

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：36301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790059

研究課題名(和文) センサリーロドプシンに見出された新規中間体の性質と生理的役割について

研究課題名(英文) Role of a novel photoproduct found in sensory rhodopsin II in the function and its characterization

研究代表者

田母神 淳 (TAMOGAMI, Jun)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：30580089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：センサリーロドプシンII (SRII) は、細菌の負の走光性を司る光受容タンパク質である。本研究では、Halobacterium salinarum由来のSRIIへの連続光照射により形成される長寿命の光中間体(Mlike中間体)の性質の解析と生理条件下における役割を明らかにすることを目的とする。水溶性試薬ヒドロキシルアミンを用いた実験から、Mlike中間体時のタンパク質内部の親水的な環境の変化が観測された。また、レチナール近傍に位置する2つのアミノ酸残基(Asp103、Ser201)への変異導入による走光性機能への影響も調べられた。

研究成果の概要(英文)：Sensory rhodopsin II (SRII) is a photophobic receptor protein in halobacteria. In this study, we attempted to characterize a long-lived photoproduct (Mlike intermediate) that was formed in SRII from Halobacterium salinarum under continuous illumination and reveal the physiological role of it. Through the experiment using hydroxylamine, a water-soluble reagent, the hydrophilic environmental change in the protein interior at Mlike state was observed. In addition, the effects of the mutation of two amino acid residues (Asp103 and Ser201) located in the vicinity of the retinal on the phototaxis were investigated.

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：センサリーロドプシンII 光受容タンパク質 光情報伝達 走光性 分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) センサーロドプシン II (SRII) は、高度好塩菌の細胞膜上に存在し、負の走光性を司る光受容膜タンパク質である。SRII は発色団であるレチナルをタンパク質内部に含有しており、光励起を受け、レチナルの光異性化反応が誘起されると、この反応を引き金に、吸収波長の異なる種々の中間体が形成され、再びもとの状態に戻る光化学反応いわゆるフォトサイクルが引き起こされる。フォトサイクルはタンパク質の構造変化を伴って起こり、この誘起された構造変化が、細胞膜中に隣接して存在する共役タンパク質トランスドューサー (HtrII) へと伝わることで、最終的に細胞膜内でシグナル情報として処理される。この細胞膜を隔てての光情報変換のプロセスに関しては、*Natronomonas pharaonis* 由来の SRII (NpSRII) を使った研究により多くの知見が得られてきてはいるが、その分子メカニズムについてはまだまだ不明の点も多く残されている。

(2) NpSRII を用いた過去の研究より、SRII から HtrII への情報伝達は、主に M 中間体や O 中間体と呼ばれるフォトサイクル後期の中間体時に起こると考えられており、とりわけ M 中間体形成時に起こるタンパク質の大きな構造変化 (F ヘリックスのオープニング) が情報伝達に重要な機構の 1 つであると考えられている。したがって、M 中間体時の変化を解析することは、SRII のシグナル伝達機構を理解する上での第一歩であるが、通常条件下で形成される M 中間体は、存在寿命が短く (崩壊時間が数百ミリ秒から数秒程度) 中間体状態を長く維持することが困難なため、様々な解析を行いにくいという問題に直面していた。

(3) 一方、近年申請者らは *Halobacterium salinarum* 由来の SRII (HsSRII) において連続光を照射することで、崩壊速度が極めて遅く、さらに吸収波長が M 中間体に非常に近い中間体 (M_{like} 中間体) の存在を見出した。この中間体を疑似的な M 中間体として詳細に解析することができれば、SRII-HtrII 間の情報伝達機構についての新たな知見を得ることができると考えられる。

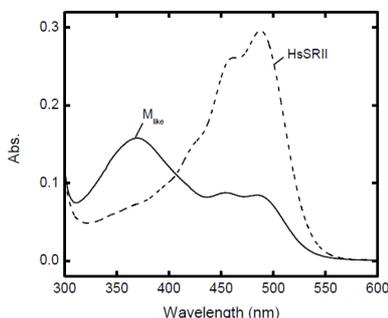


図 1 : M_{like} 中間体の吸収スペクトル。破線は HsSRII の吸収スペクトルを表す。

2. 研究の目的

本研究では、HsSRII において見出された長寿命の M_{like} 中間体に着目し、この中間体の解析を通じて SRII の光シグナル伝達機構についての新たな知見を得ることを目的とした。まずは、 M_{like} 中間体の物理化学的性質を理解することで、M 中間体との相違点を明らかにすることを目指した。さらに、生菌を使った機能解析により、 M_{like} 中間体の生理的条件下における意義について明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) M_{like} 中間体の物理化学的性質を理解するため、吸収スペクトル測定実験を行った。連続光で HsSRII を励起し、それによって形成される M_{like} 中間体の生成を様々な pH、温度、タンパク質内へのプロトンキャリアとなるアザイド添加条件下などで測定した。また、同時に生成された M_{like} 中間体が暗下で崩壊していく過程も測定した。なお、試料となるタンパク質には E. coli で発現・精製したものを使用した。

(2) M および M_{like} 中間体時の構造変化を検出するため、ヒドロキシルアミン (HA) との反応性を調べた。HA はレチナルとオプシンの結合部位であるシッフ塩基に反応し、レチナルオキシムを作ることで、この結合を切断する。またこの反応により、タンパク質の退色反応 (ブリーチ) が起こる。光照射により励起された HsSRII が HA によりブリーチされていく過程を、吸収スペクトル測定およびフラッシュ・フォトリシス (閃光光分解法) を用いた測定により調べた。

(3) M_{like} 中間体の走光性機能に及ぼす役割を調べるために、HsSRII および種々の変異体発現プラスミドを導入した好塩菌の光に対する応答を顕微鏡で観察した。観察により得られた画像に対する解析から、菌の光に対する反転率を求めた。

4. 研究成果

(1) M_{like} 中間体は M 中間体と比べ、著しく崩壊速度が遅い中間体であることがわかっている。そこで、連続光照射で生成された M_{like} 中間体がどのぐらいの速度で基底状態へと回復していくかを調べるため、連続光照射後、暗下においた状態での吸収スペクトルを室温 (20) 中性 (pH 7.0) の条件下で経時的に測定した。その結果、 M_{like} 中間体の崩壊は、速い速度定数と遅い速度定数からなる二相性の崩壊反応を示すことが明らかになった。さらに、遅い崩壊成分の速度定数を M 中間体の崩壊速度定数と比較すると、M 中間体の崩壊速度と比べて約 1 万倍も遅いことがわかった。さらに、 M_{like} 中間体の生成反応を様々な pH 下や M 中間体の崩壊速度を選択的に速くするアザイドを添加して調べたところ、M

中間体が蓄積しにくい低 pH 条件下や高濃度のアザイド存在下で、 M_{like} 中間体の生成も抑えられることがわかった。このことから、 M_{like} 中間体は、M 中間体の生成・崩壊反応の前後での分岐反応により形成される中間体であることが示唆された。

(2) 水溶性試薬である HA は、レチナールとオプシンの結合部位であるシッフ塩基に反応し、ブリーチを引き起こす。この反応を指標に、HsSR11 のフォトサイクル中間体時や M_{like} 中間体時に起こるタンパク質の構造変化について調べた。光強度やアザイド添加量を変化させることで、フォトサイクル時の中間体の存在量を変化させながら、HsSR11 のフォトサイクル時に起こるブリーチを測定した。その結果 M 中間体存在量とブリーチとの間により相関が見られたことから、M 中間体時にタンパク質内部の親水性が増大するような構造変化が起こることで、HA とシッフ塩基の反応が促進されることが明らかになった。

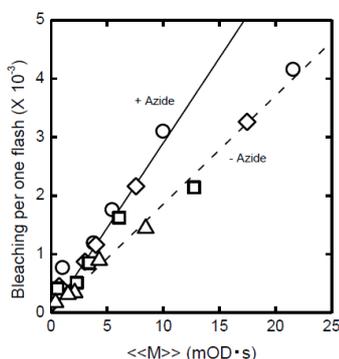


図 2 : M 中間体の存在量と 1 回の光照射あたりのブリーチ量との関係。

また M_{like} 中間体でも同様にブリーチが促進されることもわかった。さらに、 M_{like} 中間体が蓄積しやすい条件下ではタンパク質の失活が起こりやすいことを見出し、 M_{like} 中間体時に起こるタンパク質の大きな構造変化がシッフ塩基近傍での変化を引き起こし、タンパク質内部への水の流入を促すことで、タンパク質の不安定化を引き起こすことも明らかにした。

(3) M_{like} 中間体の生理的な役割について調べるため、HsSR11 を発現した好塩菌生細胞に対する走光性解析を行った。走光性機能における M_{like} 中間体の寄与を調べやすくするために、 M_{like} 中間体の生成量を増やす条件を変異導入実験により検討した。レチナールの近傍に位置することが予想される Asp103 と Ser201 の 2 か所のアミノ酸残基に着目し、これらの箇所に変異を導入した。Asp103 を Asn に置換した変異体では、可視吸収スペクトルの常温および低温での測定実験により、 M_{like} 中間体の生成量が野生型と比較して著しく増大することが明らかになった。この結果か

ら、 M_{like} 中間体の生理的な役割を今後調べていく上での有力な変異体の候補を発見することができた。さらに、Ser201 を Thr に置換した変異体では、K 中間体からの分岐反応で形成される P480 中間体の形成が抑えられることがわかった。また、この箇所を様々なアミノ酸 (Thr, Cys, Tyr, Ala, Val) に置換した変異体の走光性能を測定したところ、どの変異体でも野生型と同様に負の走光性を示すことがわかった。NpSR11 の対応するアミノ酸残基 (Thr204) は、走光性において重要な残基であるということが報告されていることから、HsSR11 では NpSR11 とは別の機構が走光性に重要であることがこの結果により明らかになった。

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)

Osanai, H., Ikehara, T., Miyauchi, S., Shimono, K., Tamogami, J., Nara, T. & Kamo, N. "A study of the interaction of drugs with liposomes with isothermal titration calorimetry" J. Biophys. Chem. 4, 11-21. (2013) 査読有

Hayashi, S., Tamogami, J., Kikukawa, T., Okamoto, H., Shimono, K., Miyauchi, S., Demura, M., Nara, T. & Kamo, N. "Thermodynamic parameters of anion binding to halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis* by isothermal titration calorimetry" Biophys. Chem. 172, 61-67. (2013) 査読有

Tamogami, J., Kikukawa, T., Nara, T., Shimono, K., Demura, M. & Kamo, N. "Photoinduced proton release in proteorhodopsin at low pH: The possibility of a decrease in the pK_a of Asp227" Biochemistry 51, 9290-9301. (2012) 査読有

Tamogami, J., Kikukawa, T., Ikeda, Y., Demura, M., Nara, T. & Kamo, N. "Photo-induced bleaching of sensory rhodopsin II (phoborhodopsin) from *Halobacterium salinarum* by hydroxylamine: Identification of responsible intermediates" J. Photochem. Photobiol. B. 106, 87-94. (2012) 査読有

奈良敏文, 田母神淳, 加茂直樹 "細菌の走光性を解明する" バイオメカニズム学会誌 35, 224-232. (2011) 査読無

Kikukawa, T., Shimono, K., Tamogami, J., Miyauchi, S., Kim, S-Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Jung, K-H., Yokoyama, S. & Kamo, N. "Photochemistry of *Acetabularia*

rhodopsin II from a marine plant, *Acetabularia acetabulum*" *Biochemistry* 50, 8888-8898. (2011) 査読有
Dai, G., Zhang, Y., Tamogami, J., Demura, M., Kamo, N., Kandori, H. & Iwasa, T. "An amino acid residue (S201) in the retinal binding pocket regulates the photoreaction pathway of phoborhodopsin" *Biochemistry* 50, 7177-7183. (2011) 査読有
Wada, T., Shimono, K., Kikukawa, T., Hato, M., Shinya, N., Kim, S-Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Tamogami, J., Miyauchi, S., Jung, K-H., Kamo, N. and Yokoyama, S. "Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton pumping rhodopsin, *Acetabularia* rhodopsin II from marine alga" *J. Mol. Biol.* 411, 986-998. (2011) 査読有

〔学会発表〕(計16件)

田母神淳(2014)“海藻由来のロドプシン様タンパク質アセタブラリアロドプシンIの光化学的性質の解析”日本薬学会第134年会、3月29日、熊本、日本
田母神淳(2013)“Photochemical reaction in *Acetabularia* rhodopsin I”日本生物物理学会第51回年会、10月29日、京都、日本
田母神淳(2013)“プロテオロドプシンの低pH条件下で起こるプロトン放出”第5回日本生物物理学会中国四国支部大会、5月26日、香川、日本
田母神淳(2013)“*Natronomonas pharaonis*由来のセンサリーロドプシンIIのAsp193近傍への塩化物イオンの結合”日本薬学会第133年会、3月29日、横浜、日本
Tamogami, J. (2012)“The proton release in proteorhodopsin at low pH: Decrease in pKa of Asp227 in the excited state” 15th International Conference on Retinal Proteins (ICRP), Oct. 1, Ascona, Switzerland
田母神淳(2012)“The role of chloride in the photo-induced proton transfer in sensory rhodopsin II from *Natronomonas pharaonis*”日本生物物理学会第50回年会、9月23日、名古屋、日本
田母神淳(2012)“*Natronomonas pharaonis*由来のセンサリーロドプシンII(NpSR II)の光誘起プロトン放出機構に及ぼす塩化物イオンの影響”第4回日本生物物理学会中国四国支部大会、6月2日、山口、日本
田母神淳(2012)“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、3月30日、札幌、日本
田母神淳(2011)“The fast proton release of proteorhodopsin at low pH”日本生物物理学会第49回年会、9月17日、兵庫、日本
田母神淳(2011)“センサリーロドプシンIIのヒドロキシルアミンによるブリーチング反応”第3回日本生物物理学会中国四国支部大会、5月14日、広島、日本

〔図書〕(計1件)

Kikukawa, T., Tamogami, J., Shimono, K., Demura, M., Nara, T. & Kamo, N. "Photo-induced proton transfers of microbial rhodopsins" *Molecular Photochemistry- Various aspects* (chapter 5) InTech, 89-108. (2012)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ghp01.matsuyama-u.ac.jp/~yakugaku/laboratory/labobiophysical-chemistry.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田母神 淳 (TAMOGAMI JUN)
松山大学・薬学部・助教
研究者番号：30580089