

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 5 月 31 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570172

研究課題名（和文）

プロテオロドプシンを中心にしたロドプシンイオンポンプの電気的測定による研究

研究課題名（英文）

Study of rhodopsin-ion pumps by electrical measurement focusing on proteorhodopsin

研究代表者

宗行 英朗（MUNEYUKI EIRO）

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：80219865

研究成果の概要（和文）：本研究では光駆動性イオンポンプであるロドプシンイオンポンプの光エネルギーから電気化学的エネルギーへの変換の性質を調べるために、その一種であるバクテリオロドプシンを高分子薄膜の表面に吸着させ、光照射に伴う電気応答を種々の条件で測定した。その結果バクテリオロドプシンの光起電力は光強度には依存しないが pH 6 付近に最大値を持つことが分かった。また、バクテリオロドプシンと類似したプロテオロドプシンにバクテリオロドプシンと同様のアミノ酸残基を導入する実験を行い、プロテオロドプシンによるプロトンの脱着の pH 依存性が変化することを発見した。イオンポンプ一般に関する理論モデルの構築を行った。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined the photoelectric current generated by bacteriorhodopsin adsorbed on a thin polymer film. An analysis of the experimental results obtained at various light intensities suggested that the electromotive force generated by bacteriorhodopsin was independent of the light intensity. The pH dependency of the photoelectric current suggested that the bacteriorhodopsin could generate the maximum electromotive force at around pH 6. We constructed a mutant of proteorhodopsin which mimics bacteriorhodopsin and found a change in the order of proton uptake and release. We also constructed a general model for ion pumps.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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, 生体エネルギー論, 分子機械, 生物物理

1. 研究開始当初の背景
生体膜に存在するイオンポンプは化学反応

や光反応によるエネルギーを利用してイオンを能動的に輸送し、生体膜の両側に電位差

やイオンの濃度差を形成する。そのことによって、更に他の化学反応や輸送反応が引き起こされるため、イオンポンプはいわば生体エネルギー変換の中心とも言える役割を果たしている。

ロドプシン型のイオンポンプは最初に高度好塩菌からプロトンポンプであるバクテリオロドプシンが発見され、ついで塩化物イオンを輸送するハロロドプシンも発見された。さらに海洋性細菌からプロテオロドプシンが発見されており、地球上の生物による太陽光エネルギーの利用のかなりの部分がこれらのロドプシン型イオンポンプによる可能性が指摘されている。これらのロドプシンイオンポンプは構造的に非常に良く似ており、さらにイオンポンプではない情報伝達に係わる分子にも類似の構造のものがあ、一大ファミリーを形成している。

これらロドプシン型イオンポンプは、光のエネルギーでイオンを輸送するため、実験的には光の ON/OFF で反応が制御出来ること、反応中間体が特有の吸収スペクトルを持つため時間軸に沿って反応の推移が追跡しやすいこと、比較的安定な蛋白で実験条件を広く取れることなど、研究上有利な条件を持っている。そのため分光学的方法により得られる光反応サイクルの速度論的情報と構造情報、X線結晶構造と遺伝子操作による構造の改変の組み合わせなどによって徹底的にそのメカニズムが調べられてきた。しかし、バクテリオロドプシンによるプロトン輸送速度が膜の両側の電位差と pH 勾配によってどの様に影響されるかという非常に基本的な性質についての研究は、上記のような研究では取り上げられず、申請者による電気測定結果とシミュレーションによる研究 (J. Phys. Chem. 100, 19687-19691 (1996), Biophys. J. 78, 1166-1175 (2000)) が、ほとんど唯一のものであった。また、輸送されるイオンの濃度が輸送速度にどのような影響を与えるかなどについても申請者による電気測定による研究 (FEBS Lett. 427, 109-114 (1998), J. Biochem. 125, 270-276 (1999), Biochemistry 38, 5422-5429 (1999), Biophys. J. 83, 1749-1759 (2002)) 以外に系統的な実験はほとんどされてこなかった。また比較的最近発見されたプロテオロドプシンについてはバクテリオロドプシンとの相違がいくつか見つけられているがそれを変異導入で確認した例はまだ少ない。

また、イオンポンプや分子モーターの一般的なモデルとしてはラチェットモデル我欲取り上げられるが、単純なラチェットモデルは逆反応の取り扱いや自律性に問題があった。

2. 研究の目的

本研究では、ロドプシン型光駆動プロトンポ

ンプについて、光強度と最大起電力の関係、溶液の pH と最大起電力の関係などを調べることを目的とした。これらの性質は光エネルギーからイオンの電気化学ポテンシャル差を形成するという問題を考える時にまず第一に解明の目標となるべきことであるが、今まで信頼性のあるデータは取られていなかった。本研究の目的はある意味現象論的とも言えるが、将来の分子レベルでの知識から理解、あるいは説明されるべき事項を明確にすると言う意義を持つ。また、これらの現象論的知見を分子的な知見に結びつけるには変異体の比較が有効であるが、プロテオロドプシンについて変異導入を行い電気測定による結果の比較をすることも中心的な課題に据え、さらに一般的な理論モデルの構築も試みることにした。

3. 研究の方法

(1) バクテリオロドプシンを高分子薄膜の表面に吸着させて光照射に伴う電気応答を観測する実験系の模式図を図 1 に示す。この実験系では光源からの光を PC と電磁シャッターで自動制御して、絶縁性高分子膜に付着したバクテリオロドプシンによる電流を繰り返しデジタル化して記録する。そのため正確な加算平均が可能になり、以前の測定より系統的、定量的な実験が行える。

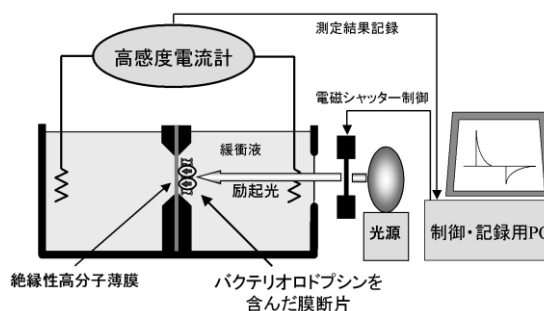


図 1

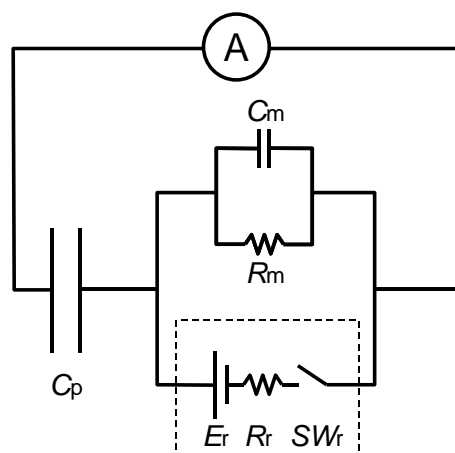
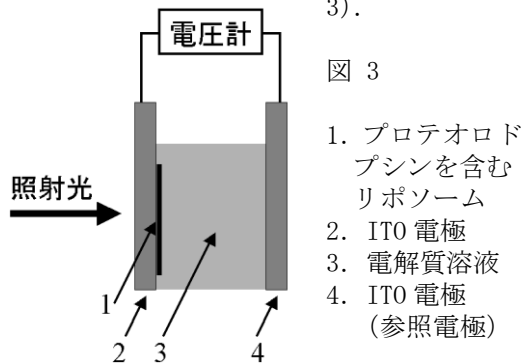


図 2

図1に対応する等価回路を図2に示す。ここで、高分子薄膜はコンデンサー C_p として表現され、バクテリオロドプシンは光照射と共にオンになるスイッチ(SW r)と内部抵抗 R_r 、起電力 E_r が直列になった形(図中点線で囲まれた部分)で表現されるとした。図中でバクテリオロドプシンと並列に入っている C_m と R_m はバクテリオロドプシンが埋まっている紫膜の脂質部分の持つ電気抵抗と静電容量である。

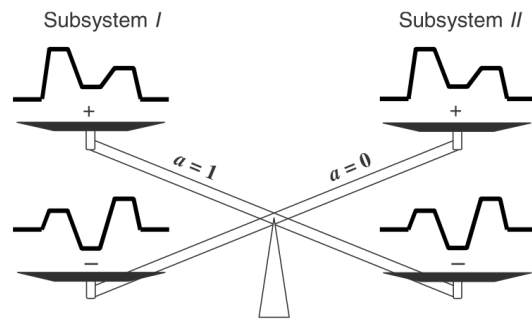
(2) プロテオロドプシンの変異体に用いた電気測定系はITO電極の表面にプロテオロドプシンを含むリポソームを吸着させたもので、プロテオロドプシンからのプロトンの出入りに伴う局所的なpH変化をITO電極の表面電位の変化として捉えることが出来る(図3)。



つまりプロテオロドプシンが最初にプロトンを取り込んでからはきだす場合には、一過的に周りの溶液はアルカリ性になってから中性に戻るのに対して、プロトンを吐き出してから取り込む場合には一過的に酸性になってからアルカリ性になる。この差を定常光の照射開始直後のITO電極の表面電位の変化の正負として捉えることによって出入りの順番を知ることができる。野生型のプロテオロドプシンではバクテリオロドプシンでプロトン遊離に拘わるE194とE204が欠損しており、そのため中性pHでプロトンの出入りの順番はバクテリオロドプシンの「吐きだし→取込」とは逆に「取込→吐き出し」になることが知られているので、この部分にグルタミン酸を導入(M210E, N220E変異体)して、その変化を観察した。

(3) 一般的な理論モデルの構築では、二つのラチェットシステムの揺らぎが関連するように連結したものを考え、一つのシステムでのダウンヒルな流れがもう一つのシステムのアップヒルな流れを誘起する系を考案した(図4)。これは蛋白質の中の異なるサブユニット、あるいはドメイン間のアロステリックな相互作用をモデル化したものである。この系の挙動を、マスター方程式を立てて

Mathematica で数値的に解くことによって解析した。



4. 研究成果

(1) バクテリオロドプシンを高分子薄膜に吸着させた実験系に関して光強度を変えたときの典型的な応答を図5に示す。

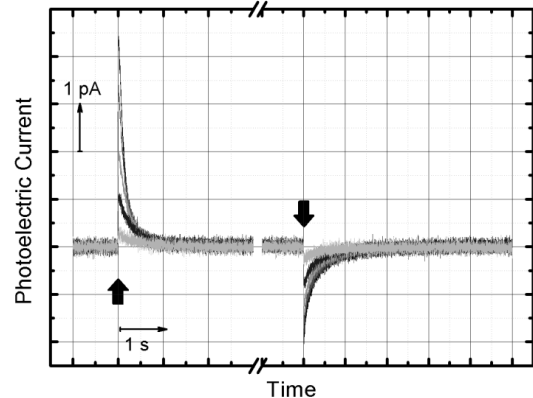


図5. 上向き矢印で光照射開始, 下向き矢印で光照射終了. 応答の大きいものから小さいものへ, 光強度を小さくしていった。

図5に示すような応答について、ピークの高さと減衰の時定数を算出し、等価回路から導かれる表式と比較して、等価回路にある起電力や内部抵抗がどのように変化したかを推定した。その結果、光強度を変化させた場合は、起電力の変化はなく、内部抵抗が変わるように見えることが分かったが、これは多数あるバクテリオロドプシンのうち、光を吸収するものの割合が光強度に比例して多くなるということと整合している。一方、pHを変化させて同様の実験を行った結果、内部抵抗の変化にははっきりとした変化が見えない一方、起電量の方にpH6を中心とした幅の広いピークが認められた。現在バクテリオロドプシンの起電力がどのようなメカニズムで決まるかについては全く研究が進んでおらず、今回の結果は将来の研究による仮説の検証に役立つものと考えている。これらの結果は、2012年5月末の時点で投稿中である。

(2) プロテオロドプシンとその変異体のプロトンの取込, 吐き出しの順番についてバクテリオロドプシンではE194とE204およびその周辺の水分子がプロトン放出団を形成しており, 中性付近では光を吸収するとまずここから細胞外側にプロトンが放出されて, ついで細胞内側からプロトンが取り込まれる. 一方プロテオロドプシンではこれらの酸性残基がなく, プロトンの出入りの順番が逆になっている. そこで一次構造上で対応していると考えられるプロテオロドプシンのM210とN230をグルタミン酸に変異させて, そのプロトンの出入りの順番を野生型と比較した. pHを3, 5, 7, 9, 11と変化させて観察した結果 pH 5で野生型との順番の逆転が観察された(図6).

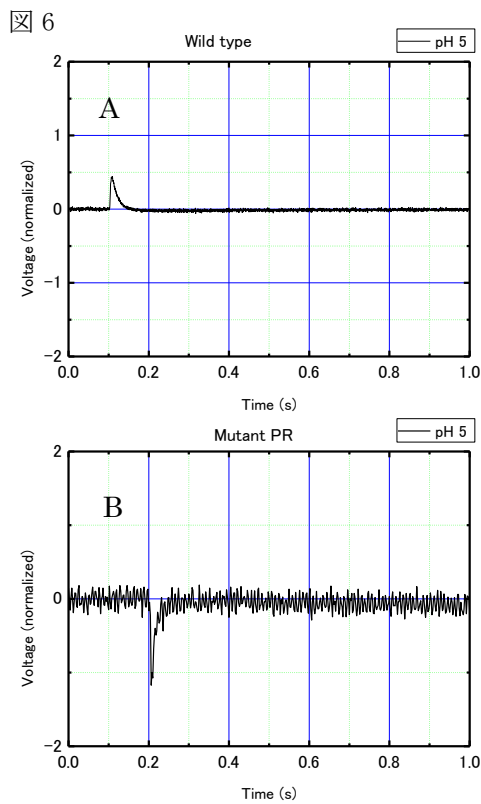


図6 A 野生型, B M210E, N220E 変異体. 信号の大きさは電極に対する吸着量に左右されるので直接の比較はできない.

ただしこの方向の変化は, 単純にプロテオロドプシンがバクテリオロドプシンと似た性質を獲得したと言うことでは説明できず, 更に検討する必要がある.

(3) 一般的な理論モデルの構築
このモデルは, 膜に埋め込まれたポンプが, 膜の左右の二種類の基質の濃度勾配(化学ポテンシャル差)の大小に従って, 化学ポテン

シャル差の大きい基質の流れが小さい基質の逆方向の流れを誘起する対向輸送のモデルとなっている. 図7(a)では, 1番目の基質の膜の左右の濃度(X_{IL}, X_{IR})を(1, 0.5)に固定し, 2番目の基質の膜の左右の濃度(X_{IIL}, X_{IIR})を(1, X_{IIR})として X_{IIR} の変化に対してどのような流れが起こるかを示したもので, ▼のところで二種類の基質の化学ポテンシャルがバランスする. このときには両者とも化学ポテンシャルが減少する側に流れが生じている. 一方, ▲で示した2つの点では, 化学ポテンシャル差の大きい基質が有限の流れを持って化学ポテンシャル差の小さい基質の流れをストップさせている.

図7

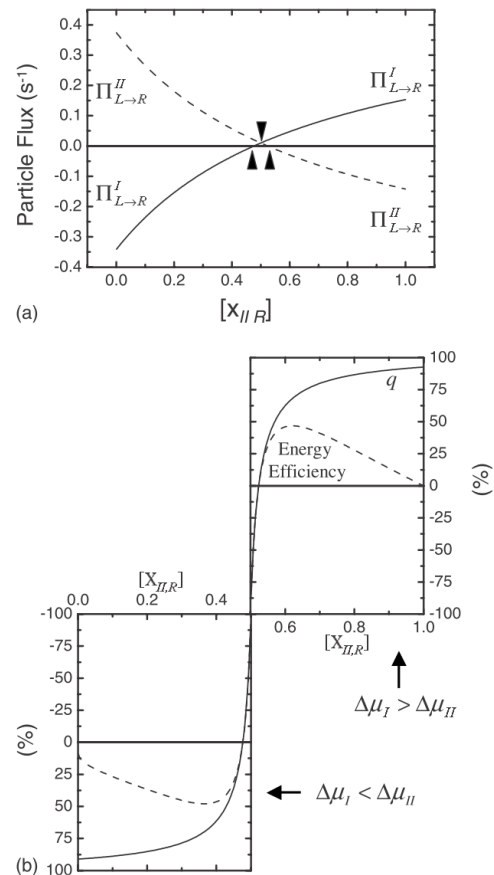


図7(b)では(a)に対応する条件での二つの流れのカップリング比とエネルギー変換効率を示している. 両者は(a)の▲に対応するところで0%, ▼のところで-100%となっている. カップリング比が最大になるのは片側の基質の化学ポテンシャル差が0のところで約90%, エネルギー変換効率は化学ポテンシャル差とカップリング比のかねあいで, 最大で40%強となっている. このように本研究で考案したモデルは駆動力と負荷の大きさに応じて流れの方向が自発的に逆転すること, 駆動力と負荷の大きさに応じて駆動する流れと駆動される流れの

大きさの関係が、非整数で変化すること、非駆動側の流れが0の状態を駆動側が有限の流れで維持すること、など興味深く、かつ生物の分子機械に期待される性質を示しており、実際のイオンポンプの分子機構との関連に興味を持たれる。

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 Muneyuki Eiro, Sekimoto Ken

Allosteric model of an ion pump

Physical Review E

査読 有

81 巻 2010 年 011137-1~9 (9 ページ)

[学会発表] (計 17 件)

①宮崎師夫, 鳥谷部祥一, 上野博史, 宗行英朗

pH dependency of photoelectric current of

bacteriorhodopsin absorbed on Lumirror

membrane

第 49 回日本生物物理学会年会

2011 年 9 月 18 日, 兵庫県立大学

②田母神淳, 菊川峰志, 下野和実, 奈良敏

文, 宗行英朗, 加茂直樹

The fast proton release of proteorhodopsin

at low pH

低 pH 条件下におけるプロテオロドプシンの

速いプロトン放出について

第 49 回日本生物物理学会年会

2011 年 9 月 17 日, 兵庫県立大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗行 英朗 (MUNEYUKI EIRO)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号: 80219865