

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510251

研究課題名(和文)光駆動型イオンポンプ：ハロロドプシンのクロライド輸送素過程の解明

研究課題名(英文)Analysis of the elementary processes in the light-driven Cl⁻ pump of halorhodopsin

研究代表者

菊川 峰志 (KIKUKAWA, Takashi)

北海道大学・先端生命科学研究所(研究院)・講師

研究者番号：20281842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：高度好塩菌がもつハロロドプシン(HR)は、光駆動型のCl⁻-ポンプ膜蛋白質である。光を吸収すると複数の中間体を経由する光反応サイクルをまわり、この間に1個のCl⁻を細胞の外側から内側へ輸送する。本研究では、Cl⁻-輸送素過程の解析を行い、以下の成果を得た。1) Cl⁻の細胞質側への放出と細胞外側からの取り込みは、O中間体の生成と崩壊に同期して起こる。後続のNpHR'中間体の崩壊時には、取り込まれたCl⁻の初期結合サイトへの移動が起こる。2) Cl⁻放出時に起こる過渡的なCl⁻への親和性低下は、細胞膜電位が存在する生理的環境においても、Cl⁻輸送活性を高く維持するために必要である。

研究成果の概要(英文)：Halorhodopsin (HR) is an inward light-driven Cl⁻ pump in the membrane of halophilic archaea. Illumination triggers the photoreaction of HR called photocycle where the intermediates of K, L1, L2, N, O, NpHR' form and decay sequentially. During this cyclic reaction, HR releases Cl⁻ to the cytoplasmic (CP) medium and captures another Cl⁻ from the extracellular medium. To examine the elementary processes for Cl⁻ translocation, we analyzed the photocycle using the flash-photolysis technique and obtained the following results: 1) Cl⁻ release and uptake occur during N to O and O to NpHR' transitions, respectively. The subsequent NpHR' to original NpHR transition involves Cl⁻ displacement inside the protein. 2) The Cl⁻ binding affinity decreases at the Cl⁻ releasing step. This decreased binding affinity contributes to maintain the Cl⁻ pumping activity even in the presence of the interior negative membrane potential.

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

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 膜蛋白質 レチナル

1. 研究開始当初の背景

(1) 分子ポンプやイオンチャネルなどの輸送担体は、それぞれ構造の異なる複数の輸送中間体を經由することで、膜輸送を行っている。通常の輸送担体では、輸送中間体を実験的に捉えることは困難であり、詳細な分子機構の解明は難しい。このような分子機構の研究において、好塩性古細菌の細胞膜に存在するハロロドプシン (HR) は、最も有利な研究材料である。

(2) HR は、内包した色素レチナールの光異性をきっかけとして、種々の輸送中間体を經由する光反応サイクルをまわり、この間に 1 個の Cl⁻ を細胞の外から内へ運びイオンポンプとして機能する。光で瞬間的に活性化可能であるため、各輸送中間体が順に生成・崩壊する様子を時間的に追跡できる。

(3) 輸送中間体は互いに色が異なる。このことを利用して、申請者らを含む複数のグループが、パルスレーザを励起光に用いたフラッシュフォトリス測定を行い、輸送中間体の生成順序を規定した光反応サイクルスキームを提案してきている。輸送中間体で起こる分子内イベントも予想されているが、まだ確定的でない。同様の時間分解測定によって、分子内イベントを明らかにする必要がある。

(4) HR は暗状態において、既に Cl⁻ を蛋白質内部に結合している。光反応サイクル中に、この Cl⁻ が放出され、新たな Cl⁻ を反対側から取込む事で Cl⁻ 輸送を完了させる。初期の Cl⁻ 結合に重要なアミノ酸残基は明らかとされている。一方、過渡的な Cl⁻ 移動に重要な残基は、複数、報告されているが、その役割や分子機構は十分に検討されていない。

2. 研究の目的

膜輸送には複数の素過程が含まれるはずである。本研究では HR をモデル蛋白質として用いて、その Cl⁻ 輸送に含まれる素過程を理解することを目的とした。HR が内包するレチナールは、特定のリジン残基とシッフ塩基結合を形成している。暗状態では、このシッフ塩基近傍に Cl⁻ が結合している。そのため、最も重要と考えられる素過程は、1. Cl⁻ の初期の結合サイトから、細胞質側チャネルへの分子内移動過程、2. 細胞質側への放出過程、3. 細胞外側からの取込み過程である。これらは、他の膜輸送担体でも、重要と考えられている過程である。これらの素過程が起こる輸送中間体を確定させ、さらに素過程に重要なアミノ酸残基についての知見を得る事を目指した。

3. 研究の方法

(1) フラッシュフォトリス

中間体の吸収スペクトルが互いに異なる事を利用して、中間体の吸収スペクトルと出現

順序を決定する手法である。本研究では、530 nm、5 nsec のパルスレーザを励起光に用いて、400~700 nm の範囲で起こる吸光度変化を測定し、解析に用いた。

(2) HR 大量発現変異株 KM-1

Natronomonas pharaonis の HR (NpHR) 大量発現変異株 KM-1 の細胞膜には、NpHR と色素バクテリオルベリン (Brub) が、3:3 の複合体を形成して発現する。Brub のようなカロテノイドは、近傍の静電環境変化を反映して、吸収スペクトルシフトを起こす事が知られている。そこで、NpHR の光反応サイクル中に起こる Brub の吸収スペクトル変化を検出し、NpHR の Cl⁻ 輸送素過程を調べる事を試みた。このために、KM-1 の細胞膜から、NpHR と Brub を含む膜片を調製した。

また、KM-1 は大量に NpHR を発現するため、細胞膜ベシクルの状態で、良好なフラッシュフォトリスデータを取得できる。そこで、膜ベシクルを用いて、膜電位が光反応サイクルに与える影響を調べた。Cl⁻ の放出や取込みなど、Cl⁻ の移動が起こる素過程は、起電力を伴うので膜電位の影響を受けると予想される。膜電位は、カリウムのイオノフォアである valinomycin が誘発するカリウムの拡散電位によって付与した。

(3) Cl⁻ 輸送活性の測定

NpHR を発現した大腸菌細胞を用い、Cl⁻ 輸送によって二次的に生じる細胞外液の pH 変化を測定し、pH の変化分を輸送活性として評価した。

4. 研究成果

(1) NpHR の光反応サイクルの解析

NpHR については、以下の光反応サイクルが提案されている。

$NpHR \xrightarrow{K} L_1 \xrightarrow{L_2} N \xrightarrow{O} NpHR'$ NpHR
光反応の Cl⁻ 濃度依存性から、N O が細胞質側への Cl⁻ 放出過程、O NpHR' が細胞外側からの Cl⁻ 取込み過程と予想されているが、一部の研究グループからは、中間体の出現順序自体が異なるモデルも提案されている。上述した *N. pharaonis* KM-1 株を用いた二種類の測定によって、このモデルを検証した。

輸送素過程に同期したカロテノイドの吸収変化の検出

KM-1 から調製した膜片を用いた。暗状態における NpHR への Cl⁻ 結合と、Brub の吸収変化の関係を明らかにするため、膜懸濁液の Cl⁻ 濃度依存的な吸収スペクトル変化を測定した。その結果、Cl⁻ 結合に伴う NpHR の吸収スペクトルシフトに加えて、カロテノイド特有の振動構造の変化も検出された。これは、Brub の吸収スペクトルの短波長シフトに起因すると考えられた。それぞれの吸収変化から求めた Cl⁻ の解離定数は良く一致しており、

Brub は、NpHR が Cl⁻ を結合することによる静電的な環境変化を感じて吸収スペクトルを変化させている事が確認された。次に、フラッシュフォトリス測定によって、光反応サイクル中の Brub の吸収変化の検出を試みた。その結果、0 中間体の生成に同期して、Brub の吸収スペクトル変化も起こることが判った。さらに、この時の Brub の変化は、吸収スペクトルの長波長シフトに対応していた。一方、暗状態で観測されたのは短波長シフトである。そのため、光反応サイクル中の Brub の変化は、NpHR の Cl⁻ 放出による静電的な環境変化を反映していると考えられる。以上より、0 中間体時に Cl⁻ が放出されることが確認された。さらに、Brub の吸収変化は、規模は小さくなるものの、NpHR ' 中間体の崩壊まで持続していた。このことから、NpHR ' 中間体時に取り込まれた Cl⁻ は、未だ暗状態で結合位置には達しておらず、NpHR ' NpHR において、Cl⁻ が蛋白質内を移動することが示唆された。

光反応サイクルの膜電位依存性の検出

KM-1 から膜ベシクルを作成し、valinomycin が誘発するカリウムの拡散によって、細胞内負の膜電位を付与した。この膜電位によって生じる光反応サイクルの変化を検証した。その結果、過渡的に生じる N と 0 中間体の平衡状態が、負の膜電位によって、N 中間体側にシフトした。また、崩壊速度の明らかな遅延が 0 中間体に、僅かな遅延が NpHR ' 中間体に見られた。これらの光反応サイクルの変化は、トリフェニルスズとプロトノフォアを添加して膜電位をゼロ電位に復帰させると消失した。これらの結果は、0 中間体の生成と崩壊に同期して、Cl⁻ の放出と取込みが起こり、その後、NpHR ' 中間体の崩壊時に、Cl⁻ の蛋白質内部での移動が起こるといふ上述のモデルを支持している。

以上の結果より、「研究目的」で述べた 3 つの素過程のうち、2. 細胞質側への Cl⁻ の放出過程、3. 細胞外側からの Cl⁻ の取込み過程、が起こる輸送中間体についての知見が得られた。しかし、1. Cl⁻ の初期の結合サイトから、細胞質側チャンネルへの分子内移動過程、についての知見は得られなかった。この過程も、他の過程と同様に、静電的な環境変化と起電力を伴う過程のはずだが、それらの規模が小さく検出されなかったものと考えられる。この過程の同定は今後の研究課題である。

(2) 細胞質側への Cl⁻ 放出機構の解明

暗状態の NpHR は、約 1 mM の解離定数で Cl⁻ を結合しているが、細胞質側への Cl⁻ 放出時には、この解離定数は約 1 M まで上昇する。この解離定数の上昇には、細胞質側チャンネルに位置する Thr218 が重要であり、この機構に、細胞質側チャンネルの水和が関係していると考えられていた。この分子機構を明らかと

するため、Thr218 の種々の点変異体を用いて、Cl⁻ 放出時の解離定数、チャンネルの水和、Cl⁻ 輸送活性、の関係を調べた。その結果、Cl⁻ 放出時の解離定数とチャンネルの水和量は、218 の位置が Thr の時に最大となることが明らかとなった。一方、野生型と変異体の輸送活性には、意外にも、明確な差が見られなかった。HR の輸送活性は、通常、測定を容易にするために、プロトノフォアを添加して、細胞膜電位を打ち消した状態で行うが、プロトノフォアを加えず、したがって、細胞内負の膜電位存在下で測定した場合には、野生型と変異体間に活性の違いが観測された。活性は、解離定数が最大である野生型で最大となり、解離定数が低い変異体ほど、活性も低い事が確認された。以上の結果から、放出時の解離定数の上昇は、細胞膜電位が存在する生理的な環境においても、輸送活性を高く維持するために必要であることが明らかとなった。また、解離定数の上昇には、細胞質側チャンネルに流入した水分子と Thr の OH 基の相互作用が必須であると示唆された。

(3) *H. salinarum* 由来の HR の大腸菌発現系を用いた調製法の確立

HR の研究には、NpHR と *H. salinarum* 由来の HR (HsHR) が主に用いられてきた。両者には、輸送基質の種類や光反応サイクルなど、興味深い違いがあることが知られており、これらを比較することで、Cl⁻ 輸送機構をより詳細に検討できるものと期待される。NpHR は、大腸菌における機能的な大量発現系が確立しているが、HsHR では、これがなかった。そこで、HsHR の大腸菌発現系を用いた調製を試みた。その結果、HsHR は、不活性な状態で大腸菌膜に発現するが、可溶化時にレチナルを添加することで、活性型の HsHR を得られることが明らかとなった。この手法によって、HsHR 変異体を容易に調製できるようになった。

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 13 件)

Shibasaki, K., Shigemura, H., Kikukawa, T., Kamiya, M., Aizawa, T., Kawano, K., Kamo, N., Demura, M., Role of Thr218 in the Light-Driven Anion Pump Halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*, *Biochemistry*, 52: 9257-9268 (2013), DOI 10.1021/bi401295e, 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), DOI 10.1016/j.bpc.2013.01.001,

査読有

Furutani, Y., Fujiwara, K., Kimura, T., Kikukawa, T., Demura, M., Kandori, H., Dynamics of Dangling Bonds of Water Molecules in *pharaonis* Halorhodopsin during Chloride Ion Transportation, *J.Phys.Chem.Lett.*, 3: 2964-2969 (2012), DOI 10.1021/jz301287n, 査読有

Tsukamoto, T., Sasaki, T., Fujimoto, K.J., Kikukawa, T., Kamiya, M., Aizawa, T., Kawano, K., Kamo, N., Demura, M., Homo-trimer Formation and Dissociation of *pharaonis* Halorhodopsin in Detergent System, *Biophys. J.*, 102: 2906-2915 (2012), DOI 10.1016/j.bpj.2012.05.008, 査読有

Yamashita, Y., Kikukawa, T., Tsukamoto, T., Kamiya, M., Aizawa, T., Kawano, K., Miyauchi, S., Kamo, N., Demura, M., Expression of *salinarum* halorhodopsin in *Escherichia coli* cells: solubilization in the presence of retinal yields the natural state, *Biochim. Biophys. Acta* 1808: 2905-2912 (2011), DOI 10.1016/j.bbame.2011.08.035, 査読有

〔学会発表〕(計 36 件)

Kikukawa, T., Analysis of Cl⁻ release and uptake steps of light-driven Cl⁻ pump *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013 年 10 月 29 日, 国立京都国際会館(京都市)

Shibasaki, K., Role of Thr218 in light-driven Cl⁻ pump mechanism of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013 年 10 月 29 日, 国立京都国際会館(京都市)

Kikukawa, T., When does halorhodopsin capture and release Cl⁻ during photocycle? Examination by spectrum changes of an intrinsic voltage-sensitive dye, bacterioruberin, 15th International Conference on Retinal Proteins, 2012 年 09 月 30 日 ~ 2012 年 10 月 05 日, Monte Verita Congress Center(Switzerland)

Shibasaki, K., Volume change during the Cl⁻ transport of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin, 第 49 回日本生物物理学会年会, 平成 23 年 9 月 16 日, 兵庫県立大学(姫路市)

〔図書〕(計 2 件)

出村誠, 菊川峰志, 加茂直樹, エヌ・ティ・イー・エス, オプトジェネティクス - 光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線 -, 2013, 24-33

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

研究者番号: 20281842

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

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