

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：36301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18519

研究課題名(和文)プロテオロドプシンのプロトン輸送方向の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Regulation mechanism of direction of the proton translocation in proteorhodopsin

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：海洋真正細菌から発見された光駆動プロトンポンプであるプロテオロドプシン(PR)のアルカリ性条件下で起こるプロトン輸送方向の逆転の分子機構を明らかにすることが本研究の目的である。アルカリ性条件下でのフォトサイクルとその過程で起こるプロトン移動の解析から、アルカリ性では中性の条件下で見られるフォトサイクルに加え、M様中間体(Ma)を経由するパラレルなフォトサイクルが出現し、このとき中性とは逆の順番・向きでプロトン移動が起こることが明らかになった。また、ヒドロキシルアミンによるブリーチ実験からPRの細胞質側の膜貫通領域が暗状態のときからすでに親水的な環境になっていることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による結果から、微生物型ロドプシンのプロトン輸送の方向を決める機構は何かという本質的な問題を考える上での1つの役立つ情報が得られたものと考えられる。さらに、海洋でのエネルギー合成が主な役割であるところまで考えられてきたPRに別の機能も存在する可能性があるという問題も提起し、近年見つけてきている内向きプロトンポンプ型の微生物型ロドプシンの生理的な機能を考える上でも重要な情報を提供するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the molecular mechanism of reverse of direction of the proton translocation under alkaline conditions in proteorhodopsin (PR), a light-driven proton pump from marine eubacteria. From the analysis of the photocycle and accompanying proton transfer under alkaline conditions, a parallel photocycle, during which a M-like photointermediate (Ma) is formed, was observed in addition to a photocycle at neutral pH. The photocycle via Ma at alkali pH was accompanied by the sequence and direction of the photoinduced proton transfer opposite to neutral pH. Moreover, we observed that the cytoplasmic transmembrane region in PR is already hydrophilic at the dark state through the bleach reaction by hydroxylamine.

研究分野：生物物理化学

キーワード：生体エネルギー変換 微生物型ロドプシン レチナール フォトサイクル プロトン移動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 微生物に存在する光受容タンパク質で、高等生物のもつ視物質ロドプシンと同様に内部にレチナル分子を内包する7回膜貫通型タンパク質を微生物型ロドプシンとよぶ。微生物型ロドプシンは、これまで高度好塩菌とよばれる特殊な細菌にのみ存在するものとみられてきたが、2000年代に入って新規のものが様々な微生物種から次々と発見され、またその機能についても実に多種多様であることが明らかとなってきている。中でも多くの生物種から発見され、特に重要な機能の1つと考えられているのが光駆動プロトンポンプとしての機能である。光が当たると、細胞内から細胞外へとプロトンを能動的にくみ出すというもので、この働きにより形成された細胞膜内外でのプロトン濃度勾配がATP合成の駆動力として使われるため、エネルギー合成の機能に直結する。プロトンポンプとしての機能が初めて発見されたのは、高度好塩菌から発見されたバクテリオロドプシン(BR)で、発見された1970年代から現在までにかけて、その分子機構が盛んに研究されてきた。しかしながら、なぜプロトンが細胞内から細胞外へと一方向にしか輸送されないのか？輸送される方向がどのような分子機構により制御されているのか？という本質的な問いについての明確な解答はいまだ得られていない現状にある。

(2) プロテオロドプシン(PR)は、2000年に海洋真正細菌から初めて発見されたプロトンポンプ型のロドプシンである。生理的な中性から弱アルカリ性の条件下では、BR同様に細胞内から細胞外へとプロトンを運ぶ。一方、近年申請者らは脂質に再構成したPRをコンデンサー用の絶縁体薄膜に貼り付け、光照射に伴って起こるプロトン輸送によって生じる光誘起電流を測定したところ、外液のpHをアルカリ性にするにつれ、酸性から中性付近で見られていた電流成分に加え、逆方向の電流も観察されることを発見した。これは、アルカリ性になることで、通常の外向きの輸送に加え、逆向きの輸送、つまり細胞外から細胞内への内向き輸送も起こり得る可能性を示唆するものである。そこで、PRのアルカリ性条件下で観察されたこの興味深い現象について詳しく調べ、その分子メカニズムを明らかにすることができれば、上に述べた微生物型ロドプシンのプロトン輸送の方向性を決める本質的因子を明らかにするための有力な知見を得ることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、PRのアルカリ性条件下での光反応とその過程で起こるプロトン移動や構造変化について詳細に解析することで、プロトン輸送方向の逆転のメカニズムを明らかにすることを目的とする。さらには、そこから明らかになった分子機構をもとに、プロトンポンプ型の微生物型ロドプシン全般に共通するプロトン輸送方向の決定因子をあぶり出すこともねらいの1つである。

3. 研究の方法

(1) 微生物型ロドプシンは個々のもつ機能に関係なく、光を受けると共通の光反応、すなわち発色団であるレチナルが全トランス型から13シス型へと光異性化するのに伴い、いくつかの光中間体が形成され、時間とともに再びレチナルが熱的に全トランス型へと再異性化して、もとの状態へと戻るといった反応を示す。この光反応のことをフォトサイクルという。PRでは、アルカリ性の条件下でのpHの上昇に伴って、フォトサイクルがどのように変化するかを明らかにするために、pH 8-11にかけての様々なpH条件下で閃光光分解法を用いた光励起時に起こる過渡吸収変化の測定を行った。

(2) PRは、フォトサイクルの過程でプロトンを輸送するため、光励起時にタンパク質内外でのプロトンの出入りが発生する。タンパク質と外液間でのプロトンの移動が起こると、外液のpHはわずかに変化するが、このときの微小なpH変化を測定するために、プロトン高感受性の電極であるインジウム・酸化スズ(ITO)透明電極を用いた測定を行った。この方法を用いて、光照射後に起こるプロトンの出入りの順番がpHの変化でどのように変わるかについて調べた。また同時に、この手法は高時間分解能でプロトン移動による信号を捉えることができるため、発生シグナルの時間変化を(1)の過渡吸収変化測定によって得られたシグナルの時間変化と比較することで、フォトサイクルのどのタイミングでプロトンの出入りが起きているかについても調べた。

(3) 水溶性試薬であるヒドロキシルアミン(HA)は、微生物型ロドプシンの発色団であるレチナルと反応すると、レチナルオキシムを形成し、レチナルをタンパク質から遊離させることで、退色(ブリーチ)を引き起こす。よって、このブリーチ反応を指標にすると、HAがタンパク質内部に侵入しやすいかどうか？つまりタンパク質内部が比較的親水的环境にあるかもしくは疎水的环境にあるかについて予測することができる。そこで、暗状態にあるPRにHAを添加したときの反応性を調べるとともに、光励起により構造変化を誘起したときにHAとの反応性がどのように変化するかについて調べた。

4. 研究成果

(1) 閃光光分解法を用いた実験から、光励起後の過渡吸収変化シグナルのpH上昇に伴う変

化を測定したところ、短波長中間体のモニター波長(420 nm)での吸収変化において変化が見られた。中性の条件下では、420 nm での吸収変化は唯一の短波長光中間体である M 中間体の生成・崩壊のみを反映するが、pH が上昇するにしたがい別の中間体の寄与が観測された。いくつかのスキームに基づく反応速度論的な解析から、M 中間体に吸収波長の近いもう1つの M 様中間体(M_a 中間体と名付けた)が形成されるパラレルなフォトサイクルが共存するというモデルを仮定したときに、測定データを上手く説明できた。また、M_a 中間体の形成量を測定すると、pH の上昇と共に増大し、その pH 依存性から pK_a≈9.2 が算出された。

(2) M_a 中間体を経由するフォトサイクルの過程で、プロトンの出入りの順番はどのようになるのかを ITO 透明電極を使って調べた。PR が中性でのフォトサイクルを回るときは、最初にプロトンがタンパク質内へと取り込まれた後、タンパク質外へと放出されるという順番でプロトンの出入りが起こる。一方、アルカリ性の条件下では、この順番が逆転することがわかった。ITO 電極を用いて閃光照射時に得られる光誘起シグナルは、プロトン取り込みが先に起こる場合は下向きに、放出が先に起こる場合は上向きにシグナルが出る。光誘起シグナルを、pH を変えながら測定したところ、中性では下向きのみシグナルであったのに対し、pH をアルカリ性側へと上昇させるにしたがい、上向きのシグナルが混在し始め、また上向きのシグナルの大きさは pH 上昇とともに増大するという変化の挙動を示した。この pH の上昇に伴う上向きのシグナルの大きさの増大から pK_aを見積ると、約 9.5 となり、M_a 中間体形成の pH 依存性から得られた pK_a(≈9.2)とほぼ一致した。さらに、絶縁体薄膜を用いた実験により得られた逆向きの光誘起電流の大きさの pH 依存性もこれらの挙動とよく重なった。これらの実験事実から、pH の上昇に伴って観測される M_a 中間体を経由するフォトサイクルの過程で、プロトン移動の順番と輸送方向の逆転が起こると予想し、右図(図1)の光反応スキームを提案した。

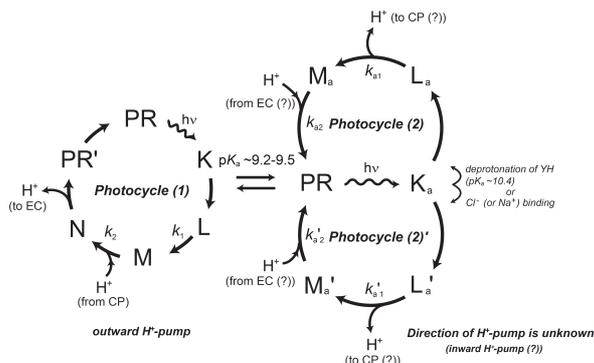


図1 PR の中性からアルカリ性でのフォトサイクルとプロトン移動の予想スキーム

(3) アルカリ性でプロトン輸送方向が逆向きになる際に、鍵となるアミノ酸残基を明らかにするために、いくつかの変異体を作製した。その中で、光励起時に、活性中心であるプロトン化レチナルシッフ塩基(PSB)からプロトンを最初に受け取るアミノ酸残基である C ヘリックス上の D97 残基を中性のアスパラギン残基に置換した D97N 変異体で興味深い結果が観察された。D97N では、光活性化時に PSB からのプロトンを受け取ることができないため、PSB が脱プロトン化状態にある M 中間体は形成されないはずであるが、pH をアルカリ性にする、野生型の場合と同様に M 様の中間体(M_a)が観測された。さらに、ITO 電極を用いた実験から、M_a 中間体の形成が見られる pH 条件下でプロトンの出入りも観測され、さらにその順番も野生型の場合と同様にプロトンを放出してから取り込むというものだった。このことから、アルカリ性条件下での野生型と D97N 変異体のフォトサイクルとその過程でのプロトン移動は類似していることが予測され、おそらく光活性化時に PSB から解離したプロトンは通常 D97 が位置する細胞外側ではなく細胞内側に移動し、何かの残基を経由してかもしくは直接、細胞内側の溶液中へと放出されるのではないかと予想した。

(4) プロトンを一方向にしか輸送しない BR では、細胞内側の膜貫通領域が暗状態では疎水的な状態をとり、PSB のプロトンの細胞内側への逆流を防いでいると考えられている。一方、PR では同領域がどのような環境になっているのかを調べるために、HA によるブリーチ実験を行った。界面活性剤中でミセルを形成している微生物型ロドプシンに HA を加えた場合、通常は水溶性である HA は比較的親水的な環境にある細胞外側の膜貫通領域からゆっくりと侵入し、レチナルと反応する。さらに、光照射下で HA と反応させると、光活性化時に F ヘリックスの細胞内側の領域が開くような構造変化が起こり、タンパク質内部への水の流入を促すため、細胞内側の膜貫通領域も親水的な環境になり、HA によるブリーチ反応が暗状態のときと比べて大きく促進される。一方、PR で暗状態・光照射下でのブリーチを測定したところ、暗状態下でも HA と速やかに反応し、光照射してもブリーチの速度は暗状態下での場合と比べて大きく変わらなかった(図2)。このことから、PR では細胞内側の膜貫通領域が光励起前からすでに親水的な状態をとることが予想され、この性

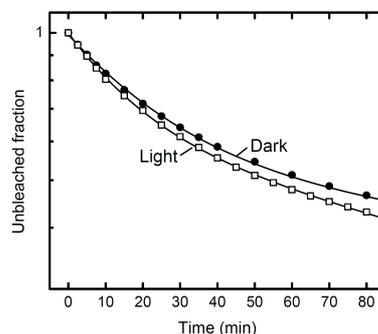


図2 暗下と光照射下での PR の HA によるブリーチ速度の比較

質によってアルカリ性のときのプロトンの細胞内側への移動を可能にしているのではないかと推測した。

5. 主な発表論文等
(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計5件)

*Fujisawa, T., Abe, M., Tamogami, J., Kikukawa, T., Kamo, N. & Unno, M. "Low-temperature Raman spectroscopy reveals small chromophore distortion in primary photointermediate of proteorhodopsin" FEBS. Lett. 592, 3054-3061. (2018) 査読有

*Tamogami, J., Kikukawa, T., Ohkawa, K., Ohsawa, N., Nara, T., Demura, M., Miyauchi, S., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Shimono, K. & Kamo, N. "Interhelical interactions between D92 and C218 in the cytoplasmic domain regulate proton uptake upon N-decay in the proton transport of *Acetabularia* rhodopsin II" J. Photochem. Photobiol. B. 183, 35-45. (2018) 査読有

Dai, G., Geng, X., Chaoluomeng, Tamogami, J., Kikukawa, T., Demura, M., Kamo, N. & *Iwasa, T. "Photocycle of sensory rhodopsin II from *Halobacterium salinarum* (HsSRII): Mutation of D103 accelerates M decay and changes the decay pathway of a 13-cis O-like species" Photochem. Photobiol. 94, 705-714. (2018) 査読有

*Tamogami, J., Kikukawa, T., Nara, T., Demura, M., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Miyauchi, S., Shimono, K. & Kamo, N. "Existence of two O-like intermediates in the photocycle of *Acetabularia* rhodopsin II, a light-driven proton pump from a marine alga" Biophys. Physicobiol. 14, 49-55. (2017) 査読有

Nakamura, S., *Kikukawa, T., Tamogami, J., Kamiya, M., Aizawa, T., Hahn, M.W., Ihara, K., Kamo, N. & Demura, M. "Photochemical characterization of actinorhodopsin and its functional existence in the natural host" Biochim. Biophys. Acta. 1857, 1900-1908. (2016) 査読有

[学会発表](計16件)

田母神淳(2018) "アセタブラリアロドプシン II のプロトン取り込み機構に關与する D92-C218 残基間の相互作用" 日本生物物理学会 第10回中国四国支部大会、5月19日、高知、日本

田母神淳(2018) "海藻(カサノリ)由来の光駆動プロトンポンプであるアセタブラリアロドプシン II の光反応サイクル時に形成される2つのO中間体" 日本薬学会第138年会、3月27日、金沢、日本

田母神淳(2017) "Existence of two O intermediates in the photocycle of *Acetabularia* rhodopsin II, a light-driven algal proton pump" 日本生物物理学会第55回年会、9月21日、熊本、日本

田母神淳(2017) "緑藻由来の光駆動プロトンポンプであるアセタブラリアロドプシン II の光化学反応サイクルにおける2つのO中間体の形成" 日本生物物理学会 第9回中国四国支部大会、5月20日、松山、日本

田母神淳(2017) "アセタブラリアロドプシン II の細胞内膜貫通領域に存在する D92 および C218 残基間の相互作用の役割" 日本薬学会第137年会、3月25日、仙台、日本

田母神淳(2016) "Role of the interaction between D92 and C218 in the proton transfer reaction in *Acetabularia* rhodopsin II" 日本生物物理学会第54回年会、11月25日、つくば、日本

田母神淳(2016) "プロテオロドプシンのアルカリ性での M 様中間体の形成とプロトン移動の順番の逆転" 日本生物物理学会 第8回中国四国支部大会、5月29日、高松、日本

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://yakugaku.matsuyama-u.ac.jp/laboratory/labo_biophysical-chemistry.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。