

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26440042

研究課題名(和文) 光駆動型ナトリウムポンプの生理的意義とイオン輸送機構の解明

研究課題名(英文) Study on the physiological significance and the molecular mechanism of Na<sup>+</sup>-pumping rhodopsin

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：微生物型ロドプシンは、色素レチナールを内包する膜タンパク質である。レチナールの光吸収をきっかけとして、複数の構造の異なる中間体を経由する光反応サイクルを周り、この間にイオンの膜輸送や光情報伝達を行う。本研究では、外向きにNa<sup>+</sup>を輸送するNa<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシン(NaR)の機能解析を行い、以下の成果を得た。1) タンパク質表面へのカチオン結合が暗状態の構造を変調し、光反応初期に出現する中間体を決定する。2) NaRのNa<sup>+</sup>取込みと放出が、0中間体の生成・崩壊に同期して起こることを、Na<sup>+</sup>濃度変化の直接観測から明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Microbial rhodopsins are photoactive membrane proteins containing the chromophore retinal. Upon light absorption, they undergo the cyclic photoreactions and exert respective functions such as various ion transports and the light signal transductions. Here, we performed functional analyses of the outward Na<sup>+</sup> pumping rhodopsin (NaR). The results are summarized as follows: 1) There exists a cation binding site on the NaR surface. The cation binding distorts the protein structure in the dark state, and then influences the early intermediates formed after photoexcitation. 2) Na<sup>+</sup> uptake and release reactions were directly detected by the photo-induced changes of Na<sup>+</sup> concentration. These reactions occurred almost simultaneously with the formation and decay of 0 intermediate, respectively.

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 フォトサイクル レチナール 膜蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

高等動物の網膜には、視覚の光センサーとして機能する膜タンパク質“ロドプシン”が存在する。1999年以降、ロドプシンの仲間、あらゆる環境に生息する様々な単細胞微生物から見出されるようになった。現在では、光エネルギーを利用して、イオンの膜を隔てた輸送(膜輸送)を行うロドプシン(イオンポンプ型ロドプシン)が微生物界には普遍的に存在することが明らかとなってきた。

物質の膜輸送を行うタンパク質は、構造の異なる複数の輸送中間体を經由することで膜輸送を行う。通常の輸送タンパク質では、中間体を実験的に捉えることは難しい。したがって、詳細な分子機構の解明も困難である。一方、イオンポンプ型ロドプシンは、光で瞬間的に活性化できる特徴のために、その後を經由する中間体を、時間を追いながら順番に解析することが可能である。そのため、従来から知られていたH<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンやCl<sup>-</sup>ポンプ型ロドプシンは、膜輸送のモデルタンパク質として、分子機構の詳細な解析が行われてきた。

本研究では、2013年に見出されたNa<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンに注目した。Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンは、海洋をはじめとして、様々な環境に生息する真正細菌に分布しており、自然界に広く存在すると考えられている。イオンポンプ型ロドプシンの活性中心は、レチナールと特定のLys残基を結ぶプロトン化したシッフ塩基である。イオンポンプ型ロドプシンによって輸送されるイオンは、プロトン化シッフ塩基近傍に結合する必要があると考えられてきた。事実、H<sup>+</sup>ポンプでは、シッフ塩基に結合しているH<sup>+</sup>自身が運ばれるし、Cl<sup>-</sup>ポンプでは、プロトン化シッフ塩基の対イオンとして結合したCl<sup>-</sup>が運ばれる。一方、Na<sup>+</sup>のような陽イオンは、静電的な反発のため、プロトン化シッフ塩基近傍に結合するとは考え難い。そのため、H<sup>+</sup>以外の陽イオンポンプは存在しないと予想されてきた。Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンはこの「常識」を覆した存在として注目されている。

### 2. 研究の目的

新規のイオンポンプ型ロドプシンであるNa<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンを研究対象とし、以下の2点を目的とする研究を行った。

- (1) Na<sup>+</sup>ポンプ活性の生理的役割を明らかにすること。
- (2) 光活性化後の過渡的応答を観測し、分子機構を明らかとすること。

### 3. 研究の方法

(1) Na<sup>+</sup>ポンプ活性の生理的役割の解明  
Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンを保持する細菌はH<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンも保持している。これらの菌を試料に用いた場合は、両者の働きを区別して観測することは難しい。唯一種、好熱性の *Truepera radiovictrix* だけは、NaR の

遺伝子のみを保持していることが、ゲノム解析から解っていた。そこで、この菌の増殖速度と細胞内ATP量に与える光照射の影響を観測した。しかし、様々な条件下で培養を行ったが、明確な光照射の影響は観測できなかった。そのため、下の研究成果欄には、この結果は記載しない。

#### (2) 過渡吸収分光測定

中間体の吸収スペクトルが互いに異なる事を利用して、中間体の吸収スペクトルと出現順序を決定した。本研究では、532 nm、7 nsec のパルスレーザを励起光に用いて、400~700 nm の範囲で起こる吸光度変化を測定し、解析に用いた。上述の *T. radiovictrix* 由来の二つのNa<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシン TR1、TR2のうち、大腸菌発現系での発現量が多かったTR1を測定対象とした。

#### (3) Na<sup>+</sup>及びH<sup>+</sup>輸送活性の測定

Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンは、Na<sup>+</sup>が存在する場合は外向きのNa<sup>+</sup>ポンプとして働き、それ以外の場合は外向きのH<sup>+</sup>ポンプとして働くことが報告されている。TR1を発現した大腸菌懸濁液の光誘起pH変化によって、これらの輸送活性を測定した。H<sup>+</sup>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<sup>+</sup>輸送活性は、これによる細胞内負の膜電位がH<sup>+</sup>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。

#### (4) Na<sup>+</sup>選択膜を用いた光誘起Na<sup>+</sup>濃度変化の測定

Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンが光照射時に起こすNa<sup>+</sup>濃度変化を、Na<sup>+</sup>選択膜を隔てた膜電位変化として検出することを試みた。Na<sup>+</sup>選択膜は、Na<sup>+</sup>イオノフォアとして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て作製した。Na<sup>+</sup>選択膜によって、バッファ溶液を二つに隔てる電気化学セルを構築し、片側のバッファにNa<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンを分散、または、Na<sup>+</sup>選択膜の片側にNa<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンを吸着させ、二つのバッファ間の光誘起電位差変化を観測した。電位変化を大きくするためには、バッファ中のNa<sup>+</sup>濃度を低くする必要がある。そのため、低いNa<sup>+</sup>濃度でもポンプとして機能すると報告されている、*Gillisia limnaea* 由来のNa<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンGLRを用いた。大腸菌発現系から精製したGLRを卵黄フォスファチジルコリンに再構成して得た膜片を試料とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 光反応サイクルの解析

過渡吸収分光法を用いて、TR1の光反応サイクルを調べた。TR1は可溶化状態では構造が不安定となり、失活しやすかった。また、大

腸菌膜中に含まれている状態と、それを可溶化後に脂質膜へ再構成した状態では、後半の光反応サイクルに違いが認められた。再構成状態では、可溶化状態と似た光反応サイクルを示したため、本実験では、大腸菌膜から TR1 を含む膜片を調製し、それをアクリルアミドゲル中に固定したものを試料として用いた。

タンパク質表面へのカチオン結合による光反応サイクルの変調

Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンは、光反応を開始した後に、輸送基質である Na<sup>+</sup>を細胞質側から取込み、次いで、細胞外側から放出することで、外向きの Na<sup>+</sup>輸送を実現していると考えられている。しかし、輸送はされないが、Na<sup>+</sup>や K<sup>+</sup>が暗状態のタンパク質に結合しているという報告もある。そこで、これらのカチオン結合の有無と役割を検討した。

TR1 の光反応サイクルを、NaCl, KCl, Choline Cl 中で測定した。Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンは、Na<sup>+</sup>が存在しない条件では、H<sup>+</sup>ポンプとして機能することが報告されている。しかし、TR1 は、3つの溶液中で互いに異なる光反応サイクルを示した。NaCl と KCl 中では、msec 領域までに現れる中間体は類似していたが、それ以降に現れる中間体に違いが生じていた。一方、Choline Cl 中では、光励起後 10 μsec の時点で既に、他の二つとは異なる中間体が現れていた。Choline はサイズの大きい有機カチオンであるため、タンパク質と直接相互作用するとは考え難い。事実、バッファー成分のみを含む溶液中では、Choline Cl 中とほぼ等しい光反応サイクルが観測された。

上述した通り、NaCl と KCl 中の光反応サイクルは、光励起後 10 μsec の時点で、既に Choline Cl とは異なっていた。これほど短い時間領域で、Na<sup>+</sup>あるいは K<sup>+</sup>がタンパク質内部に取り込まれるとは考え難い。したがって、Choline Cl 中の光反応サイクルとの違いは、暗状態において、既に Na<sup>+</sup>あるいは K<sup>+</sup>がタンパク質に結合していたために生じたと考えられる。

暗状態の TR1 の吸収スペクトルは、NaCl, KCl, Choline Cl 中で等しかった。このことは、Na<sup>+</sup>と K<sup>+</sup>はレチナル近傍には結合しないという先行研究の結果と矛盾しない。よって、上述した暗状態における Na<sup>+</sup>と K<sup>+</sup>の結合は、タンパク質表面の同じサイトへの結合であり、これによって、光反応初期に起こる構造変化が決定され、両者において同一の中間体が生成すると考えられる。

K<sup>+</sup>結合が H<sup>+</sup>ポンプ活性に及ぼす影響を調べるために、KCl 中と Choline Cl 中における H<sup>+</sup>ポンプ活性を調べた。その結果、K<sup>+</sup>濃度の増加とともに、H<sup>+</sup>ポンプ活性が減弱することが解った。よって、タンパク質表面へカチオンが結合することで、H<sup>+</sup>をポンプしない光反応サイクルを回すようになり、さらに溶液中に Na<sup>+</sup>が存在する場合には、それを取込み輸

送するサイクルに分岐すると考えられる。溶液中に K<sup>+</sup>のみが存在する場合には、何も輸送しないサイクルを回ると考えられる。

#### Na<sup>+</sup>取込み過程

NaCl 中と KCl 中の光反応サイクルの詳細な解析を行った。その結果、どちらの光反応サイクルも、4つの速度論的に区別できる中間体を順に經由することが解った。両者の初期二つの中間体は、吸収スペクトルも崩壊速度も、ほぼ等しかった。しかし、後期二つの中間体には違いが見られた。NaCl 中の二つの中間体は、いずれも、KCl 中よりも崩壊速度が速かった。さらに、NaCl 中の3番目の中間体は、KCl 中に比べて大きく長波長側にシフトした吸収スペクトルを持っていた。これは、他の Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンでも観測される 0 中間体に対応する中間体である。よって、Na<sup>+</sup>存在下では、0 中間体の生成時に Na<sup>+</sup>が取り込まれると考えられる。

#### (2) 光誘起 Na<sup>+</sup>濃度変化の直接観測

##### Na<sup>+</sup>選択膜を用いた測定系の構築

上述した通り、Na<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンは、光反応を開始してから、Na<sup>+</sup>をタンパク質内部に取込み、次いで、放出すると考えられている。しかし、この考えは、Na<sup>+</sup>の動きを直接観測した結果ではなく、過渡吸収分光測定で観測される「中間体の吸収スペクトル変化」に基づいている。そこで、より直接的な結果を得るため、Na<sup>+</sup>選択膜を用いた測定を行った。クラウン化合物をイオノフォアとして用いることで、0.1 mM ~ 1 M の Na<sup>+</sup>濃度範囲で、直線的な膜電位応答を示す Na<sup>+</sup>選択膜を得た。

##### Na<sup>+</sup>取込み先行型の光反応サイクル

Na<sup>+</sup>選択膜に脂質再構成した GLR を吸着させ、ステップ状の光を照射したところ、Na<sup>+</sup>濃度の減少を示す膜電位変化が観測された。H<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンや、GLR の活性消失変異体を吸着させた場合は、光誘起電位変化は観測されなかった。よって、光活性化された GLR による Na<sup>+</sup>濃度変化が観測されていることが確認できた。さらに、この系にパルスレーザを導入し、光誘起膜電位変化の時間分解測定をおこなった。その結果、0 中間体の生成・崩壊にほぼ同期して、Na<sup>+</sup>の取込みと放出が起こることが解った。

#### 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6件)

Kajimoto, K., Kikukawa, T., Nakashima, H., Yamaryo, H., Saito, Y., Fujisawa, T., Demura, M., Unno, M., Transient Resonance Raman Spectroscopy of a Light-Driven Sodium-Ion-Pump Rhodopsin from *Indibacter alkaliphilus*, *J. Phys. Chem. B.*, 121:

4431-4437 (2017), DOI:  
10.1021/acs.jpcc.7b02421, 査読有

Nakamura, S., Kikukawa, T., Tamogami, J., Kamiya, M., Aizawa, T., Hahn, M., Ihara, K., Kamo, N., Demura, M., Photochemical characterization of actinorhodopsin and its functional existence in the natural host, *BBA-BIOENERGETICS*, 1857: 1900-1908 (2016), DOI:  
10.1016/j.bbabi.2016.09.006, 査読有

Hasemi, T., Kikukawa, T., Kamo, N., Demura, M., Characterization of a Cyanobacterial Chloride-Pumping Rhodopsin and its Conversion into a Proton Pump, *J. Biol. Chem.* 291: 355-362 (2016), DOI: 10.1074/jbc.M115.688614, 査読有

Kikukawa, T., Kusakabe, C., Kokubo, A., Tsukamoto, T., Kamiya, M., Aizawa, T., Ihara, K., Kamo, N., Demura, M., Probing the Cl<sup>-</sup>-pumping photocycle of *pharaonis* halorhodopsin: Examinations with bacterioruberin, an intrinsic dye, and membrane potential-induced modulation of the photocycle, *BBA-BIOENERGETICS*, 1847: 748-758 (2015), DOI:  
10.1016/j.bbabi.2015.05.002, 査読有

Tamogami, J., Iwano, K., Matsuyama, A., Kikukawa, T., Demura, M., Nara, T., Kamo, N., The effects of chloride ion binding on the photochemical properties of sensory rhodopsin II from *Natronomonas pharaonis*, *J. Photochem. Photobiol. Sci.*, 141: 192-201 (2014), DOI:  
10.1016/j.jphotobiol.2014.10.010, 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

Hasemi, T., Photocycle of *Mastigocladopsis repens* halorhodopsin and the role of its TSD motif, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月 27 日, つくば国際会議場(茨城県・筑波)

Nishiya, K., Replacements of “donor” residues in the light-driven H<sup>+</sup>-pump rhodopsins, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月 25 日, つくば国際会議場(茨城県・筑波)

Kikukawa, T., Light-induced conformational change of inward Cl<sup>-</sup> pump halorhodopsin, 13th International Conference on Flow Dynamics, 2016 年 10 月 11 日, 仙台国際センター(宮城県・仙台)

Hasemi, T., Conversion of a novel

chloride pumping rhodopsin to a proton pump with a single amino acid replacement, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13 日, 金沢大学(石川県・金沢)

Shimosaka, A., Functionally important residues in the cytoplasmic half channel of light-driven Cl<sup>-</sup> pump *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13 日, 金沢大学(石川県・金沢)

Goto, K., Functional analyses of Na<sup>+</sup>-pumping rhodopsin from *Truepera radiovictrix*, 第 52 回日本生物物理学会年会, 2014 年 9 月 25 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菊川 峰志(KIKUKAWA Takashi)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・講師

研究者番号:20281842

### (2) 研究分担者

宮内 正二(MIYAUCHI Seiji)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号:30202352