

平成 21 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19614001

研究課題名 (和文) 光駆動型アニオンポンプ蛋白質：ハロロドプシンの分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms in light-driven anion pump of halorhodopsin

研究代表者

菊川 峰志 (KIKUKAWA TAKASHI)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：20281842

研究成果の概要 (和文)：高度好塩菌の細胞膜に存在するハロロドプシンは、光エネルギーを用いて、Cl⁻イオンを細胞外から細胞内へ輸送するイオンポンプ膜タンパク質である。その分子機構解明に寄与するため、野生型、及び、アミノ酸置換した複数の変異体を用いた解析を行い、以下の知見を得た。(1)活性中心近傍の酸性及び芳香族アミノ酸残基は、輸送の初期過程において重要な役割を果たす。(2)輸送サイクル中に現れる、Cl⁻濃度依存的な二つの中間体の平衡状態は、Cl⁻放出過程を反映している。(3)Cl⁻放出時には、蛋白質の細胞質側チャネルが水和し、Cl⁻放出状態が安定化する。

研究成果の概要 (英文)：Halorhodopsin in the cytoplasmic membrane of highly halophilic archaea functions as an inward-directed light-driven Cl⁻ pump. To address the pump mechanism, we performed analyses using the wild-type and single amino acid mutants. The results can be summarized as follows: (1) acidic and aromatic residues in the vicinity of the active site play an essential role in early step of the Cl⁻ transport, (2) Cl⁻-dependent equilibrium of photo-intermediates after flash excitation represents the Cl⁻-releasing process at the cytoplasmic side, (3) transient hydration of the cytoplasmic channel stabilizes the Cl⁻ releasing state.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：光生命科学

キーワード：ハロロドプシン、フォトサイクル、アニオンポンプ、膜タンパク質、レチナール

1. 研究開始当初の背景

- (1) 高等動物の網膜に存在する光受容体 (ロドプシン) と同じく、レチナールを発

色団とする膜タンパク質が、微生物界にも広く分布することが近年明らかとなってきた。これらの機能は、光を利用したエネ

ルギー産生に係わる光駆動型イオンポンプと、光を情報として利用するためのセンサーに2分される。本研究では、高度好塩菌 *Natronomonas pharaonis* の光駆動型イオンポンプ、ハロロドプシン (NpHR) のイオン輸送機構に着目した。

(2) 近年、光によってイオンを輸送する微生物型ロドプシンを、神経細胞の興奮/抑制制御に応用する試みが報告されてきた。2007年には、NpHRが、興奮抑制に有効であることが示され、以後、このような試みが大きな注目を集めてきている。したがって、NpHRの分子機構の解明は、分子科学の面だけでなく、光スイッチング素子としての応用の面からも重要である。

(3) NpHRは、他の微生物型ロドプシンと同様に、内包するレチナールの光異性化をきっかけとして、吸収スペクトルと構造の異なる複数の中間体を經由して元に戻るサイクリックな光反応(フォトサイクル)を示す。この間に1個のCl⁻を細胞外から細胞内へ輸送する。パルスレーザを励起光に用いた過渡吸収分光測定(フラッシュフォトリス)によって、我々を含めた3つのグループが、フォトサイクルモデルを提出してきているが、まだ確定されていない。

(4) フォトサイクルモデルが未成熟であることが示すように、NpHRの分子機構の研究は、H⁺ポンプであるバクテリオロドプシンと比較すると、大きく遅れている。しかし、近年、結晶構造が高解像度で明らかにされたこと、さらに我々の研究グループによって、大腸菌発現系と、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた活性測定系が確立されたことにより、今後の研究進展の基盤が形成されてきた。

2. 研究の目的

NpHRの分子機構の解明に寄与するため、以下の3点を具体的な目標とした。

(1) フォトサイクルモデルの精密化

分子機構を考察する上で、正しいフォトサイクルモデルを得ることは重要である。我々のモデルをより確かなものとするため、変異体を用いた解析を行った。

(2) 輸送に係わる重要アミノ酸残基の同定とその役割の決定

レチナールは、NpHRのほぼ中央付近に存在するLys残基にプロトン化シッフ塩基を介して結合している。暗状態のNpHRは、このプロトン化シッフ塩基の細胞外側近傍に結合している。この付近に存在し、Cl⁻と静電的

な相互作用をしている残基は、輸送機能の重要な役割を担っている可能性が高い。そのような残基の同定とその役割の推定を目指した。

(3) フォトサイクル中に起こる構造変化の検出

フォトサイクル中に、実際に起こっている構造変化を明らかにすることは、イオン輸送機構を考える上で、非常に重要である。本研究では、その最初のステップとして、蛋白質の体積変化を伴うような比較的大きな構造変化の検出を目指した。

3. 研究の方法

(1) フラッシュフォトリス

上述したとおり、フォトサイクル中に出現する中間体は、吸収スペクトルがそれぞれ異なる。したがって、フラッシュ光を用いてNpHRを励起し、その後起こる吸光度変化を経時的に測定することで、各中間体の吸収スペクトルと出現タイミングを解析できる。本研究では、530 nm、約5 nsecの時間幅をもつパルスレーザを励起光に用い、400~700 nmの範囲で起こる吸光度変化を測定した。野生型及び変異体NpHRは、大腸菌発現系を用いて作成した。

(2) Cl⁻輸送活性の測定

アフリカツメガエル卵母細胞発現系と高度好塩菌発現系を用いる二つの方法で輸送活性を評価した。前者は、NpHRを発現した卵母細胞に電極を刺入し、膜を横切って流れる光電流を測定する方法である。後者は、NpHRを発現した膜ベシクルを調製し、Cl⁻輸送によって二次的に生じるベシクル外液のpH変化を測定する方法である。前者は、測定精度に優れた方法であるが、外液のNaCl濃度は約100 mMまでに制限される。一方、後者では、約4 Mまでの高濃度NaCl存在下で測定可能である。

(3) フォトサイクル中の蛋白質体積変化の検出

中間体間の遷移が、大きな構造変化を伴う場合、同時に、蛋白質の体積変化が起こることが期待される。このような場合、中間体の遷移速度と中間体間の平衡状態に圧力依存性が現れる。このような過程を検出するため、本研究では、高圧力下のフラッシュフォトリス測定を行った。

4. 研究成果

(1) フォトサイクルモデルの精密化

我々が、野生型NpHRのフラッシュフォトリスによる解析から得たモデルは、
$$\text{NpHR} \rightleftharpoons \text{K} \rightarrow \text{L1} \rightarrow \text{L2} \rightarrow \text{N} \rightleftharpoons \text{O} \rightarrow \text{NpHR}' \rightarrow \text{NpHR}$$

であり、 $N \rightarrow 0$ において、C1-の細胞質側への放出が、 $0 \rightarrow NpHR'$ において、細胞外側からの取込みが起こるといものである。 N と 0 中間体は、C1-濃度依存的な速い平衡状態として同時に観測されることから、 0 中間体がC1-を解離した状態であること、さらに、この過渡的な平衡状態のC1-に対する解離定数は、約 1 M と見積もられている。しかし、 N と 0 中間体が同時に観測されるために、これらの出現順序を明確に規定する実験事実は得られていない。この問題を解決するため、細胞質側でのC1-放出過程を修飾するアミノ酸残基の探索と、その変異がフォトサイクルに及ぼす影響を調べた。

NpHRの細胞質側チャンネルと考えられる領域は、非常に疎水性が高く、親水的な残基は、僅か2残基のThrであると考えられる。これらが、C1-放出過程に深く関与していることを予想し、疎水的な残基への変異の影響を調べた。これらの変異体の暗状態におけるC1-結合強度は野生型と同様であった。しかし、 $N \rightleftharpoons 0$ 平衡のC1-濃度依存性は大きく変化し、C1-の解離定数は、いずれも疎水的な残基への変異によって、野生型の約 $1/3 \sim 1/10$ 程度へと減少した。このことから、細胞質側チャンネルのThr残基は、細胞質側でのC1-放出時に、C1-への結合強度を弱める機構に関与すること。さらに、中間体は $N \rightarrow 0$ の順序で生成し、この間に、細胞質側への放出が起こることが明らかとなった。

(2) 輸送に係わる重要アミノ酸残基の同定とその役割の決定

暗状態で結合しているC1-近傍には、複数の親水的な残基が存在し、水分子も含めた水素結合ネットワークを形成している。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた解析によって、Tyr82, Asp252が特に輸送活性に重要であることが明らかとなった。これらの残基の変異によって、C1-輸送活性は完全に消失した。また、変異体のフォトサイクルは、いずれも、長波長側に吸収を持つ中間体が形成し、その後、他の中間体に移行することなく、初期状態に復帰していた。この長波長側中間体は、初期K中間体であると考えられる。したがって、これらの残基は、 $K \rightarrow L1$ 遷移に重要であることが予想される。一方、好塩菌膜ベシクルを用いた解析によって、これらの変異体の輸送活性は、高C1-濃度下で、一部、回復することが明らかとなった。この結果から、NpHRの暗状態には、シッフ塩基近傍以外の部位にも、比較的高い解離定数をもつC1-結合サイトが存在すること。ここへのC1-の結合によって、シッフ塩基近傍の水素結合ネットワークが最適化され、輸送活性が復活することが予想される。しかし、このC1-結合サイトの決定、及び、これらの残基の具体的な役

割の決定は、今後の課題である。

(3) フォトサイクル中に起こる構造変化の検出

本研究では、蛋白質の体積変化を伴うような、比較的、大きな構造変化を、フォトサイクルの圧力依存性から検出することを試みた。その結果、上述した $N \rightleftharpoons 0$ 平衡状態には、圧力依存性があり、圧力上昇と共に、平衡がN側へ偏ること、すなわち、 0 中間体は、N中間体に比べ、体積が大きいことが明らかとなった。暗状態のNpHRは、C1-を約 1 mM の解離定数で結合するが、C1-の細胞質側への放出時($N \rightarrow 0$)には、この解離定数が約 1 M まで上昇すること。一方、細胞質側チャンネルは疎水性が高く、暗状態の細胞質側チャンネルには、水分子が殆ど存在しないこと。これらの事実を踏まえると、 0 中間体時の体積増加は、細胞質側チャンネルへの水分子の流入を反映していると予想される。H⁺ポンプであるバクテリオロドプシンでは、フォトサイクル中に6番目のヘリックスが外側へ開き、細胞質側チャンネルに水分子が流入することが報告されている。NpHRでも同様の構造変化が 0 中間体時に起こり、この場合に流入する水分子は、C1-を放出した状態(0 中間体)を安定化するように働いていると予想される。構造変化のタイミングと規模は、本研究により明らかとなった。しかし、構造変化部位などの詳細の解明は、今後の研究課題である。

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18件)

①Takanori Sasaki, Tomoyasu Aizawa, Masakatsu Kamiya, Takashi Kikukawa, Keiichi Kawano, Naoki Kamo, Makoto Demura, 2009, Effect of Chloride Binding on the Thermal Trimer-Monomer Conversion of Halorhodopsin in the Solubilized System, *Biochemistry* 48: 12089-12095 (査読有)

②Megumi Kubo, Takashi Kikukawa, Seiji Miyauchi, Akiteru Seki, Masakatsu Kamiya, Tomoyasu Aizawa, Keiichi Kawano, Naoki Kamo and Makoto Demura, 2009, Role of Arg123 in light-driven anion pump mechanisms of *pharaonis* halorhodopsin, *Photochem. Photobiol.*, 85: 547-555 (査読有)

③Takanori Sasaki, Megumi Kubo, Takashi Kikukawa, Masakatsu Kamiya, Tomoyasu Aizawa, Keiichi Kawano, Naoki Kamo, Makoto Demura, 2009, Halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis* forms a trimer even in the presence of a detergent,

dodecyl- β -D-maltoside, *Photochem. Photobiol.* 85: 130-136 (査読有)

④ Akiteru Seki, Seiji Miyauchi, Saori Hayashi, Takashi Kikukawa, Megumi Kubo, Makoto Demura, Vadivel Ganapathy, Naoki Kamo, 2007, Heterologous expression of *pharaonis* halorhodopsin in *Xenopus laevis* oocytes and electrophysiological characterization of its light-driven Cl⁻ pump activity, *Biophys. J.*, 92:2559-2569 (査読有)

⑤ Chisa Hasegawa, Takashi Kikukawa, Seiji Miyauchi, Akiteru Seki, Yuki Sudo, Megumi Kubo, Makoto Demura, Naoki Kamo, 2007, Interaction of the Halobacterial Transducer to a Halorhodopsin Mutant Engineered so as to Bind the Transducer: Cl⁻ Circulation within the Extracellular Channel, *Photochem. Photobiol.*, 83: 293-302 (査読有)

[学会発表] (計 42 件)

① 宮内正二, 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回年会, 2010年3月29日, 岡山市

② 菊川峰志, フェ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, 徳島市

③ Takashi Kikukawa, Role of the aspartic acid residue adjacent to the retinylidene Schiff base in the light-driven Cl⁻ pump halorhodopsin, 15th International Congress on Photobiology (ICP), 2009年6月23日, Düsseldorf, Germany

④ 菊川峰志, 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, 福岡市

⑤ 宮内正二, 光駆動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, 札幌市

⑥ Naoki Kamo, Important amino acid residues for function of halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*, a light-driven Cl⁻ pump, 4th Asia Oceania Conference on Photobiology, 2008年11月, Varanasi, India

⑦ Naoki Kamo, Important amino acid residues on functioning in halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*, NpHR, 13th International Conference on Retinal Proteins, 2008年6月, Barcelona, Spain

⑧ 菊川峰志, 浸透圧を加えた条件下における

ハロロドプシンの光化学反応, 第45回日本生物物理学会年会, 2007年12月23日, 横浜市

⑨ Seiji Miyauchi, Identification of a crucial residue involved in the translocation of Cl⁻ via a light-driven Cl⁻ pump, 第29回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2007年11月27日, 仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊川 峰志 (KIKUKAWA TAKASHI)
北海道大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号: 20281842

(2) 研究分担者

宮内 正二 (MIYAUCHI SEIJI)
松山大学・薬学部・教授
研究者番号: 30202352