

平成 23 年 5 月 15 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590031

研究課題名 (和文)

トランスポーターの輸送分子機構解明の新展開：光駆動性ポンプをモデルタンパクとして研究
課題名 (英文)

A developmental approach to clarify a molecular mechanism of transporter utilizing a model transporter as a light-driven ion pump

研究代表者

宮内 正二 (MIYAUCHI SEIJI)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：30202352

研究成果の概要 (和文)：

光駆動性クロライドポンプの輸送分子機構を明らかにすることを研究目的として研究を行い、輸送活性を様々な物理化学的手法より測定し、以下の結果を得た。

(1) 種々の変異体を作成し、その変異体における Cl⁻ 結合能を測定した。結合に対して重要な残基を特定した。Arg123, Ser130, Asp252 である。(2) Cl⁻ の細胞外から細胞内へのタンパク内移動には、Ser130 および Asp252 が重要であることが明らかとなった。(3) Ser130 は、Cl⁻ が細胞質側から細胞外側に逆流が起こらないようにする分子弁として機能していることが明らかとなった

研究成果の概要 (英文)：

Halorhodopsin (HR) is a light-driven inward-directed Cl⁻ pump. To clarify the molecular mechanism of Cl⁻ transport in detail, we precisely determined the transport activities through HR with various physico-chemical techniques, and the following results were obtained.

- (1) The crystal structure clearly shows that the primary Cl⁻ is proximal to the protonated Schiff base (PSB) and is stabilized by electrostatic interactions with the positive charged PSB [PDB: 1E12]. Based on the crystal structure, we mutated amino acid residues, which might be involved in Cl⁻ transport. Several important amino acid residues were identified; Arg123, Ser130 and Asp252.
- (2) Especially, two amino acid residues Ser130 and Asp252 were proved out to play an important role in Cl⁻ translocation away from the binding site in the extracellular (EC) channel across the retinal.
- (3) For the sake of the vectorial translocation, HR protein must possess one or several molecular valves in HR to hinder the Cl⁻ leakage, or backflow (from cytoplasmic (CP) to EC channel) during pumping cycles. Ser130 coordinates with PBS and functions as a molecular valve to hinder the internal leak, backflux of Cl⁻ during anion-transport cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物物理化学，トランスポーター，光駆動性イオンポンプ，ハロロドプシン，輸送分子機構，スイッチ機構，分子弁

1. 研究開始当初の背景

申請者はトランスポーターの輸送分子機構の研究において、光駆動性クロライドポンプ HR が最も有利な研究材料であると思っている。その理由はつぎの通りである。

(1) 物理学的測定に適した多くの材料を得ることが出来る。高度好塩好アルカリ性菌 *Natronomonas pharaonis* 由来の HR、略して pHR を用いている。大腸菌で大量発現させることができ、ヒスチジンタグおよび Ni カラムを利用して容易に精製出来る。1L 培養から 15mg 程度は精製することができる。

(2) 2番目の理由は、HR は光を吸収し、励起されると種々の中間体を経てもとの HR に戻ることである。これをフォトサイクルと呼んでいる。我々はこれまでの研究で、pHR は、フォトサイクル 1 回につき 1 つの Cl⁻ を輸送することを明らかにした。Cl⁻ を輸送中、pHR のフォトサイクルは中間体の色を変化させながら進行する。従って、パルス光（レーザー光）を与えてからの、各中間体の生成および崩壊の時定数は、吸収の時間変化から薬物速度論と類似方法で求めることができる。

(3) 外液の Cl⁻ 濃度を変化させ、時定数が Cl⁻ 濃度に依存する過程がタンパクと外液中の Cl⁻ との相互作用（出入り）過程であろうと容易に推測出来る。これにより、結合解離過程を見積もることが可能となっている。

(4) 第 4 番目の理由はオーサイト（卵母細胞）で発現させ、電気生理学的方法で輸送活性を求められることである。申請者らは世界ではじめて、光照射による Cl⁻ 輸送を膜電流として観測する系を確立した。（*Biophys J*, 92: 2559-2569, 2007）。この方法は極めて精度が高く、pHR 1 分子の能力を見積もることが可能である。

(5) 理由の最後は、別の高度好塩菌由来の HR の結晶構造が Oesterhelt らによって発表されていることである（*Science* 288, 2000）。勿論違うタンパクであるが、我々の pHR と非常に相同性が高く（identity, 66%; homology 97%）、一次構造をこの構造に当てはめて行けば、ほとんど間違いなく pHR の 3 次元構造となるであろうと考えられる。この構造を見ながら、本研究の目的である輸送機構と高次構造の形成の分子的機構を調べることが出来る。一方、我々も解像度は低いながらも結晶化に成功している。本研究において、自前の構造による解析も可能となると確信している。これらの物理化学的手法の利点を生かし、イオン輸送分子機構の全容を明らかにしようと考えている。

2. 研究の目的

申請者は膜に関する生物物理化学、特に、膜輸送タンパク、トランスポーターの輸送分子機構に関する研究を行っている。Microbial rhodopsin の 1 種である光駆動

性クロライドポンプ、ハロロドプシン (HR) は、このような研究を行う上で最も適しているモデルタンパクであると考えている。本研究では、Cl⁻ 輸送活性を様々な物理化学的手法より測定し、HR の輸送分子機構を明らかにすることを目的とする。

HR は光エネルギーを利用して、Cl⁻ を細胞外から細胞内へ輸送する。申請者がこれまでの知見を基に提唱している HR の Cl⁻ の輸送は、1 (Cl⁻ 取込み側の Cl⁻ が移動出来るチャンネル、Cl⁻ との親和力は強い) + 2 (スイッチ) + 3 (Cl⁻ 放出側のチャンネル、放出時には Cl⁻ との親和力は弱い) の 3 つの要素から成り立っている。HR の輸送機構について明らかにしたいことは、(1) 取り込み側のチャンネルがどうなっているか？種々の変異体を作成して、その Cl⁻ 結合を測定して結合に対して重要な残基を特定したい。(2) 放出側の Cl⁻ 結合サイトの同定。膜輸送であるので、放出側の Cl⁻ 結合サイトがあるはずである。(3) 放出側 Cl⁻ との親和力の変化はどのようにおこるのか？この Cl⁻ 結合サイトは、Cl⁻ を受取るときには親和力が強く、その後弱くなって、逆に移動することなく、細胞内へ放出するはずである。(4) クロライドポンプ機構の本質は、Cl⁻ を取り込み側チャンネル(細胞外側)から放出チャンネル(細胞内側)へ移動させる事である。それはどのような分子的機構か？これはよくスイッチ機構と呼ばれ、すべての膜透過過程に含まれるにも関わらず、あまり機構の解明が行われていない。これらの性質を理解する事が、輸送担体の分子輸送機構を知ることであると考えている。

3. 研究の方法

(1) 暗所下（基底状態）での Cl⁻ の結合位置の確定と結合様式の解明。これは終局的には X 線結晶構造によって決まるが、Oesterhelt らによって発表されている（*Science* 288, 2000）論文を参考に、種々の変異体を作成して、その Cl⁻ 結合を測定し、結合に対して重要な残基を特定する。

(2) 細胞質側での Cl⁻ 放出に重要な Cl⁻ 結合サイトの同定、及び放出機構の解明。この Cl⁻ 結合サイトは、Cl⁻ を受取るときには親和力が強いが、その後弱くなって、逆に移動することなく、細胞内へ速やかに放出する役割を担っている。その分子機構を明らかにする。

(3) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた種々の変異体の Cl⁻ 輸送能の測定。各種変異体の実際の輸送活性を精度良く測定し、各残基の Cl⁻ 輸送における役割を推定する。

(4) タンパク質内での Cl⁻ のトランスポーター機構（スイッチ機構）の解明。タンパク質内で外液側から細胞質側への Cl⁻ の移動がどのような機構で起こるのかということレチナル近傍の変異体を用いて解明する。

4. 研究成果

(1) 細胞内でのCl⁻の逆流防止弁の分子機構の解明

以前、我々は、HRをアフリカツメガエル卵母細胞膜に発現させ、電気生理学的手法により照射によるCl⁻輸送を膜電流として観測する系を確立した(*Biophys J*, 92: 2559-2569, 2007). この方法は極めて精度が高く、HR 1分子の能力を見積もることが可能である. X-線結晶構造から予測される通過ルート(図1)に基づいて各変異体の作成し、「輸送能力」を見積もった(図2).

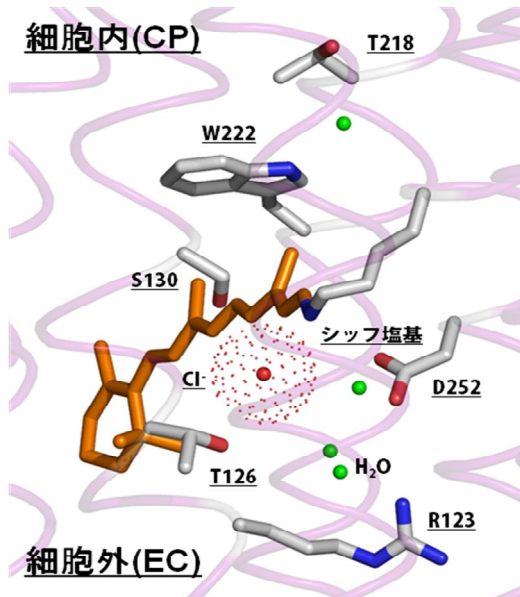


図1: X線結晶構造から予想されるCl⁻輸送ルート

その結果、細胞外領域の基質結合ポケットが輸送において重要であることが示された. その中でもS130T変異体は、光を照射時、負の膜電位をかけるとCl⁻が逆流する変異体、即ち、ポンプとしての機能が崩壊して

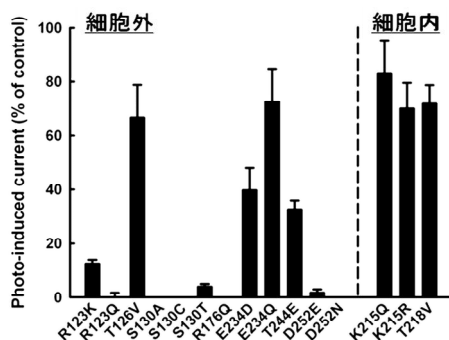


図2: HRの各種変異体におけるCl⁻輸送活性

いる変異体であった. 言い換えれば、この結果は、Ser130が負の膜電位によるCl⁻の

逆流を防ぐ分子弁として働いていることを示唆したものである. 図1に示すようにSer130の水酸基の位置は、プロトン化シッフ塩基(PSB)に近傍に位置し、Cl⁻輸送に際し、シッフ塩基と水素結合を形成する能力がある. 今後、分子弁の正体がこの水素結合か否かを検討するために、①閃光光分解法を用いて、Ser変異体における輸送中間体を解析し、どの過程に異常があるかを詳細に検討する必要がある. 更に、水素結合が関与を検証するために、②重水における閃光光分解解析、③FT-IR解析を行い、Ser130の水素結合の形成中間体を同定することにより、分子弁の正体を明らかにすることができる. この証明は、国内外においては、最初の証明になり、インパクトは大きい. 更に、今後は、電気生理学的にCl⁻輸送を測定し、ここまで得られた知見に基づき、詳細な分子弁モデルの構築を行う.

(2) HRのシッフ塩基のpK_aの低下メカニズムと駆動力への変換機構の解明

図1に示すように、Cl⁻はプロトン化シッフ塩基(PSB)との静電相互作用により結合している. 更に、Ser130, Asp252, Arg123および3つの水分子による水素結合により、このCl⁻結合が安定化している. これらの残基の内、Asp252はCl⁻の輸送に伴いシッフ塩基のプロトン化状態の調節、pK_aの低下を行っていることが明らかになった. 照射後、all-transから13-cisへのレチナールの異性化に伴いPSBの電気双極子を細胞内へと方向を変えることがCl⁻の輸送に重要であると提唱されている. Cl⁻を取り込み側から放出側へ移動させるような分子機構は、このシッフ塩基のpK_aの低下と深く関わっているのではないかと推察された. Cl⁻はPSBと静電相互作用で強く結合しており、HRがCl⁻を細胞外から細胞内へと輸送するためにはPSBとの相互作用が変化する必要があるが、Cl⁻輸送に伴ったPSBのpK_a変化がこの相互作用の限界を引き起こしていると考えられた. 今後、このPSBのpK_a変化に基づき、輸送におけるPSBの役割を検討し、分子弁として機能しているSer130との関係を明らかにすることにより、基質移動に関する分子機構の全容を解明することに繋がる重要な発見の一つである.

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7件)

① Miyauchi, S., Gopal, E., Babu, E., Srinivas, S. R., Kubo, Y., Umopathy, N. S., Thakkar, S. V., Ganapathy, V. and Prasad, P. D.

Sodium-coupled electrogenic transport of pyroglutamate (5-oxoproline) via SLC5A8, a monocarboxylate transporter. *Biochim Biophys Acta*, 1798: 1164-1171 (2010). (査読有り)

② Yamamoto, T., Sugawara, M., Kikukawa, T., Miyauchi, S., Yamaguchi, M., Tero, A., Takagi, S. and Nakagaki, T. Kinetic study of anti-viral ribavirin uptake mediated by hCNT3 and hENT1 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biophysical Chemistry*, 147: 59-65 (2010). (査読有り)

③ Kubo, M., Kikukawa, T., Miyauchi, S., Seki, A., Kamiya, M., Aizawa, T., Kawano, K., Kamo, N. and Demura, M. Role of Arg123 in light-driven anion pump mechanisms of *pharaonis* halorhodopsin. *Photochem Photobiol*, 85: 547-555 (2009). (査読有り)

④ Tamogami, J., Kikukawa, T., Miyauchi, S., Muneyuki, E. and Kamo, N. A tin oxide transparent electrode provides the means for rapid time-resolved pH measurements: application to photoinduced proton transfer of bacteriorhodopsin and proteorhodopsin. *Photochem Photobiol*, 85: 578-589 (2009). (査読有り)

⑤ Kuwayama, K., Inoue, H., Kanamori, T., Tsujikawa, K., Miyaguchi, H., Iwata, Y., Miyauchi, S., Kamo, N. and Kishi, T. Uptake of 3,4-methylenedioxy- methamphetamine and its related compounds by a proton-coupled transport system in Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1778(1): 42-50 (2008). (査読有り)

⑥ Nakabayashi, T., Wang, H. P., Tsujimoto, K., Miyauchi, S., Kamo, N. and Ohta, N. Studies on effects of external electric fields on halobacteria with fluorescence intensity and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Chemistry Letters*, 37(5): 522-523 (2008). (査読有り)

⑦ Thakkar, S. V., Miyauchi, S., Prasad, P. D. and Ganapathy, V. Stimulation of Na⁺/Cl⁻-coupled opioid peptide transport system in SK-N-SH cells by L-kytorphin, an endogenous substrate for H⁺-coupled peptide transporter PEPT2. *Drug Metab Pharmacokinet*, 23: 254-262 (2008). (査読有り)

[学会発表] (計9件)

① ○宮内正二, 関頭照, 下野和実, 菊川峰志, 出村誠, 加茂直樹「ハロロドプシンの Cl⁻移動中における, シッフ塩基の pKa の変化」第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月20日(東北大学川内北キャンパス, 仙台)

② ○宮内正二, 関頭照, 下野和実, 菊川峰志, 出村誠, 加茂直樹「アザイド存在下における, 光駆動性クロライドポンプのイオン輸送」第5回トランスポーター研究会, 2010年7月10日(東京医科大学病院, 東京)

③ ○宮内正二, 下野和実, 菊川峰志, 出村誠, 加茂直樹「光駆動性クロライドポンプにおける基質認識機構の解明」日本薬学会第130年会, 2010年3月(桃太郎アリーナ, 岡山)

④ ○菊川峰志, 宮内正二, 一尾裕章, 北川拓, 出村誠, 加茂直樹「ファラオニスハロロドプシンのCl⁻輸送機構におけるAsp252の役割」第47回日本生物物理学会年会, 2009年11月1日(アステイ徳島, 徳島)

⑤ ○Kikukawa, T., Miyauchi, S., Kitagawa, Ichio, H., T., Kamiya, M., Aizawa, T., Kawano, K., Demura, M. and Kamo, N. Role of the aspartic acid residue adjacent to the retinylidene Schiff base in the light-driven Cl⁻ pump halorhodopsin. 15th International Congress on Photobiology, 2009 June 23 (Düsseldorf, Germany)

⑥ 菊川峰志, ○宮内正二, 関頭照, 北川拓, 出村誠, Vadivel Ganapathy, 加茂直樹「ハロロドプシンポンプ機能におけるシッフ塩基近傍酸性残基の役割」第46回日本生物物理学会年会, 2008年12月5日(福岡国際会議場, 福岡)

⑦ ○Miyauchi, S., Dabazaki, Y., Gopal, E. and Ganapathy V. Transport of neurotoxic monocarboxylates via the Na⁺-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8). American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting, 2008 November 17 (Georgia World Congress Center, Atlanta)

⑧ ○宮内正二, 青山健太郎, 菊川峰志, 出村誠, Vadivel Ganapathy, 加茂直樹「光駆動性クロライドイオンポンプ, ハロロドプシンのアザイド存在下におけるイオン輸送機構に関する研究」第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2008年8月1日(札幌コンベンションセンター, 札幌)

⑨ ○Seiji Miyauchi, Akiteru Seki, Takashi Kikukawa, Kentaro Aoyama, Makoto Demura, Vadivel Ganapathy and Naoki Kamo. Mechanism of proton transport via azide-bound halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*. 第3回トランスポーター研究会, 2008年6月8日(京都大学, 京都)

[図書] (計2件)

① 「コンパサー生物薬剤学」岩城正宏, 伊藤智夫編, 第2章「生体膜の構造と薬物の生体膜透過機構」(南江堂, 東京) pp13-29, 2010年4月10日

② 「製剤化のサイエンス基礎とCMC」永井恒司, 園部尚編, 第1部製剤材料, 2章「分

散系」(じほう, 東京) pp24-52, 2010年3月31

日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 正二 (MIYAUCHI SEIJI)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号: 3 0 2 0 2 3 5 2

(2) 研究分担者

菊川 峰志 (KIKUKAWA TAKASHI)

北海道大学・創成科学共同研究機構・助教

研究者番号: 2 0 2 8 1 8 4 2