

平成22年 6月10日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390009
 研究課題名 (和文) ハロロドプシンのクロライド輸送機構解明と3量体形成の意義
 研究課題名 (英文) Elucidation of Cl⁻-pumping mechanism and significance of trimer formation of halorhodopsin
 研究代表者
 加茂 直樹 (KAMO NAOKI)
 松山大学・薬学部・教授
 研究者番号：10001976

研究成果の概要 (和文)： ハロロドプシン (HR) は高度好塩菌の膜に発現している光エネルギーで駆動される Cl⁻ イオンポンプである。Xenopus オーサイトに発現させ、光照射による膜電流の測定より、活性を測定する新しい方法を開発した。非常に定量性優れていた。大腸菌の発現系を用い、種々の HR の変異体を作成し、活性と光化学反応を調べた。Arg123 が輸送に重要であることを明らかにした。N から O 中間体への変化の際に、Cl⁻ イオンが HR 内部から細胞内部へ放出され、O→HR' の過程で Cl⁻ が細胞外から HR へ取り込まれることを明らかにした。HR は界面活性剤中でも3量体を形成していることを明らかにした。3量体はモノマーより安定であった。

研究成果の概要 (英文)： Halorhodopsin (HR) is a light-driven Cl⁻ pump expressed in the membrane of Halobacteria. We succeeded in developing a new method: HR was expressed in Xenopus laevis Oocytes, and photo-induced membrane current was measured due to the Cl⁻ transport. This method is highly quantitative. We prepared various HR mutants using E. coli expression system. Careful investigation on both the photochemistry and transport activities of the mutants has been done. We found Arg123 that is an essentially important amino acid residue. During the transition from N to O intermediate, Cl⁻ is released to cytoplasm while Cl⁻ is uptaken from extracellular space during O to HR' transition. We showed that HR forms trimer even in the presence of detergents, and that the trimer is more robust than the monomer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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： ハロロドプシン、センサーロドプシン、フォボロドプシン、レチナールタンパク、高度好塩菌、オーサイト、フォトサイクル、閃光光分解

1. 研究開始当初の背景

HR は光駆動 Cl⁻ポンプであることは明らかにされていた。しかし、高度好塩菌の発現系では変異体の作製の効率が悪かった。大腸菌での発現系が報告され、変異体の作製が容易になった。そこで、Cl⁻輸送機構の研究が容易になった。ただし、輸送活性の測定法を開発する必要があった。

2. 研究の目的

(1) HR の変異体を作製して、輸送活性と光化学反応を測定し、Cl⁻輸送機構を明らかにする。

(2) 新しい定量的な輸送活性の測定法を開発する。

(3) X線による結晶構造の解析では、3量体が形成されていることが示唆される。そこで、HR は膜中または界面活性剤中で3量体を形成しているか、3量体の形成の意義は何かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌の HR の発現系を用いて、種々の変異体を作成する。

(2) レーザー閃光光分解法で、種々の HR の変異体の光化学反応を明らかにし、輸送機構を考察する。

(3) HR の活性の定量的測定法の開発が必要である。次の方法を考える。アフリカツメガエルのオーサイトに HR を発現させ、光照射で輸送される Cl⁻イオンに由来する膜電流を測定することによって、HR の活性を推定する方法を確立する。

4. 研究成果

(1) *Natronomonas pharaonis* という高度好塩好アルカリ性菌に存在する HR の遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現系で、多量の HR を作製する方法を確立した。これら高度好塩菌のレチナルタンパク質を大腸菌で発現させる方法の開発は国際的に高く評価されており、この分野の進展に貢献した。

(2) ところが、最も一般的な *Halobacterium salinarum* からの HR は (1) の方法では作製出来なかった。しかし、ある工夫をすることで成功した (現在論文作製中)

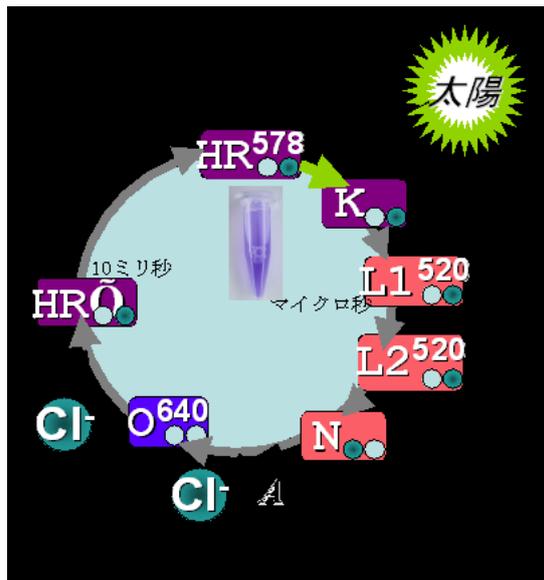
(3) HR をアフリカツメガエルのオオサイトに発現させ、Cl⁻輸送による電荷の移動を膜電流として測定する方法を確立した。この方法は、膜電位を変化させて、電流を測定することが出来る。いま、Cl⁻が細胞外から内へ移動するならば、細胞内を負の電位をかけると、Cl⁻の輸送の速度は低下するはずである。Cl⁻

を輸送させようとする力と外からかけた電位差が釣り合うところがあるはずである。実験の結果はその通りであり、この電流=0になるときの、外から掛けた電圧が活性となることを示した。

(4) 同じ高度好塩菌の細胞膜には、センサーリロドプシン (SR) が存在している。SR は細胞膜中でトランスジューサ (Htr) と呼ばれている膜タンパクと複合体を形成されている。SR 単独では光照射で水素イオンを輸送するが、SR-Htr 複合体では輸送しない。これをヒントに、Htr と結合できる HR 変異体を作製した。この HR 変異体は Cl⁻を輸送したが、HR-Htr 複合体では輸送しなかった。光化学反応を、レーザー閃光光分解法で測定したところ、Cl⁻輸送に重要な光化学中間体を見つけた。

(5) 1 2 3 番目のアルギニンを変異させると、Cl⁻輸送の活性が消失した。

(6) HR をはじめとする高度好塩菌のレチナルタンパクは、フォトサイクルを持っている。このフォトサイクルとは、HR を例にすると、次のようなものである。



すなわち、HR に光が当たると、HR 分子は励起されエネルギーの高い状態になるが、光がない状態で、種々の中間体 (上の図では、K, L1, L2, N, O 等) を経て、元の HR に戻る。すなわち、定常光のもとでは、このサイクルがクルクルとまわっている。N から O へ変化するとき、Cl⁻を細胞内に放出し、O から HR に戻るときに、細胞外から Cl⁻を HR 内に取り込むことを明らかにした。これは、フォトサイクルの速度の Cl⁻依存性からそのように推定されていたが、今回、別の方法で、これを証明したものである。

(7) 体積は、 $N < 0$ であることを明らかにした。0で体積が大きいのは、外部からタンパク質内部への水の流入によると推測した。また、この水の流入によって、C1が結合サイトから離れ、細胞内部へ放出されるのであろうと推定した。

(8) 大腸菌で発現したHRをゲル濾過カラムにかけた。このカラムから分子量を推定すると、HRの分子量よりもはるかに大きなものであった。界面活性剤で可溶化しているので、吸着している界面活性剤の量を推定して、HRの分子量を算出した。すると、界面活性剤存在下の水溶液中でも、3量体を形成していることが分かった。

(9) X線の結晶構造は3量体であるので、同じ構造であろうと検討をつけた。その構造をよく見ると、異なるHR分子のリジン残基が近くに存在するのではないかと考えられた。そこで、グルタルアルデヒドで架橋した。そして、それをマスペクトルにかけると、質量数は3量体と等しかった。

(10) 3量体は、モノマーに比べて、高温とか塩濃度の変化に対して、安定であった。

(11) その他に、我々が発見した pharaonis phoborhodopsin (ppR, または NpSR II) の研究を行った。

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33件)

主要な論文は次の通り

(1) J. Tamogami, T. Kikukawa, Y. Ikeda, A. Takemura, M. Demura and N. Kamo, 2010, The photochemical reaction cycle and photoinduced proton transfer of sensory rhodopsin II (phoborhodopsin) from *Halobacterium salinarum*. *Biophys. J.* 98: 1353-1363 (2010)

(2) M. Sonoyama, T. Kikukawa, Y. Yokoyama, M. Demura, N. Kamo and S. Mitaku, 2009, Effect of molecular assembly on photocycle of reconstituted bacteriorhodopsin: Significant blue shift of the late photointermediate in the liquid crystalline phase. *Chemistry Lett.* 39:1134-1135

(3) K. Shimono, M. Goto, T. Kikukawa, S. Miyauchi, M. Shirouzu, N. Kamo and S. Yokoyama, 2009, Production of functional bacteriorhodopsin by an Escherichia coli cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid. *Protein Sci.* 18:2160-2171

(4) Y. Kurosaki, T. Sakuma, A. Fukuma, Y. Fujinami, K. Kawamoto, N. Kamo, S-I. Makino and J. Yasuda, 2009, A simple and sensitive method for detection of *Bacillus anthracis* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Appl. Microbiol.* 107:1947-1956

(5) T. Sasaki, T. Aizawa, M. Kamiya, T. Kikukawa, K. Kawano, N. Kamo and M. Demura, 2009, Effect of chloride binding on the thermal trimer-monomer conversion of halorhodopsin in the solubilized system. *Biochemistry* 48: 12089-12095

(6) K. Inoue, M. Kubo, M. Demura, N. Kamo and M. Terazima, 2009, Reaction dynamics of halorhodopsin studied by time-resolved diffusion. *Biophys. J.* 96:3724-3734

(7) M. Kubo, T. Kikukawa, S. Miyauchi, A. Seki, M. Kamiya, T. Aizawa, K. Kawano, N. Kamo and M. Demura, 2009, Role of Arg123 in light-driven anion pump mechanism of pharaonis halorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* 85:547-555

(8) J. Tamogami, T. Kikukawa, S. Miyauchi, E. Muneyuki and N. Kamo, 2009, A tin oxide transparent electrode provides the means for rapid time-resolved pH measurements: Application to photoinduced proton transfer of bacteriorhodopsin and proteorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* 85:578-589

(9) T. Sasaki, M. Kubo, T. Kikukawa, M. Kamiya, T. Aizawa, K. Kawano, N. Kamo and M. 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

(10) Y. Kitade, Y. Furutani, N. Kamo and H. Kandori, 2009, Proton release group of pharaonis phoborhodopsin revealed by ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 48:1595-1603

(11) T. Kikukawa, C.K. Saha, S.P. Balashov, E.S. Imasheva, D. Zaslavsky, R.B. Gennis, T. Abe and N. Kamo, 2008, The lifetimes of pharaonis phoborhodopsin signaling states depend on the rates of proton transfer:

Effects of hydrostatic pressure and stopped flow experiments. *Photochem. Photobiol.* 84: 880-888

(12) Y. Sudo, T. Nishihori, M. Iwamoto, K. Shimono, C. Kojima and N. Kamo, 2008, A long-lived M-like state of phoborhodopsin that mimics the active state. *Biophys. J.* 95: 753-760

(13) I. Kawamura, H. Yoshida, Y. Ikeda, S. Yamaguchi, S. Tuzi, H. Saito, N. Kamo and A. Naito, 2008, Dynamics change of phoborhodopsin and transducer by activation: study using D75N mutant of the receptor by site-directed solid-state ^{13}C NMR. *Photochem. Photobiol.* 84: 921-930

(14) Y. Furutani, M. Ito, Y. Sudo, N. Kamo and H. Kandori, 2008, Protein-protein interaction of a pharaonis Halrhodopsin mutant forming a complex with pharaonis halobacterial transducer protein II detected by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 84:874-879

(15) Y. Sudo, Y. Furutani, M. Iwamoto, N. Kamo and H. Kandori, 2008, Structural changes in the O-decay accelerated mutants of pharaonis phoborhodopsin. *Biochemistry* 47: 2866-2874

(16) T. Nara, T. Kouyama, Y. Kurata, T. Kikukawa, S. Miyauchi and N. Kamo, 2007, Anti-parallel membrane topology of a homo-dimeric multidrug transporter, EmrE. *J. Biochem.* 142: 621-625

(17) K. Hayashi, Y. Sudo, J. Jee, M. Mishima, H. Hara, N. Kamo and C. Kojima, 2007, Structural analysis of the phototactic transducer protein HtrII liker region from *Natronomonas pharaonis*. *Biochemistry* 46: 14380-14390

(18) T. Kikukawa, S. Miyauchi, T. Araiso, N. Kamo and T. Nara, 2007, Anti-parallel membrane topology of two components of EbrAB, a multidrug transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358:1071-1075

(19) Y. Taniguchi, T. Ikehara, N. Kamo, H. Yamasaki and Y. Toyoshima, 2007, Dynamics of light-induced conformational changes of the phoborhodopsin/transducer

complex formed in the n-dodecyl β -D-Maltoside micelle. *Biochemistry* 46:5349-5357

(20) I. Kawamura, Y. Ikeda, Y. Sudo, M. Iwamoto, K. Shimono, S. Yamaguchi, S. Tuzi, H. Saito, N. Kamo and A. Naito, 2007, Participation of the surface structure of pharaonis phoborhodopsin, ppR and its A149S and A149V mutants. Consisting of the C-terminal α -helix and E-F loop, in the complex-formation with the cognate transducer pHtrII, as revealed by site-directed ^{13}C solid-state NMR. *Photochem. Photobiol.* 83:339-345

(21) T. Iwasa, E. Abe, Y. Yakura, H. Yoshida and N. Kamo, 2007, Tryptophan 171 in *pharaonis* phoborhodopsin (sensory rhodopsin II) interacts with the chromophore retinal and its substitution with alanine or threonine slowed down the decay of M- and O-intermediate. *Photochem. Photobiol.* 83:328-335

(22) C. Hasegawa, T. Kikukawa, S. Miyauchi, A. Seki, Y. Sudo, M. Kubo, M. Demura and N. 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

(23) Y. Taniguchi, T. Ikehara, N. Kamo, Y. Watanabe, H. Yamasaki and Y. Toyoshima, 2007, Application of fluorescence resonance energy transfer (FRET) to investigation of light-induced conformational changes of the phoborhodopsin/transducer complex. *Photochem. Photobiol.* 83:311-316

(24) A. Seki, S. Miyauchi, S. Hayashi, T. Kikukawa, M. Kubo, M. Demura, V. Ganapathy and N. Kamo, 2007, Heterologous expression of *pharaonis* halorhodopsin in *Xenopus laevis* oocyte and electrophysiological characterization of its light-driven Cl^- pump activity. *Biophys. J.* 92:2559-2569

[学会発表] (計 14 件)

(1) J. Tamogami, T. Kikukawa, S. Miyauchi and N. Kamo, Analysis of photo-induced proton uptake/release by bacteriorhodopsin and proteorhodopsin using a SnO_2 transparent electrode. 13th International

Conference on Retinal Proteins. June15-19, 2008, Barcelona. Invited Lecture

(2) T. Tsukamoto, T. Sasaki, T. Kikukawa, M. Kamiya, T. Aizawa, K. Kawano, N. Kamo and M. Demura, Trimer assembly of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin, NpHR in lipid bilayer and detergent. 13th International Conference on Retinal Proteins. June15-19, 2008, Barcelona

(3) D. Gang, Y. Ohno, Y. Ikeda, N. Kamo and T. Iwasa, Photoreaction of salinarum phoborhodopsin studied by low-temperature spectroscopy. 13th International Conference on Retinal Proteins. June15-19, 2008, Barcelona

(4) N. Kamo, S. Miyauchi, T. Kikukawa, H. Shigemura, Y. Saito, S. Hayashi, M. Kubo, T. Kitagawa and M. Demura, Important amino acid residues of functioning in Halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*, NpHR. 13th International Conference on Retinal Proteins. June15-19, 2008, Barcelona

(5) I. Kawamura, J. Tanabe, T. Nishio, A. Wada, S. Tuzi, N. Kamo and A. Naito, Backbone conformations of retinal protein as studied by solid state NMR. 13th International Conference on Retinal Proteins. June15-19, 2008, Barcelona

(6) M. Kubo, T. Kikukawa, S. Miyauchi, M. Kamiya, T. Aizawa, K. Kawano, N. Kamo and M. Demura, Role of Arg123 in light-driven anion pump mechanisms of *N. pharaonis* halorhodopsin, NpHR. 13th International Conference on Retinal Proteins. June15-19, 2008, Barcelona, selected presentation

(7) M. Sonoyama, T. Kikukawa, Y. Yokoyama, M. Demura, N. Kamo and S. Mitaku, Effect of molecular assembly on photointermediates of BR reconstituted into dimyristoyolphosphatidylcholine vesicles. 13th International Conference on Retinal Proteins. June15-19, 2008, Barcelona

(8) T. Hidaka et al. 固体 NMR による光受容タンパク質 ppR とその変異体 T204A の局所構造変化の解析、第 47 回日本生物物理学会、2009 年 10 月 30 日、アステイ徳島

(9) T. Kondo et al. 固体¹³C NMR による ppR の細胞質表面部位の相互作用変化の観測、第 47 回日本生物物理学会、2009 年 10 月 30 日、アステイ徳島

(10) Y. Yamashita et al. 大腸菌発現系を用いた *salinarum* ハロロドプシンの機能的再構成、第 47 回日本生物物理学会、2009 年 10 月 30 日、アステイ徳島

(11) M. Unno et al. 共鳴ラマン分光法によるファラオニスフォボロドプシン N 中間体の検出、第 47 回日本生物物理学会、2009 年 10 月 30 日、アステイ徳島

(12) J. Tamogami et al. *Halobacterium salinarum* 由来のフォボロドプシン (センサリーロドプシン II) の光化学反応サイクルとプロトン移動、第 47 回日本生物物理学会、2009 年 10 月 30 日、アステイ徳島

(13) T. Kikukawa et al. ファ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、2009 年 10 月 30 日、アステイ徳島

〔図書〕 (計 1 件)

(1) 加茂直樹、嶋林三郎 編集「薬学生のための生物物理化学入門」廣川書店 (東京) 2008 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://ghp01.matsuyama-u.ac.jp/~yakugaku/teacher/#teacher09>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加茂 直樹 (KAMO NAOKI)
松山大学薬学部・教授

研究者番号： 10001976

(2) 研究分担者

菊川 峰志 (KIKUKAWA TAKASHI)
北海道大学大学院先端生命科学研究所・助教

研究者番号： 20281842

奈良 敏文 (NARA TOSHIFUMI)

松山大学薬学部・准教授

研究者番号： 30241350

宮内 正二 (MIYAUCHI SEIJI)

松山大学薬学部・教授

研究者番号： 30202352