

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25年 5月 13日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590049

研究課題名（和文）センサーロドプシンの光化学反応

研究課題名（英文） photochemistry of sensory rhodopsin

研究代表者

加茂 直樹（KAMO NAOKI）

北海道大学・ 名誉教授

研究者番号：10001976

研究成果の概要（和文）：高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜には光走性の光受容体であるセンサーロドプシン（SR）が存在する。光照射による水素イオンの移動を明らかにした。機能に重要である M 中間体が不安定であることを示した。水素イオンの移動を時間分解能よく測定する技術を開発した。SR での N 中間の存在を初めて示した。SRIII の光化学反応を詳細に明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the membrane of *Halobacterium salinarum*, there exists sensory rhodopsin (SR) which acts as a photoreceptor of phototaxis of this bacterium. Photo-induced proton transfer of SR was made clear. So-called M-intermediate is considered to be functionally important, but we showed that this intermediate is fragile. We devised the apparatus which can monitor time-resolved photo-induced proton transfer. We first showed a so-called N-intermediate in SR. The photochemistry of SRIII was first clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
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：レチナルタンパク、微生物ロドプシン、ホボロドプシン、ホトサイクル
 ヒロロキシルアミン、レチナル異性化、高度好塩菌

1. 研究開始当初の背景

（1）高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜には、青色の光から逃げるための光センサーであるセンサーロドプシン II（SRII）が存在することがわかっていた。これは北大で発見されたものである。また、正の走光性のレセプターであるセンサーロドプシン I（SRI）が存在することはかなり前（1980年頃）から分かっていた。我々は SRII

を研究のターゲットにすることにしている。

（2）SRII は、膜中でトランスジューサタンパクと相互作用しているが、その相互作用は光照射による水素イオンの移動以外には、何の影響もないことが分かっていた。

（3）光化学中間体のうち、M と言われている中間体が重要であり、また、機能に重要な

アミノ酸残基のいくつかわかってきた。

(4) 新しいセンサーロドプシンの仲間であるものがあり、我々は、**SRIII** と呼んだが、その光化学反応の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

(1) *Natronomonas pharaonis* からの **SRII** は安定であるが、*Halobacterium salinarum* からの **SRII** は不安定なので、安定化する方法を模索し、光化学反応を明らかにしたい。

(2) 速い時間分解能で観測できる水素イオン移動の測定系を開発し、**SR** やその他の微生物ロドプシンに適用したい。

(3) 光走性の測定装置を作成したい。

(4) 光化学反応の詳細を、特に、ホトサイクルの詳細を明らかにしたい。ホトサイクルとは、微生物ロドプシンが光で励起されると、種々の中間体を経て、元の状態に戻ることである。この際の中間体の性質（特に吸収波長）やその寿命を明らかにする。

(5) **SRIII** の光化学反応を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Halobacterium salinarum* の **SRII** は不安定であるのは、光が当たるとであることらしいことが経験的に分かっていたので、どの中間体が不安定であるかを明らかにする。そのために、注目する中間体の寿命を長くする必要があるのである。

(2) ITO（または SnO₂ 透明電極）を用いた時間分解能のよい水素イオン移動測定装置の開発を行う。それを、**SR** はじめとする微生物ロドプシンに適用する。

(3) 現有するフラッシュフォトリスの装置を、特に、光学系、ソフトウェアを改良する。

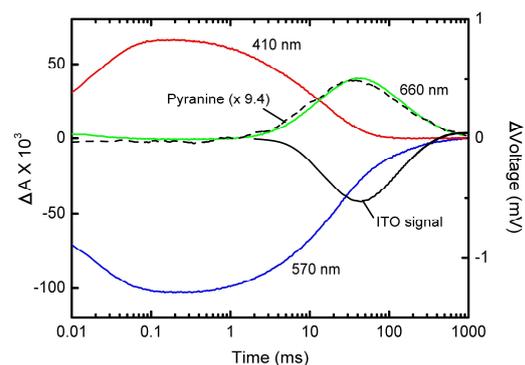
(4) **SR** や **SRIII** をはじめとする微生物ロドプシンを精製して、フラッシュフォトリス実験およびプロトン移動の実験を行う。

4. 研究成果

(1) *Halobacterium salinarum* からの **SRII** の大量発現に多くの時間をかけたが十分な量は取れなかった。そうこうしているうち、ドイツの研究者が大腸菌での発現系を発表したので、それをまねてみたが、確かに **SRII** は作製できるようになり、目的の実験をかるうじて行うことができた。まず、よく知られているように、レチナールタンパクはヒドロキ

シルアミンで、タンパクからレチナールがはずれ、色が無くなる（可視部に吸収が無くなる）。これをブリーチと呼ぶ。ブリーチは光を必要とするので、光化学中間体とヒドロキシルが反応するに違いない。そこで、いろいろな条件（アザイド濃度や光強度）で、いわゆる M 中間体および O 中間体の濃度を変え、ヒドロキシルアミンとの反応速度を測定した。その結果、M 中間体でヒドロキシルアミンと反応していることが示された。ヒドロキシルアミンは水溶性であるので、M 中間体の時に、レチナール近傍が水溶性になるのではないかと推測された。そうだとすれば、ヒドロキシルアミンがなくても、光が当たると、M で水がレチナールの近傍に来て、分解するのではないかと思ひ、暗所と明るいところに保存することで比較したが、大きな効果は得られなかった。むしろ、脂質の中にタンパクを埋め込む（再構成する）ことが効果があることが明らかになった。

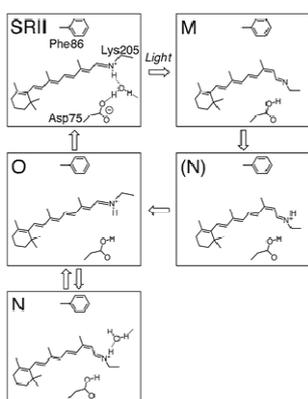
(2) ITO（または酸化スズの薄膜がった透明電極）は表面に OH 基が出ているので、プロトン濃度（pH）に応答することが知られていた。ロドプシンの代表であるバクテリオロドプシンを、この電極の表面に吸着させると、光照射で、この電極に電位が発生することは知られていた。これを利用すると、センサーロドプシンをはじめ、微生物ロドプシンの光照射後のどの中間体で、プロトンの移動があるのかが分かると思った。ところが、問題があり、この応答に時間の差があつてはいけな。そこで、測定アンプや測定系を詳細に検討して、光化学中間体の生成・崩壊と同じぐらいの時間で、プロトンの移動を測定できるようになった。



まず、緑の線は、標準的方法のプロトン移動を測定する pH 感受性色素であるピラニンの吸収変化である。但しピラニンはある特定の pH でしか実験できないが、我々の系では広範囲の pH に適用可能である。ITO シグナルは、我々が開発した ITO のデータである。変化の方向が違うのは分かりやすくするため

で、水素イオンの吸収があり、それから放出が起こることを示している。重要なことの1つは、両者の時間変化がほとんど同じことである。測定が遅れることなく、プロトン移動が測定できることを示している。第2に重要なことは、フラッシュフォトリシスのデータと比較すると、660nmの変化とITOの時間経過が一致していることである。660nmの吸収の変化は、いわゆるO中間体の変化であるので、結論は、O中間体の生成と同時に水素イオンの吸収が起こり、崩壊とともにプロトンの放出が起こることが明らかになった。

(3) 微生物ロドプシンには、いわゆるN中間体が必ずや存在する。しかし、SRにはその存在の報告がない。そこで、*N. pharaonis*のSRII (NpSRII)について詳細に研究した。また、ラマンスペクトルも、佐賀大学の海野先生に測定してもらい、討論も行った。その結果は、N中間体は存在するが、他の微生物ロドプシンとは異なった位置にあることが分かった。図に示すと、次の通りである。



即ち、M中間体のレチナールは13-*cis*であり、シッフ塩基には水素イオンがついていない(deprotonateしている)。O中間体は、上図から分かるように、レチナールはall-*trans*である。即ち、13-*cis*からall-*trans*に変化するには、シッフ塩基にプラスの電荷が必要で、これがN中間体である、しかし、SRIIでは、このN中間体は非常に寿命が短く観測できない。他の微生物ロドプシンでは、このN中間体(上図の右の上から2番目)がフラッシュフォトリシスでよく観測できる。しかしながら、ラマンスペクトルでは、N中間体が存在するのではないかと考えられた。そこで、詳細なフラッシュフォトリシスの実験をしたところ、NとO中間体が平衡にあり、Oに平衡がよっているという結論となった。これは、他の研究者によって示唆されていたが、今回初めて我々が明瞭にした成果である。

(4) SRIIIのホトサイクルも、NpSRIIと同

じであったが、N-O平衡がNによっていた。また、ホトサイクルが非常に遅くて、数10秒もかかった。また、弱い水素イオンの移動も観測された。

(5) SRIIおよびIIIに特有であるこの光化学反応が、このピグメントの機能である負の走光性とどういう関係にあるかという問題となる。そこで、走光性の装置を組み立てて、走光性の実験を行い、興味あるデータが得られたが、現在発表の段階にない。現在、前研究分担者(11年度)の奈良氏が、松山大学の公費で実験を行っている。

(6) レチナールタンパクは、必ず、レチナール近傍に、カルボキシル基が2つある。1つのカルボキシル基は、プロトン化したシッフ塩基からのプロトンを受け取り、また解離することが知られている(これをAとする)。もう1つのカルボキシル基は、常に解離していることが知られている(Bとする)。BのpKaが低いからである。そこで、溶液を酸性にして、pKaが低い(酸性側にある)カルボキシル基のpKaを約3と決めた。それ以下のpHで(即ち、AおよびBの両カルボキシル基は非解離の状態)光照射をすると、不思議なことに、(普段はプロトンの放出のない)Bから水素イオンが放出されることを発見した。この意義は確立していないが、ロドプシン類は光が照射されると、レチナールの異性化が起こる(たとえば、all-*trans*から13-*cis*や9-*cis*)が、この時に、必ず、近傍に陰電荷が必要なのではないかと考えた。それでは、陰電荷がなければ、異性化が起らなければならないと思われるが、光のエネルギーが大きいので、必ず異性化がおこるのであろう。この評価は現在のところないが、将来は評価されるものと信じている。

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12件)

- ① Unno Masashi, Kikukawa Takashi, Kumauchi Masato, Kamo Naoki, Exploring the active site structure of a photoreceptor protein by raman optical activity. *Journal of Physical Chemistry*. 査読有, 117巻 (2013) 1321-325 10.1021/jp4001187
- ② Hayasi Saori, Tamogami Jun, Kikukawa Takashi, Okamoto Haruka, Shimono Kazumi, Miyauchi Seiji, Demura Makoto, Nara Toshifumi, Kamo Naoki, Thermodynamic parameters of anion

- binding to halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis* by isothermal titration calorimetry. *Biophysical Chemistry*. 査読有. 172 巻 (2013) 61-67 10.1016/j.bpc.2013.01.001
- ③ Tamogami Jun, Kikukawa Takashi, Nara Toshifumi, Shimono Kazumi, Demura Makoto, Kamo Naoki. Photoinduced proton release in proteorhodopsin at low pH: The possibility of a decrease in the pKa of Asp227. *Biochemistry* 査読有. 51 巻 (2012) 9290-9301 10.1021/bi300940p
- ④ Tamogami Jun, Kikukawa Takashi, Ikeda Yoichi, Demura Makoto, Nara Toshifumi, Kamo Naoki. Photo-induced bleaching of sensory rhodopsin II (phoborhodopsin) from *Halobacterium salinarum* by hydroxylamine: Identification of the responsible intermediates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 査読有 106 巻 (2012) 87-94 10.1016/j.photobiol.2011.10.09
- ⑤ Tomonaga Yuya, Hidaka Tetsuro, Kawamura Izuru, Nishio Takudo, Osawa Kazuhiro, Okitsu Takashi, Wada Akimori, Sudo Yuki, Kamo Naoki, Ramamoorthy Ayyalusamy, Naito Akira. An active photoreceptor intermediate revealed by in situ photoirradiated solid-state NMR spectroscopy. *Biophysical Journal* 査読有 101 巻 (2011) L50-L52 10.1016/j.bpj.2011.10.022
- ⑥ Dai Gang, Zhang Yu, Tamogami Jun, Demura Makoto, Naoki Kamo, Kandori Hideki, Iwasa Tatsuo. An amino acid residue (S201) in the retinal binding pocket regulates the photoreaction pathway of phoborhodopsin (sensory rhodopsin). *Biochemistry* 査読有, 50 巻 (2011), 7177-7183 10.1021/bi200598r
- ⑦ Tateishi Yusuke, Abe Takayuki, Tamogami Jun, Nakao Yutaka, Kikukawa Takashi, Kamo Naoki, Unno Masashi. Spectroscopic evidence for the formation of an N-intermediate during the photocycle of sensory rhodopsin (phoborhodopsin) from *Natronomonas pharaonis*. *Biochemistry* 査読有, 50 巻 (2011) 2135-2143 10.1021/bi1019572
- [学会発表] (計 8 件)
- ① Kikukawa, T., Kokubo, A., Tsukamoto, T., Ihara, K., Kamo, N., Demura, N., When halorhodopsin does release anion. 15th International Conference on Retinal Proteins 2012. 10.1-5 (ポスター), Monte Verita, Ascona, (Switzerland)
- ② Tamogami, J., Iwano, K., Matsuyama, A., Kikukawa, T., Demura, M., Shimono, K., Nara, T., Kamo, N. The role of chloride in the photo-induced proton transfer in sensory rhodopsin II from *Natronomonas pharaonis* 第 50 回日本生物物理学会年会、2012. 9. 23 名古屋大学 (名古屋市)
- ③ 田母神淳、菊川峰志、下野和実、奈良敏文、宗行英朗、加茂直樹 海洋細菌由来のロドプシン様タンパク質プロテオロドプシンの低 pH 条件下における速いプロトン放出機構。日本薬学会第 132 年会 2011. 3. 30 北海道大学 (札幌市)
- ④ 奈良敏文、菊川峰志、田母神淳、加茂直樹 Laser flash analysis of functional interaction between sensory rhodopsin NpSR II (ppR) and eubacterial chemoreceptor Tsr in *E. coli*. 第 48 回日本生物物理学会、2010. 9. 20 東北大学 (仙台市)
- ⑤ 田母神淳、菊川峰志、池田陽一、出村誠、加茂直樹 センサリーロドプシン II のヒドロキシルアミンによる退色反応。第 10 回蛋白質科学会年会 2010. 6. 18 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ⑥ 田母神淳、菊川峰志、池田陽一、出村誠、加茂直樹 センサリーロドプシン II のヒドロキシルアミンによる退色反応。題 10 回蛋白質科学会年会 2010. 6. 18 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

現在名誉教授なので、ホームページはない。
一昨年度まで在籍していた松山大学は
http://ghp01.matsuyama-u.ac.jp/~yakugaku/laboratory/labo_biophysical-chemistry.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加茂 直樹 (KAMO NAOKI)
北海道大学・名誉教授
研究者番号：10001976

(2) 研究分担者

奈良 敏文 (NARA TOSHIFUMI)
松山大学・薬学部・准教授
研究者番号：30241350
但し、2011年度 (H23年) のみ

(3) 連携研究者

なし