

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22193

研究課題名(和文) ナノディスクを用いた膜結合金属蛋白質の集積配列による活性制御

研究課題名(英文) Molecular Design and Functional Regulation of Integrated Membrane-bound Protein Using Nono-disc

研究代表者

石森 浩一郎 (Ishimori, Koichiro)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20192487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：光駆動塩素イオンポンプのハロロドブシン(HR)と、呼吸鎖末端で酸素分子の四電子還元を行うバクテリア由来シトクロム酸化酵素(cbb3)に注目して、そのナノディスク化と機能解析および機能分子への応用を試みた。ナノディスク化HRの光反応サイクルを多様な分光学的手法で解析したところ、効率的な光駆動塩素ポンプ駆動にはHR分子間相互作用、膜電荷とHRの相互作用、塩素イオン結合や解離に伴うHRの構造変化を許容する膜の柔軟性等が重要であることが示された。cbb3は電極に固定させることで、電気化学的な酸素分子の四電子還元反応を触媒として進行させることが確認でき、ナノディスク化でその活性の向上が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内で重要な機能を果たしている膜結合蛋白質は、精製蛋白質として細胞外で機能させる場合、これまで界面活性剤による可溶化が用いられてきたが、このような手法では膜結合蛋白質が膜との相互作用によって維持してきた構造安定性や結合配向性が失われ、細胞内と同様な機能を発揮できない場合が多い。本研究では、安定な円盤状脂質膜であるナノディスクに膜結合蛋白質を結合させることで、膜結合による蛋白質構造や機能への影響を明らかにすることができ、さらに酸化酵素が電極上での酸素分子の水への還元反応の触媒として機能することを確認できた。以上の成果は、膜蛋白質の機能分子としての応用を考えるうえでの指針となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on nonodisc-reconstituted halorhodopsin (HR), pumping chloride ion into the cell in response to light, and bacterial cytochrome oxidase (cbb3), promoting four-electron reduction of molecular oxygen in the respiratory chain. Their structures and enzymatic activities were investigated by various kinds of spectroscopies, and the applications of these nanodisc-reconstituted proteins were examined. To facilitate the effective chloride pumping in HR, the interactions between HRs, effects of charges on the membrane, and flexibility of the membrane to tolerate the conformational changes associated with the chloride binding and releasing were found to be essential. We successfully immobilized cbb3 on the electrode and found that immobilized cbb3 can electrochemically mediate the four-electron reduction of molecular oxygen on the electrode. Further experiments are required to improve the efficiency of the reduction of molecular oxygen by using the nanodisc-reconstituted enzyme.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ナノディスク 膜結合蛋白質 電極反応 シトクロム酸化酵素 ハロロドブシン 光駆動塩素イオンポンプ

### 1. 研究開始当初の背景

金属蛋白質は、金属イオンの特性を制御することで、小分子や人工高分子では実現できない高選択性、高効率で多様な化学反応を触媒することが可能な点から、機能性分子としての応用が試みられてきた。特に、膜結合金属蛋白質は、生体内で生命維持に必須な多くの生物学的過程において中心的な役割を果たすことから、その機能の人工的な利用について注目されている。しかし、膜結合蛋白質を細胞外で利用するためには、膜に結合して機能している細胞内の環境をどのようにして細胞外で再現するかが大きな障害になっており、これまでのような界面活性剤で可溶化した膜結合金属蛋白質では、界面活性剤による蛋白質の変性、活性部位の構造変化、膜によって維持されている蛋白質結合の方向性の喪失など、膜結合金属蛋白質の高度な機能を維持するための細胞内環境を維持できない場合が多い。特に、電子の授受が必要な酸化還元反応は、その電子供給の容易さから電極反応の利用が望ましいが、膜結合金属蛋白質を電極に固定化するには、膜という異方的な環境を電極上にどのように再現し、さらにそこにどのようにして膜結合金属蛋白質を埋め込むかが大きな障害となっている。したがって、細胞内には多くの高機能な膜結合酸化酵素が存在しているにもかかわらず、それらの膜結合蛋白質を利用した高効率な電極反応の開発は困難な状況である。

### 2. 研究の目的

本研究は、細胞内で種々の重要な機能を果たしている膜結合金属蛋白質を細胞外で機能性分子として利用することを目指して、細胞内での膜結合環境を細胞外で再現するため、ナノメートルサイズで安定な円盤状脂質二重膜を形成可能な「ナノディスク」中に目的膜結合蛋白質を結合させ、「ナノディスク」化に伴う構造や機能を追跡する。さらに、酸化酵素を電極に固定化することで、従来の触媒では実現が困難な高効率での電気化学的な酸素分子の水への四電子還元を目指す。具体的な研究の目的は以下のとおりである。

(1) 「ナノディスク」化による膜結合蛋白質の構造及び機能変化の追跡 代表的な膜結合蛋白質である光駆動塩素イオンポンプであるハロロドプシン (HR) を用いて、「ナノディスク」化することにより、その光反応サイクルがどのように変化するのか明らかにし、「ナノディスク」化により、膜結合蛋白質は構造上、あるいは機能上どのような影響を受けるのか、さらには細胞内環境がどの程度再現できるのか検討を行う。

(2) 酸素分子の水への四電子還元反応を触媒できる電極固定化酵素の創製 膜結合金属蛋白質の細胞外での機能性分子への応用を目指して、細胞内のミトコンドリア呼吸鎖において、酸素分子の水への還元を触媒するシトクロム酸化酵素に注目し、その電極への固定化と電極表面での効率的な酸素分子の水への還元反応を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 「ナノディスク」化による膜結合蛋白質の構造及び機能変化の追跡 本研究では、膜結合蛋白質がナノディスクに挿入されることにより、どのような構造、機能変化を示すのか、代表的な膜結合蛋白質であり、その分光学的特性や立体構造の情報が豊富な古細菌 *Natronomonas pharaonis* 由来の HR (*NpHR*) を用いた。*NpHR* は、従来法による界面活性剤で可溶化した場合と、古細菌由来の脂質、あるいは人工的なリン脂質として POPC をそれぞれ用いたナノディスクへ挿入した場合について、その光反応サイクルにおける塩素イオンに対する親和性の変化を時分割測定可能な紫外可視吸収スペクトルを用いて追跡し、ナノディスク化による構造変化は円二色性スペクトルによって検討を行った。

(2) 酸素分子の水への四電子還元反応を触媒できる電極固定化酵素の創製 電極に固定化する酸化酵素としては、サブユニット数が少なく、予備の実験によりナノディスクにも挿入可能なことが示されているコレラ菌由来シトクロム酸化酵素 (*cbb<sub>3</sub>*) と、その構造及び機能化学的研究が進んでおり、13 個のサブユニットからなるウシのシトクロム *c* 酸化酵素 (*CcO*) について、フランス・ストラスブール大学の Hellwig 教授の研究グループが開発した手法を用いて電極に固定化し、電気化学的な酸素分子の水への四電子還元反応を効率的に進行させる系の開発を試みる。

### 4. 研究成果

(1) 「ナノディスク」化による膜結合蛋白質の構造及び機能変化の追跡 *NpHR* は HR を過剰発現する古細菌 *Natronomonas pharaonis* KM-1 から単離、精製し、古細菌の膜成分を用いてそのままナノディスク化する場合 (図 1 a) には、古細菌膜の HR 画分とナノディスク化蛋白質 MSP1D1 を用いて古細菌膜脂質ナノディスク化 HR (NL-ND)

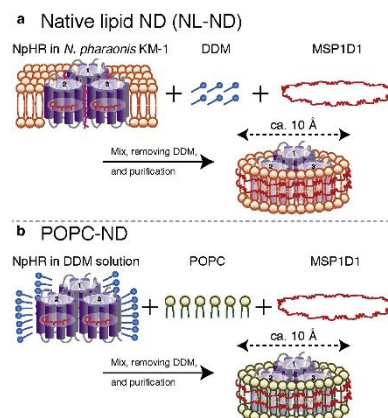


図1 ナノディスク化 HR a. 古細菌の膜成分を用いた場合。 b. POPC を用いた場合。

*NpHR*) を作成した。一方、リン脂質として人工のリン脂質である POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) を用いることで POPC ナノディスク化 HR (POPC-ND *NpHR*) を作成 (図 1b) し、さらに比較のため、従来法である界面活性剤として DDM (*n*-Dodecyl  $\beta$ -D-maltoside) を用いて可溶化した DDM 可溶性 HR (DDM-*NpHR*) も作成した。HR は光を照射すると結合している色素であるレチナールが光異性化し、右図 (図 2) のような光反応サイクルを示す。N 状態のときに結合している塩素イオンを細胞内に放出し、次の O 状態のときに細胞外の塩素イオンを結合することで、光による塩素イオンの細胞内への取り込みが進行する。したがって、この細胞内外の塩素イオンへの親和性の差が、HR のポンプ機能の効率を決める大きな要因になる。そこで、それぞれの状態での塩素イオンの親和性を分光学的手法によって算出することを試みた。まず、細胞外塩素イオンの取り込みに対応する O 状態での塩素イオンの親和性は、塩素イオンを結合していない *NpHR* に対して塩素イオンを滴定することにより、その解離定数 ( $K_{d, initial}$ ) を求めることで評価した。図 3 に示すように、ナノディスク化した *NpHR*、NL-ND *NpHR* と POPC-ND *NpHR* は、いずれもこれまでの界面活性剤可溶性 DDM *NpHR* 同様、塩素イオンの添加により特徴的な吸収極大の短波長へのシフトが観測され、塩素イオンを結合し、その  $K_{d, initial}$  はそれぞれ、16 mM、3.5 mM と算出できた。これらの値は DDM *NpHR* の 2.9 mM と比較すると、親和性としてはやや低下することが示され、ナノディスク化された *NpHR* は細胞外の塩素イオンを捉えにくくなっていることが示された。しかし、*Natronomonas pharaonic* は高度好塩菌であり、周囲環境の塩濃度が 2 M 以上で生育することから、ナノディスク化しても生理的な塩素イオン捕捉能については影響がないと考えられた。一方、細胞内への塩素イオンの放出の指標となる N 状態の塩素イオン親和性 ( $K_{d, N-O}$ ) は、光反応後の過渡吸収の変化 (図 4) から算出することができ、NL-ND *NpHR* と POPC-ND *NpHR* でそれぞれ、290 mM、269 mM と見積もられ、これらの値は DDM *NpHR* の 1200 mM に比べ 25 % 程度で親和性は強い、つまりナノディスク化することで、細胞内へ塩素イオンは解離しにくいことを示している。以上の結果は、ナノディスク化することで、塩素イオンに対する親和性は変化し、さらに

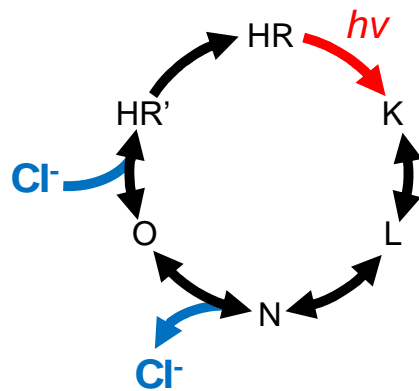


図 2 HR の光反応サイクル 塩素イオンが結合した休止状態 (HR) に光が照射されると K、L 状態を経て N 状態になると、塩素イオンを細胞内に放出する。次の O 状態になったときに細胞外から塩素イオンを取り込み、HR' を経て元の状態に戻る。

ナノディスクに含まれる脂質の種類によってもその親和性は影響を受けることが明らかになった。このようなナノディスク化することによる親和性の変化については、*NpHR* は 3 分子が会合した三量体の構造を形成しており、一つの *NpHR* 三量体がナノディスク化されることにより、*NpHR* 三量体間の相互作用が失われること、また、脂質膜の流動性や柔軟

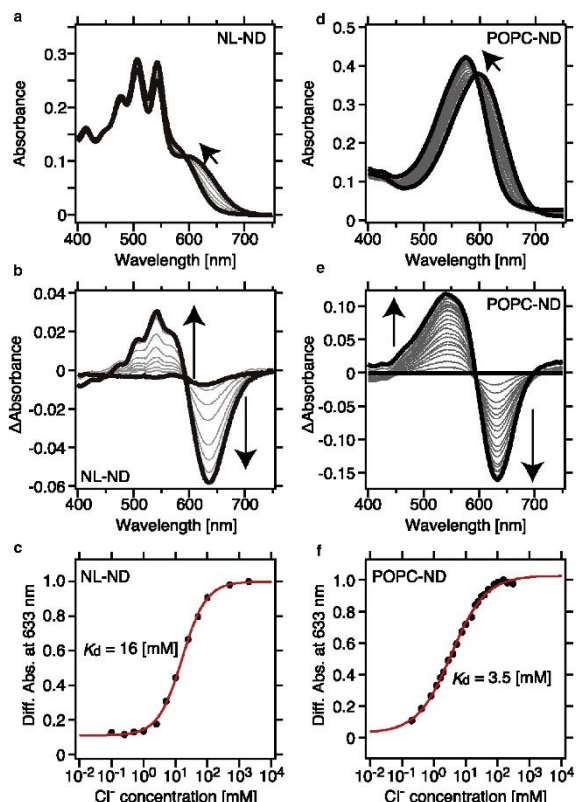


図 3 *NpHR* に対する塩素イオン滴定 (NL-NDs (a-c)、POPC-NDs (d-f)) 0.2-2000 mM の NaCl の存在下で測定。塩素イオン添加に伴って吸収帯が短波長側に遷移 (矢印)。c と f の滴定曲線から、ヒル式を用いてそれぞれの塩素イオン初期解離定数 ( $K_{d, initial}$ ) を算出。

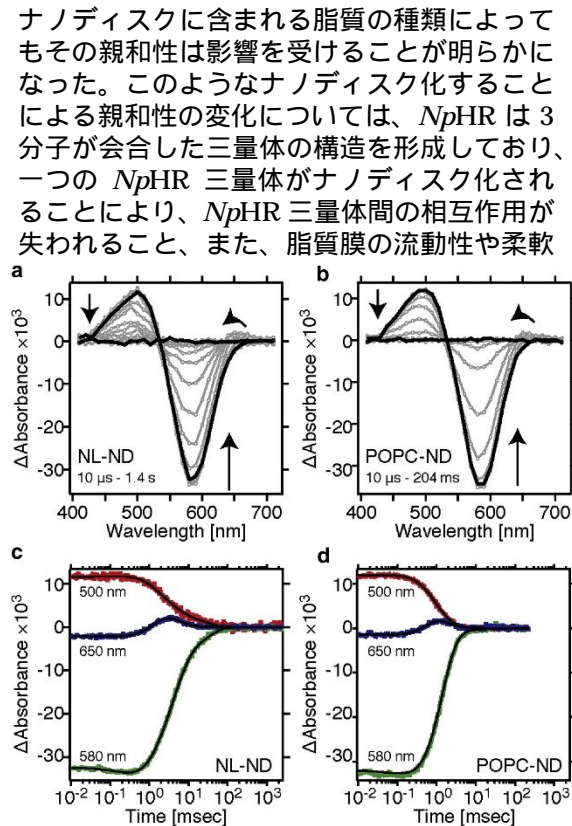


図 4 *NpHR* の光反応による吸光度変化 (NL-NDs (a, c)、POPC-NDs (b, d)) a, b の矢印は光照射後の吸光度変化を示す。b, d は、500 nm、650 nm、580 nm の吸光度変化を示し、それぞれの実線は 4 成分からなる近似曲線を示す。



性がナノディスク内では制限を受け、塩素イオンの放出の際に必要な構造変化、特に *NpHR* 三量体を構成するそれぞれの単量体が三量体外側に向かう動きが脂質によって制限されることで、塩素イオンが放出されにくくなったと想定できる。さらに、ナノディスクを構成する脂質が電気的に中性な POPC の場合では、古細菌膜のように負に帯電した脂質と *NpHR* とで働く相互作用が消失し、その結果、*NpHR* が塩素イオン取り込む際の構造変化が起こりやすくなり、親和性が上昇したと想定できる。以上のように、*NpHR* の塩素イオン結合および解離過程においては、HR 三量体間相互作用や周囲の脂質との相互作用が重要で、生体内においてはこのような相互作用により、その効率的な塩素イオンポンプ機能を果たしていると想定できる。本研究の成果の一部は米国生物物理学会誌 *Biophysical Journal* の Volume 118, Issue 11, Pages 2853-2865 に掲載された。

(2) 酸素分子の水への四電子還元反応を触媒できる電極固定化酵素の創製 シトクロム酸化酵素は分子状酸素を水分子まで還元するが、反応過程において過酸化水素などの還元途中の活性酸素種がほとんど生成せずに四電子還元することが可能である。このような酸化酵素は、人工的な酸化還元反応への利用が想定されているが、電子の供給元として、シトクロム *c* などの特定の電子供与蛋白質が必要であることから、その応用は容易ではない。しかし、電極表面に酵素を固定し、電気化学的にこの分子状酸素の効率的な四電子還元が実現できれば、特定の電子供与蛋白質の添加が不要で、連続的で効率の良い人工的な分子状酸素を用いた酸化還元系が実現できると期待できる。本研究では酸化還元酵素の電極固定化についてこれまで多くの業績を挙げているフランス・ストラスブール大学の Petra Hellwig 教授との国際共同研究として、Hellwig 教授の研究室が独自に組み立てた金ナノ粒子回転円盤電極を有する電気化学反応追跡装置を用いて、シトクロム酸化酵素による酸素分子の電極上での四電子還元反応の実現を試みた。まず、従来の可溶化法である界面活性剤を用いてコレラ菌由来の *cbb<sub>3</sub>* を金ナノ粒子回転円盤電極に固定化し、

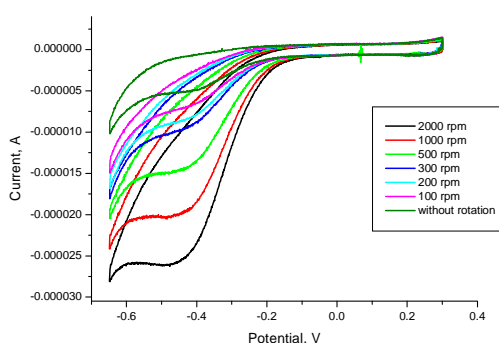


図 5 金回転円盤電極に固定化したシトクロム酸化酵素 *cbb<sub>3</sub>* の電気化学反応 (Cyclic Voltammogram) 回転数は円盤電極の回転数

酸素雰囲気下でその CV (Cyclic Voltammogram) を測定した(図 5)。その結果、酸素分子の電気化学的還元電位 ( $E_{cat}$ ) は約 -130 mV と算出でき、これは Hellwig 教授らの結果と一致した。さらに、ナノディスク化することにより、*cbb<sub>3</sub>* を電極表面で一定方向に配向させて固定化しようと試みたが、コロナ感染拡大のためストラスブール大学に滞在しての実験、測定が不可能となり、ナノディスク化試料は準備したものの、測定には至らなかった。一方、ウシ由来の *CcO* についても同様の手法で固定化とその CV 測定を行ったが、まずアルゴン雰囲気下での測定では、酸化波、還元波とも酸化還元中心に由来するピークが小さく、酸化還元電位を算出することができなかった。酸素雰囲気下においても、明瞭なピークが観測されず、酸素分子の還元は確認できなかった。これはウシ由来の酵素 13 個のサブユニットからなる超高分子膜結合蛋白質であり、*cbb<sub>3</sub>* のようなバクテリア由来の酵素のようにわずか 3 個のサブユニットからなる酵素に比べて、電極表面との相互作用が複雑で、その結果、不活性な形で固定化されたと想定できた。このウシ由来の酵素についてもナノディスク化することで、生体内の膜結合環境に近い状態を再現することで、機能を保ったままで固定化が可能であると期待したが、この測定についてもストラスブール大学での実験、測定を予定していたため、*cbb<sub>3</sub>* と同様実施することはできなかった。

以上の結果から膜結合蛋白質においては、その分子間あるいは脂質との相互作用が蛋白質構造や機能に影響を与え、ナノディスク化することで生体膜での脂質の流動性や柔軟性が変化し、細胞内の相互作用を完全には再現できないことが明らかとなった。一方、電極を用いた酸素分子の還元反応については、バクテリア由来の構成サブユニット数の少ない酸化酵素であれば実現可能であったものの、複雑な構造を有する哺乳類の酸化酵素では機能形での固定化が困難であり、ナノディスク化することなどによる構造の安定化が必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto, A., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Hashimoto, E., Kobashigawa, Y., Shibasaki, K., Uchida, T., Inagaki, F., Demura, M., Ishimori, K.	4. 巻 118
2. 論文標題 Spectroscopic Characterization of Halorhodopsin Reconstituted into Nanodiscs Using Native Lipids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 2853-2865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2020.04.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院理学研究院化学部門構造化学研究室ホームページ <a href="http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~stchem/">http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~stchem/</a> 研究紹介「発表論文からpickup」 <a href="http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~stchem/pickup/">http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~stchem/pickup/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内田 毅  (Uchida Takeshi)  (30343742)	北海道大学・理学研究院・准教授    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------