

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570164

研究課題名（和文）

光駆動性塩素イオンポンプの構造・機能解析

研究課題名（英文）

Structure and function of light driven chloride ion pump.

研究代表者

井原 邦夫 (IHARA KUNIO)

名古屋大学・遺伝子実験施設・助教

研究者番号：90223297

研究成果の概要（和文）：

高度好塩性好アルカリ性古細菌 *Natronomonas pharaonis* の細胞膜上には、光駆動性塩素イオンポンプであるハロロドプシン (pHR) が存在する。この pHR を膜の状態で精製して結晶化し、2.0 Å の分解能で構造解析する事に成功した。また、塩素イオンが結合していない O 中間体様の構造解析にも成功した。これらの2つの構造を比較する事で、塩素イオン輸送過程において、CヘリックスがGヘリックス側に移動すること、シッフ塩基と水素結合を形成していた水分子が移動することが、明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

An extremely haloalkaliphilic archaon *Natronomonas pharaonis* possesses the light-driven chloride ion pump, halorhodopsin (pHR) on its membrane. We purified pHR in the form of native membrane, crystallized, and solved its structure at 2.0Å resolution. Furthermore we succeeded to solve the structure of chloride ion free blue form of pHR, which is considered to be O-like intermediate. From the structure comparison between chloride-bound and chloride-free forms of pHR, it was shown that the removal of the chloride ion, which is located between the retinal Schiff base and Thr126, is accompanied by such a deformation of helix C that the side chain of Thr126 moves toward helix G, leading to a significant shrinkage of the chloride ion binding site and the water molecule, which was hydrogen bonded with the chloride ion, had moved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光生物学、構造生物学、エネルギー変換、イオンポンプ

1. 研究開始当初の背景

光プロトンポンプであるバクテリオロドプシン(BR)は、最もよく理解されている膜タンパク質の一つである。BRの構造は、その光化学中間体の構造も含めて、既に50

種類以上pdbに登録されている。神山らは、膜融合法による結晶化—構造解析を行い、BRの基底状態、K,L,M各中間体の構造を解いて、BRのプロトン輸送のためには、水分子がBR分子内で移動する“BRが水ボ

ンプである”とする仮説を立てた。水分子が一方方向に移動しているとするなら、BRはいわば、水-プロトン対向輸送ポンプとして理解しなおす必要が生じる。一方、ドイツやアメリカのグループは、水の動きは重要であるものの、最初のレチナル異性化の段階では水の移動は見られず、主にタンパク質部分の構造のひずみが駆動力になっていると主張している。我々は、BRと60%のアミノ酸一致度を示す別のプロトンポンプであるアーキロドプシン(AR)を用いて、結晶構造解析を行い、BRと同じ結論に達した。ハロロドプシン(HR)は、BRとアミノ酸一致度が25%程度の、同じく7回膜貫通領域を持つ膜タンパク質であるが、輸送するイオン種はプロトンではなくて塩素イオン(ハロゲン)である。輸送するイオンの電荷が逆であり、分子サイズもはるかに大きく、輸送方向も正反対である。ドイツのグループは、基底状態のHRの構造を決定して、塩素イオンの結合部位を1カ所決めた(Kolbe et al., 2000 Science 288 1390)。また、最近になってL中間体の構造も報告されたが、基底状態と大きな変化はなく、塩素イオンの位置がほとんど変化していなかった。彼らの用いたHRは、明順応状態でも、レチナルの異性体の割合が、all-trans型が約60%(残り40%が13-cis型)と均一からはほど遠い値にある。また、all-trans型、13-cis型がそれぞれの光化学反応を示す事が、構造解析をより難しいものにしてしまうと予想している。我々は、最近 *Natronomonas pharaonis* 株において、pHR(前述した *Halobacterium* 由来のHRをsHR、*Natronomonas pharaonis* 由来のHRをpHRと表記する)の大量発現株の作成に成功した。このpHRは、暗状態でも明状態でも、約85%がall-trans型レチナルであり、13-cis型のpHRの光サイクルは報告されていない。そこで、この大量発現株から、ネイティブな脂質を保持した膜の状態のままにpHRを結晶化し、光化学反応中間体における塩素イオンの移動を観察する本研究を開始した。

2. 研究の目的

pHRは、光照射に伴って、図1に示した光化学反応サイクルを経て、塩素イオンを細胞外側(EC側)から細胞質側(CP側)へと輸送する。pHRの光化学反応サイクルでは、BRの光サイクルとは異なり、レチナルのシッフ塩基が脱プロトン化したM中間体を欠いている。BRの場合、プロトンの移動をいくつかの解離性アミノ酸(Asp85とAsp96)とシッフ塩基の順序だったプロトン着脱として説明できた。塩素イオン結合という点では、pHRではプロト

ン化シッフ塩基の近傍に1カ所のイオン結合部位がある事しかわかっていない。本研究では、pHRの立体構造を、基底状態をはじめとした光照射後の各種中間体を含めて、すべて解いて、その構造情報に基づいて、塩素イオン輸送機能の詳細を理解する事を目的としている。さらに、pHRは、アジ化物イオンやシアン酸イオン存在下では、プロトンを輸送するようになることが知られており、これらの陰イオンはハロゲンイオンと競争的に結合する。BRとpHRという非常に構造が似たタンパク質が、プロトン、塩素イオンという電荷の異なるイオンを違う方向に輸送するという仕組みを統一的に理解する事を目指して、アジ化物添加のpHRの結晶を作成し、同様な中間体構造解析を行う。

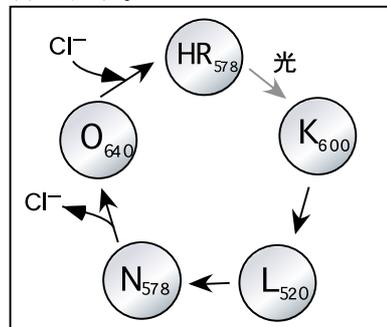


図1 pHRの光化学反応サイクル

3. 研究の方法

pHRの単離・精製: pHRの大量発現株 *Natronomonas pharaonis* KM-1株をJCM #167培地(1L: 200g NaCl, 1g KCl, 1g NH₄Cl, 1g KH₂PO₄, 0.2g MgSO₄·7H₂O, 10g casamino acids (Becton-Dickinson, USA), 5g Na₂CO₃, and trace metals (0.1mg ZnSO₄·7H₂O, 0.03mg MnCl₂·4H₂O, 0.3mg H₃BO₃, 0.2mg CoCl₂·6H₂O, 0.01mg CuCl₂·2H₂O, 0.02mg NiCl₂·6H₂O, and 0.03mg Na₂MoO₄·2H₂O), pH 9)で10日間、40℃で培養し、遠心操作(7,000 x g, 15min)により菌体を回収する。solution A (3M NaCl, 50mM HEPES-NaOH, pH 7.0)に懸濁して、-80℃で凍結後、室温で融解をくり返して菌体破碎後、蒸留水で膜断片を洗い(90,000 x g, 60min)、0.2%(w/v) Tween-20溶液で1回洗ってから蒸留水に懸濁して、凍結しておく。

pHRの結晶化: 精製pHRを0.5% Tween20, 0.1M NaCl溶液で洗い部分的に脂質を取り除く。2mg/ml pHRになるように、1.0M 硫酸アンモニウム, 0.16M NaCl, 0.04% NaN₃, 0.04M Na-citrate pH 8.0, 5mg/ml nonylglucosideの溶液に懸濁して、室温で1時間静置した後に、4,000 x g, 10minの遠心

操作により不溶性不溶性画分を除去した上清を用いて、2.2-2.9M 硫酸アンモニウムを母液とした蒸気拡散法により結晶作成を行った。

データ収集: Spring8-BL38B1, BL41XU で X 線回折データを集めた。100K に保持しとした結晶試料に 1Å の波長の X 線を $\sim 2 \times 10^{12}$ 光子/mm²/s の流速で照射し、CCD 検出器 (Mar) で回折データを集めた。Auto Indexing と積分は、Mosflm6.1 で行った。データのスケーリングは、CCP4 プログラムの SCALA を用いて行った。

構造の精密化: モデル構築は pdb led2 を sHR のモデル分子として分子置換法により行った。構造の精密化は CNS ver1.1, XtalView ver. 4.0 を持ちいて行った。空間群は C2 とした。

アクセッション番号: 結晶構造は、すべて Protein Data Bank に登録した。そのアクセッション番号は、基底状態の pHR が ID: 3FEB, アニオンフリーの青色型、黄色型、Br 結合紫型がそれぞれ、3QBG, 3QBI, 3QBK である。

4. 研究成果

(1) pHR の基底状態の立体構造

pHR は、単斜晶系の空間群 C2 の結晶を形成した。2Å の分解能の回折データから、3 量体を形成する pHR 同士の間隙にバクテリオルペリンが 1 分子入っている事がわかった(図 2)。

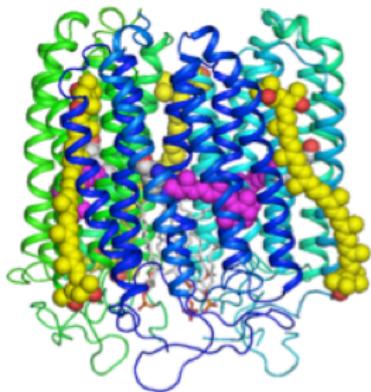


図 2 pHR 3 量体の立体構造

単量体の pHR 分子は、他の古細菌型ロドプシンとほぼ同じ 7 本の α -ヘリックス構造をとり、オールドランス型のレチナールが G ヘリックスの中程にある Lys256 と結合していた。レチナールのポリエーテル鎖は、Trp127, Tyr180, Phe187, Trp222, Tyr225, Trp229 の 6 個の芳香族側鎖を持つアミノ酸により囲まれていた。シッフ塩基の NH 基は細胞外側を向き、水分子の一つ (Water502)、Asp252 のカルボキシル基側鎖、塩素イオンと水素結合を形成していた。塩素イオンは Thr126,

Ser130 の OH と水素結合を形成していた。この塩素イオンの結合位置は、shR の場合と同じであったが、水分子 504 の位置と T126(shR では T111) の側鎖の向きが異なっていた。T111 (shR) は塩素イオンと水素結合を作っておらず、パルミチン酸のカルボキシル基と水素結合を作っていた。塩素イオンに対する Km 値が、pHR (1.7mM) と shR (10mM) と異なっている理由がこの構造の違いに起因しているのかもしれない。

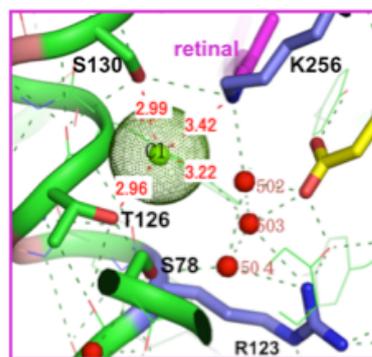


図 3 pHR の塩素イオン結合部位の構造

pHR の特徴的な構造として、ヘリックス A の前方にある短いヘリックス A' と BC ループ部分で作られる蓋構造を挙げることができる。この構造は shR にはみられず、シッフ塩基近傍に結合している塩素イオンが細胞外液とアクセスしにくいことが想像される。この構造の違いは、塩素イオンの Km の違いを生み出す一つの理由として考えられる。

(2) pHR の新奇な蓋構造の役割

pHR は大腸菌で機能的に発現して、レチナールの添加により青く色づく。吸収スペクトルは、この pHR が塩素イオンを結合していない状態にあることを示している。ここに 300mM 程度の NaCl を添加する事で紫色に変化し、塩素イオンが結合する事が分かった。面白いことに、pHR を発現している大腸菌に脂溶性カチオン TPMP (最終濃度 30mM) を加える事でも、紫色に変化して、塩素イオン結合型の pHR になる。これは、内側負の膜電位によって、A' ヘリックスと BC ループからなる蓋構造が閉じることで、塩素イオンが入り込むのを防ぐ仕組みがあることを示唆している。この BC ループの一部を欠失した pHR を大腸菌で発現させると、塩素イオンを結合型の紫色の状態が発現した。

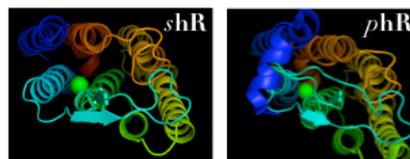


図 4 pHR と shR の細胞外側からみた構造

(3) 塩素イオン非結合型 pHR の構造

pHR の結晶を塩素イオンを含まないアルカリ性緩衝液に置くことで、シッフ塩基のプロトンが解離し、塩素イオンを外した黄色型のいわゆる M 中間体型の pHR 結晶を作成する事ができた。これを中性に戻してシッフ塩基をプロトン化すると、青色型のいわゆる O 中間体型の pHR 結晶ができた。黄色型、青色型共に、主鎖の構造はほとんど同じであったが、塩素イオン結合型 pHR と比べた場合、C ヘリックスにおいて大きな構造変化が見られた。塩素イオンと水素結合を形成していた T126 の側鎖が、塩素イオンが解離することで G ヘリックス方向に移動して、塩素イオンが占めていた空間が狭まった (図 5)。また塩素イオンと水素結合を作っていた水分子 (Water502) が消失していた (図 5)。近傍の 2 分子 (Water 503, 504) は、ほとんど位置を変えていないので、塩素イオンの移動に伴って移動したものと推測された。

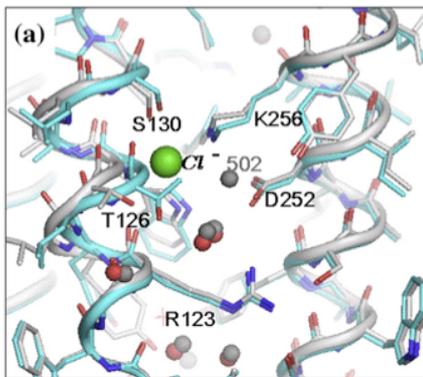


図 5 塩素イオン結合型 pHR と塩素イオン非結合型 pHR の構造比較 (塩素イオン結合部位)

HR の場合も BR と同様に、水分子の移動によって塩素イオンを移動させる水/塩素イオン共輸送体として機能している可能性が高まった。

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)

- ① Kanada S., Takeguchi Y., Murakami M., Ihara K. and Kouyama T. 2011 Crystal structures of an O-like blue form and an anion-free yellow form of *pharaonis* halorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 413, 162-176. 査読有り
- ② Sudo Y., Ihara K., Kobayashi S., Suzuki D., Irieda H., Kikukawa T., Kandori H. and Homma M. 2011 A microbial rhodopsin with a unique retinal

composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties. *J Biol Chem.* 286, 5967-597. 査読有り

- ③ Nakao Y., Kikukawa T., Shimono K., Tamogami J., Kimitsuki N., Nara T., Unno M., Ihara K. and Kamo N. 2011 Photochemistry of a putative new class of sensory rhodopsin (SRIII) coded by *xop2* of *Haloarcula marismortui*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 102, 45-54. 査読有り
- ④ Kouyama T., Kanada S., Takeguchi Y., Narusawa A., Murakami M. and Ihara K. 2010 Crystal structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*. *J. Mol. Biol.* 396, 564-579. 査読有り

他 4 件

[学会発表] (計 15 件)

- ① 井原邦夫、「RNA-Seq 法による好塩性古細菌の全転写産物解析」、第 24 回 日本 Archaea 研究会、2011 年 9 月 2 日、鶴岡
- ② 井原邦夫、金田創運、北島-井原智美、神山勉、「ハロロドプシンの立体構造と塩素イオン輸送活性」、第 36 回 日本生体エネルギー研究会 / 特定領域「革新ナノバイオ」合同シンポジウム、2010 年 11 月、大阪
- ③ 井原邦夫、金田創運、北島-井原智美、神山勉、「Comparative study of archaeal light driven proton pumps for functional expression in *Escherichia coli*」、第 14 回 レチナル蛋白質国際会議、2010 年 8 月 6-12 日、米 サンタクルツ

他 12 件

[その他]

ホームページ等

<http://lac2.gene.nagoya-u.ac.jp/~ihara/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井原 邦夫 (IHARA KUNIO)
名古屋大学・遺伝子実験施設・助教
研究者番号：90223297

(2) 研究分担者

神山 勉 (KOUYAMA TSUTOMU)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：30170210