa⁺濃度比に依存した電位差が発生する。このNa⁺選択膜にNaRを再構成した脂質膜を吸着させ、光照射によってNaRが起こすNa⁺濃度変化を膜電位変化として検出した。Na⁺イオノフォアとしては、Bis(12-crown-4)を、支持体と可塑剤にはそれぞれポリ塩化ビニルと2-ニトロフェニルオクチルエーテルを用いた。励起光には、532 nm, 5 nsecのパルスレーザーを用いた。

(3) 過渡吸収分光測定

中間体の吸収スペクトルは互いに異なるため、パルス光を照射し、その後起こる吸光度変化を観測することで、中間体の吸収スペクトルと出現タイミングを決定できる。本研究では、532 nm, 7 nsecのパルスレーザーを励起光に用いて、400~700 nmの範囲で起こる吸光度変化を10 nmおきに測定した。そのデータを「光反応は一方向に、かつ、枝分かれなく進む」というモデルに当てはめてグローバルフィッティング解析した。この解析では、速度論的に区別される中間状態の吸収スペクトルを決定できる。物理的な中間体間に速い平衡が存在するならば、それらは一つの速度論的中间体に混在して現れる。

(4) Na⁺及びH⁺輸送活性の測定

NaRは、Na⁺とLi⁺を輸送できるが、K⁺以上のカチオンしか存在しない場合は、H⁺を輸送することが知られている。これらの輸送活性を、NaR発現大腸菌懸濁液の光誘起pH変化によって検出した。本法では、H⁺輸送活性は、これに伴う懸濁液のpH低下として観測される。一方、Na⁺輸送活性は、これによる細胞内負の膜電位がH⁺の細胞内流入を促すために、懸濁液のpH上昇として観測される。いずれの場合も、pHの変化分を輸送活性として評価した。

(5) 寒天培地上でのNaRの機能的スクリーニング

輸送基質イオンが拡張したNaR変異体のスクリーニングを目的として、寒天培地上で培養中の大腸菌にNaRを機能的に発現させることを試みた。そのために、レチナル合成酵素群とNaRを、それぞれaraBADプロモーターとIacUV5プロモーター下におき、様々な発現条件を試した

が、NaR の機能的な発現には至らなかった。同様の手法で、H⁺ポンプロドプシンであるプロテオロドプシンは機能的に発現した。よって、NaR は PR よりもレチナル取込み効率が低いことが考えられた。本手法による研究はここで断念したため、これらの結果は、下の研究成果欄には記載しない。

4 . 研究成果

(1) Na⁺輸送に関わる中間状態の解析

一般に膜輸送タンパク質は、膜の片側で基質を結合したのち、構造変化によって基質結合サイトを膜の反対側へ露出させることによりこれを放出する。したがって、こうした輸送体の基質結合状態には、基質の「取込み直後」と「放出直前」の少なくとも二状態が存在し、それぞれ構造や基質結合位置を異にすると考えられている。NaR の場合、基質である Na⁺の取込みと放出は、その光反応サイクル(フォトサイクル)中に現れる 0 中間体と呼ばれる中間状態の生成と崩壊時に起こると予想されているが、この過程における Na⁺結合サイトや、Na⁺のタンパク質内移動などの詳細は不明である。

代表者らは、これまでに 2 種類の NaR を用いた研究を行ってきた。 *Gillisia limnaea* 由来の NaR (GLR) に対しては、後述する Na⁺選択膜を用いた実験により、Na⁺の取込み・崩壊が 0 中間体の生成・崩壊とほぼ同期するという結果を得ている。 *Indibacter alkaliphilus* 由来の NaR (IaNaR) については、過渡吸収分光測定によって、フォトサイクル中に 2 種類の 0 中間体 O1, O2 が現れることを報告している (Kajimoto *et al.*, *J. Phys. Chem. B* 2017)。大腸菌発現系から調製できるタンパク質量は、IaNaR の方が GLR に比べて圧倒的に多い。よって、本研究では、IaNaR の解析に集中することとし、Na⁺選択膜と過渡吸収分光を用いた詳細な測定を行った。

過渡的な Na⁺取込み・放出過程の検出

Na⁺選択膜上に、脂質再構成した IaNaR を乾燥吸着させ、パルスレーザーを照射することで、1 回のフォトサイクル中に起こる膜電位変化を時間分解測定した。その結果、30 mM Na⁺存在下では、1 msec 付近で最大となる正の電位変化を観測した。正の電位変化は、Na⁺濃度の減少に対応する。よって、この条件下では、Na⁺をタンパク質内部に取り込んだ中間体の蓄積が、1 msec 付近で最大となると考えられた。

光反応サイクルの詳細な解析

過渡吸収分光測定は、ロドプシンをパルス光によって瞬間的に励起し、その後生じる構造中間体の盛衰の様子を、特定の波長の検出光における吸光度の時間変化として検出する方法であり、ロドプシンのフォトサイクルの観測に広く用いられる手法である。本研究では、天然状態に近いフォトサイクルを観測するため、また、上述の膜電位測定の結果と比較するため、ナノディスクに再構成した IaNaR を試料とした。0 中間体は長波長側に吸収を持つ。その生成・崩壊を反映する 600 nm における吸光度の時間変化を膜電位変化と比較したところ、両者の時間変化はよく一致していた。上述した通り、IaNaR の 0 中間体は、連続して出現する二つの中間体 O1, O2 に区別される。よって、O1 が Na⁺を取り込んだ直後の状態、O2 は Na⁺放出直前の中間体であると考えられた。

Na⁺の取込み・放出過程は、溶液中の Na⁺濃度の影響を受けるはずである。そこで、幅広い Na⁺濃度条件下で過渡吸収分光測定を行い、得られたデータをグローバルフィッティングによって解析した。その結果、IaNaR は、K, L, M, O1, O2, N, NaR' を経由するフォトサイクルを周ることがわかった。さらに、K, L, M, O1 の 4 中間体、および、O2, N, NaR' の 3 中間体は、それぞれ過渡的な平衡状態を形成した。その中でも、L/O1、および、O2/N の平衡が、Na⁺濃度に大きく依存しており、かつ、Na⁺濃度の増加によって、それぞれ O1, O2 へ平衡がシフトしていた。よって、この実験によっても、O1 および O2 がともに Na⁺を内包する中間体であることが明らかになった。それぞれの平衡状態の Na⁺濃度依存性から求めた O1 と O2 の Na⁺に対する解離定数は、61 mM と 39 mM であった。また、いずれの測定条件においても、O1 と O2 の平衡は観測されなかったことから、O1 から O2 への遷移は不可逆的な過程であることが示唆された。効率の良い膜輸送のためには、基質との結合が取り込み側では強く、放出側では弱いことが重要であるが、IaNaR の場合、二つの解離定数はほぼ同程度であった。この不利な性質を、O1 から O2 への不可逆過程が補っている可能性がある。

他の微生物型ロドプシン同様に、NaR もその細胞質側 (CP) チャンネルは高度に疎水的であり、それゆえ、CP 側から Na⁺を取り込むためには、CP チャンネル内部が水和する必要があると予想された。そこで、高圧条件下での過渡吸収分光測定を行い、フォトサイクルに現れる変化を調べた。タンパク質内部の水和は体積の増加を伴うため、こうした過程を伴う中間体の蓄積は、圧力の増加によって妨げられる。実験の結果、高圧条件下においては、O2 中間体の蓄積には変化が生じなかったのに対して、O1 の蓄積は著しく減少した。このことから、L/M 中間体から O1 中間体への遷移においては CP チャンネルの水和が必要であるということが示唆された。

(2) 新規 NaR の分子特性解析

IaNaR などをクエリとした blast サーチによって、既知の NaR と同じ活性中心残基を持つものの、明らかに進化的に異なるロドプシングループを見出した。その中の一つ、砂土から単離され

た放線菌 *Micromonospora coxensis* のロドプシン (McNaR) を対象とし、発現および機能解析を行った。McNaR 遺伝子を pET ベクターへ挿入し、大腸菌での発現を試みたところ、ロドプシンの発現を示す細胞膜の呈色が見られた。この大腸菌懸濁液を用いたイオン輸送活性測定により、McNaR が Na^+ 輸送活性を持つことが確認できた。既知の NaR は、細胞内の Na^+ が枯渇すると H^+ を輸送することが知られているが、McNaR において H^+ 輸送は認められなかった。よって、McNaR はアルカリ金属イオンに特化したポンプであると考えられる。次に、過渡吸収分光測定によって、フォトサイクルを既知の NaR と比較した。既知の NaR は K^+ 以上のカチオンを輸送しないため、それらのカチオン存在下では主に短波長側中間体 (L, M) が観測され、 Na^+ 存在下に特徴的な長波長側中間体 (O) の目立った蓄積は見られない。しかし、McNaR は 100 mM 以上の K^+ 存在下において、明確な O 中間体の生成を示したため、 K^+ 輸送能を持つことが示唆された。そこで、1 M 塩溶液での輸送活性測定を行ったところ、 Na^+ 輸送に対し 1 割程度の強度の K^+ 輸送が確認できた。McNaR を含むグループは、既知の NaR が共通して保存している N 末端側の短いヘリックスを欠失している。よって、N 末端ヘリックスは、輸送イオンを規定するフィルタとして機能することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iizuka Azusa, Kajimoto Kousuke, Fujisawa Tomotsumi, Tsukamoto Takashi, Aizawa Tomoyasu, Kamo Naoki, Jung Kwang-Hwan, Unno Masashi, Demura Makoto, Kikukawa Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional importance of the oligomer formation of the cyanobacterial H ⁺ pump Gloeobacter rhodopsin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47178-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujisawa Tomotsumi, Abe Masahiro, Tamogami Jun, Kikukawa Takashi, Kamo Naoki, Unno Masashi	4. 巻 592
2. 論文標題 Low-temperature Raman spectroscopy reveals small chromophore distortion in primary photointermediate of proteorhodopsin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3054 ~ 3061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasemi Takatoshi, Kikukawa Takashi, Watanabe Yumi, Aizawa Tomoyasu, Miyauchi Seiji, Kamo Naoki, Demura Makoto	4. 巻 1860
2. 論文標題 Photochemical study of a cyanobacterial chloride-ion pumping rhodopsin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 136 ~ 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbabi.2018.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kikukawa, T., Sasaki, S., Nishiya, K., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Demura, M., Tamogami, J.
2. 発表標題 Replacements of "H ⁺ donor" residues in the light-driven H ⁺ -pump rhodopsins
3. 学会等名 17th International Congress on Photobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murabe, K., Kato, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Demura, M., Kikukawa, T.
2. 発表標題 Time-resolved detection of Na ⁺ uptake and release reactions of Na ⁺ -pumping rhodopsin
3. 学会等名 9th Asia and Oceania Conference on Photobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩間健人、渡邊弓、塚本卓、相沢智康、出村誠、菊川峰志
2. 発表標題 Importance of His166 for Cl ⁻ -pump activity of Mastigocladopsis repens halorhodopsin
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村部圭祐、菊川峰志、塚本卓、相沢智康、出村誠
2. 発表標題 イオン選択膜を用いたNa ⁺ ポンプ型ロドプシンの機能解析
3. 学会等名 第45回生体分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 朝也、村部 圭祐、菊川 峰志、塚本 卓、相沢 智康、出村 誠
2. 発表標題 Photochemical analysis of sodium ion-pumping rhodopsin from <i>Indibacter alkaliphilus</i>
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikukawa, T.
2. 発表標題 Functional importance of trimer formation of light-driven H ⁺ pump Gloeobacter rhodopsin
3. 学会等名 18th International Conference on Retinal Proteins (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikukawa, T.
2. 発表標題 Cyanobacterial rhodopsin having TSD motif
3. 学会等名 8th Asia and Oceania Conference on Photobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kikukawa, T., Hasemi, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M.
2. 発表標題 Photochemistry of cyanobacterial chloride ion-pumping rhodopsin
3. 学会等名 19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress and 11th European Biophysics Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Okamura, A., Kikukawa, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M.
2. 発表標題 Functional analyses of Na ⁺ -pumping rhodopsin focusing on acidic residues on the extracellular surface
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Murabe, K., Kikukawa, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M.
2. 発表標題 Analysis of Na ⁺ transfer reactions of Na ⁺ -pumping rhodopsin
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iizuka, A., Kikukawa, T., Kajimoto, K., Fujisawa, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Kamo, N., Unno, M., Demura, M.
2. 発表標題 Functional importance of trimer formation of light-driven H ⁺ pump Gloeobacter rhodopsin
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Abe, S., Kikukawa, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M.
2. 発表標題 Functional analysis of T126E mutant of Natronomonas pharaonis halorhodopsin
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮内 正二 (Miyachi Seiji) (30202352)	東邦大学・薬学部・教授 (32661)	

