

9526 高度好塩性古細菌の光駆動イオンポンプの構造と機能

助成研究者：富岡 寛顕 (埼玉大学 教育学部)

共同研究者：雀部 博之 (理化学研究所)

亀倉 正博 ((財)野田産業科学研究所)

吉田 俊久 (埼玉大学)

神取 秀樹 (京都大学)

首藤 佳子 (電気通信大学)

関 俊一 (東京理科大学)

視覚のロドプシンをはじめとする視物質、嗅覚の感覚刺激の受容体、ホルモン、および神経伝達物質の受容体は7回膜貫通型の共通構造を有しファミリーを形成する膜蛋白質である。これらの受容体蛋白の光吸収やリガンド結合は受容体の構造変化を起こして受容体を活性化する。この構造変化を記述することは機能を探る上でも重要である。生育に20%以上の塩を必要とする高度好塩性の古細菌はその細胞膜に、7回膜貫通型膜蛋白ファミリーに属する細菌型ロドプシンを持つ。その高度好塩菌のロドプシンは光を吸収すると、高等動物のロドプシンとは異なり、分解することなく元の状態に戻るという安定性から膜蛋白のモデル系として多角的アプローチが行われ、膜蛋白分野へ多くの新規概念を提供してきた。現在までに4種の細菌型ロドプシンが知られている。うち2つは光駆動のイオンポンプであり、光エネルギーを細胞内外のイオンの電気化学ポテンシャル差へと変換するエネルギー変換素子である。これら細菌型ロドプシンの蛋白部分は7本の α -ヘリックスから成り、その中にレチナール分子が存在している。光励起によりレチナール部分は構造変化し、蛋白複合体の一連の構造変化を引き起こす。その構造変化が蛋白を機能させる。発色団レチナールは構造変化中、最も重要な役割を果たすため、その発色団の吸収変化を観測することで蛋白の構造変化の最も鍵となる過程を知ることができる。その構造変化の観測と同時にイオンの輸送の過程(換言すると膜電位の形成過程)を測定することが極めて重要である。

メキシコ産の天日塩から単離されたmex株の細胞膜小胞が、高度好塩菌では従来知られていない波型の吸光度変化を赤色光励起時に示すことが解った。カロテノイドの欠損株と野生株の比較からその吸収変化はカロテノイドに由来することが示唆された。光励起を用いず拡散電位により細胞膜小胞に膜電位をかける実験から、その波型の吸収変化は膜電位依存性のカロテノイドの吸収変化であることが示された。この吸収変化を利用するとイオンポンプのイオン輸送過程のより精密な測定を実現できる可能性があり、その様な精密な測定はイオンポンプの機能解明に大きく貢献すると考えられる。

9526 高度好塩性古細菌の光駆動イオンポンプの構造と機能

助成研究者：富岡 寛顕 (埼玉大学 教育学部)

共同研究者：雀部 博之 (理化学研究所)

亀倉 正博 ((財)野田産業科学研究所)

吉田 俊久 (埼玉大学)

神取 秀樹 (京都大学)

首藤 佳子 (電気通信大学)

関 俊一 (東京理科大学)

1. 研究目的

高等動物の視覚の光受容体は、ロドプシンを代表とするレチナール蛋白複合体である。レチナールはビタミンAのアルデヒドであり、それ自身は紫外域に吸収を持ち、可視域に殆ど吸収を持たないが、蛋白との複合体となり可視光を受容できるように吸収を長波長シフトさせる。このようなレチナール蛋白は、高等動物と単細胞藻類以外では、ある一群の細菌にしか見い出されていない。その細菌とは生育に20%以上の塩を必要とする高度好塩性の古細菌である。生育に数%~10%程度の塩を要求する中度好塩菌にすら見い出されず、塩要求性の極めて高い高度好塩菌にしか見い出されない。この極めて高い塩の要求性、言い換えると、高塩濃度に対する適応ということとレチナール蛋白を持つこととの関連性を解明するために高度好塩菌の持つレチナール蛋白、中でも細胞内外のイオンバランスと膜電位に関する光駆動イオンポンプの構造と機能を探ることが我々の研究グループの大きな意味での目的である。以下に助成年度の研究目的を記す。

高度好塩性の古細菌の中で最もよく研究対象とされる菌種である *Halobacterium salinarium* には、現在までに4つのタイプのレチナール蛋白が存在することが知られている [1]。センサーロドプシン(sR)、フォボロドプシン(pR)、バクテリオロドプシン(bR)とハロロドプシン(hR)である。sRとpRは菌体の示す光依存性の行動(走光性)の受容体である。bRとhRは光駆動のイオンポンプであり、bRはH⁺を細胞の内から外側へ、hRはCl⁻を細胞の外から内側へ輸送する。つまり、bRもhRも光エネルギーを細胞内外のイオンの電気化学ポテンシャル差へと変換するエネルギー変換素子である。その形成された化学ポテンシャル差は、Na⁺やCa⁺などのイオンの輸送、アミノ酸などの取り込みや老廃物の排出などに使われている。これら細菌型ロドプシンの蛋白部分は膜貫通の7本の α -ヘリックスから構成され、その中に存在しているレチナールは、光励起前には、all-trans体で、光励起により異性化し、

13-*cis* 体になる。この構造変化がその後、蛋白複合体の一連の構造変化を引き起こし、各々の蛋白の機能を行う。この光励起により起こった構造変化は、最終的にはなくなり元の状態に戻ることから、フォトサイクルと呼ばれる。bRやhRの発色団レチナールは構造変化中、最も重要な役割を果たすため、その発色団の吸収変化を観測することで蛋白の構造変化の最も鍵となる過程を知ることができる。我々はメキシコとオーストラリアで生産された天日塩中から新しい高度好塩性の古細菌を数株単離し、その中から新しい細菌型ロドプシを見出しその蛋白部分のアミノ酸配列を調べた [2、3、4]。それらのアミノ酸配列は株毎に異なり幾つかのグループに分けられことが解った。それら新種の高度好塩菌の中でメキシコ産の天日塩から単離されたmex株の細胞膜小胞が、高度好塩菌では従来知られていない吸光度変化を示すことが解った。分光学的データはその吸光度変化が細菌型ロドプシンのイオン輸送と関連することを示唆したので、その吸光度変化について研究することを目的とした。

2. 研究方法

2. 1. 実験細菌と培養

2つの菌株、*Halobacterium* sp. mex株とそのmex株から単離した白色の変異株(mex W1)を使用した。W1株は、mexの野生株に紫外線処理(15 W 100V低圧水銀放電管、距離30 cm)した菌体から得られた変異株である。以下の成分(1l当たりの量で示した)を含む液体培地を培養に用いた。NaCl, 250 g; MgSO₄·7H₂O, 20 g; KCl, 2 g; Na₃citrate, 3 g; CaCl₂·2H₂O, 0.2 g; FeSO₄·7H₂O, 5.01 mg; MnSO₄·H₂O, 190 μg; Bacteriological peptone(L34, Oxoid), 10g。培養は好氣的条件下で5-6日間行った。

2. 2. 細胞膜小胞の調製

膜小胞の作成は2つの方法により行った。1つは凍結融解による方法で、もう1つは超音波処理による方法である。最初に凍結融解法について記す。集菌した細胞を4 M NaClに懸濁し、その懸濁液を液体窒素により凍結し、その後凍結細胞懸濁液を融かす。細胞懸濁液の粘度が高くなるので、ミキサー処理(10秒×5回)を行い、粘度を下げた。遠心操作(8000 rpm, Hitachi RPR9-2, 0°C, 15 min.)により、未破碎細胞の除去後、膜分画を超遠心操作(42k rpm, Beckman TY45Ti, 1 hour, 4°C)によって集めた。沈殿を4 M NaClに懸濁し、超遠心操作(42k rpm, Beckman TY45Ti, 1 hour, 4°C)を行った。再び沈殿を4 M NaClに懸濁した。この懸濁操作と遠心操作を上澄みが透明になるまで繰り返した。続いて超音波処理による方法について記す。集菌した細胞を4 M NaClに懸濁し、遠心操作(11000 rpm, Hitachi RPR20-2, 2°C, 15

min.) を行うことで、培地成分を除去した。細胞を4 MNaClに懸濁し、超音波処理（10 秒×5 回）を行った。超遠心操作（42k rpm, Beckman TY45Ti, 1 hour, 2°C）を行い、沈殿を4 MNaClに懸濁した。その懸濁液に対し、遠心操作（11000 rpm, Hitachi RPR20-2, 2°C, 15 min.）を行いその上澄みを回収し、再び遠心操作（17000 rpm, Hitachi RPR20-2, 2°C, 30 min.）を行い沈殿を4 MNaClに懸濁した。遠心操作（17000 rpm, Hitachi RPR20-2, 2°C, 30 min.）と4 MNaClへの懸濁を上澄みが透明になるまで繰り返す。いずれの方法でも得られた膜小胞は少量の4 MNaClに懸濁し、遮光し4°Cで保存した。

2. 3. 閃光光分解法

閃光光分解装置は通常の構成を踏襲したが、励起光源としてはキセノン放電管を用い、波長の選択は干渉フィルターを用いた。モニター光源にはタングステンハロゲンランプを用い、モニター光による試料の励起を抑えるためと励起光が検出器へ入ることを防ぐために、試料の前後に分光器を入れたところが特徴的である。検出器からの出力はA/Dコンバーターを通してコンピュータに入力し、データの保存と解析を行った。

2. 4. 脂質の抽出

BlighとDyer [5] の方法により全細胞体から又は細胞膜分画から抽出した。

2. 5. K⁺拡散電位

K⁺拡散電位は既報 [6、7] の方法に従って、バリノマイシンを用いて細胞膜小胞に印加した。拡散電位による吸光度変化はバリノマイシン添加後30秒後に測定した。

3. 研究結果

3. 1. mexの野生株の細胞膜小胞の示す閃光誘起の差スペクトル

mexの野生株の細胞膜小胞の懸濁液に赤色閃光（600-640 nm）を照射し、その照射前後の吸光度の差スペクトルを測定した（図1 A）。閃光照射後0.1ミリ秒後の差スペクトル（図1 A、白丸）は580 nm付近の負のバンドと410 nmと660 nm付近の2つの正のバンドを持っていた。これらはmex株の持つメックスバクテリオロドプシンによるものである [2]。図1 Bは赤色閃光により引き起こされる580 nmの吸光度の時間変化を示している。この波長での吸光度はメックスバクテリオロドプシンの元の状態の変化をモニターしている。その時間変化からメックスバクテリオロド

プシンは閃光照射後45ミリ秒以内に元の状態に戻っていることが解った。閃光照射後45ミリ秒後の差スペクトル(図1A、黒丸)は、440-590nmの間に極めて特徴的な波型の差スペクトルを持っていた。その波型の変化はより遅い時間での差スペクトルでよりはっきりと観測できた。図2Aに閃光照射後100ミリ秒後の差スペクトルを示した。15-20nm毎に正負のピークを繰り返す吸光度変化が見られた。図2Bには波型の吸光度変化のピーク波長の中から4つの波長を選んで、閃光誘起の吸光度の時間変化を示した。100ミリ秒以降の時間では、全ての時間変化が2つの成分に分解できた。半減期が約200ミリ秒と約10秒の成分である。590nmより長波長と420nmより短波長の幅の広いバンドは、より遅い成分だけから成っていた。そのより遅い成分はメックスセンサリーロドプシンのフォトサイクルに由来する[2]。これらの結果は、約200ミリ秒の半減期を持つ波型の吸光度変化が、メックスに存在する細菌型ロドプシンとは異なる色素に由来することを示している。

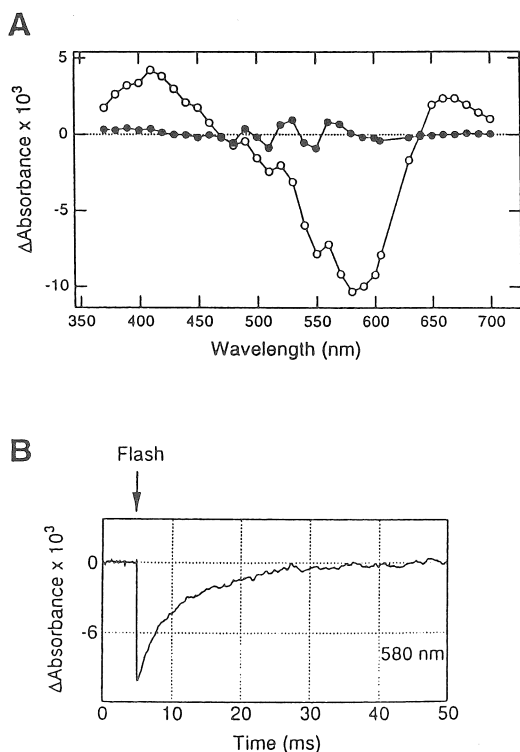


Fig. 1 Flash-induced absorbance changes in membrane vesicles from wild-type mex cells. The membrane vesicles were suspended in 4 M NaCl, 25 mM Pipes/NaOH, pH7.2. Protein concentration of the suspension was 1.0 mg/ml. Flash light (618 ± 10 nm) was provided for photoexcitation. Temperature was 20 °C. (A) Flash-Induced absorbance difference spectra at 0.1 ms (○) and 45 ms (●) after the flash. (B) Time course of the absorbance change at 580 nm.

3. 2. カロテノイド欠損株、mex W1株

図3 Aは強い赤色を呈するmex野生株の細胞膜の吸収スペクトルを示している。538, 503と476 nmの3波長にピークを持つ非常に強い吸収帯が見られる。この吸収は高度好塩菌に特有の炭素数50のカロテノイドであるバクテリオルベリンに由来するものである [8、9]。この強い吸収帯の波長領域と波型の吸光度変化の波長領域はよく一致していたので、我々は白色の変異株、mex W1株を単離した。そのmex W1株の細胞膜の吸収スペクトル (図3 B) はカロテノイドの吸収を持たなかった。

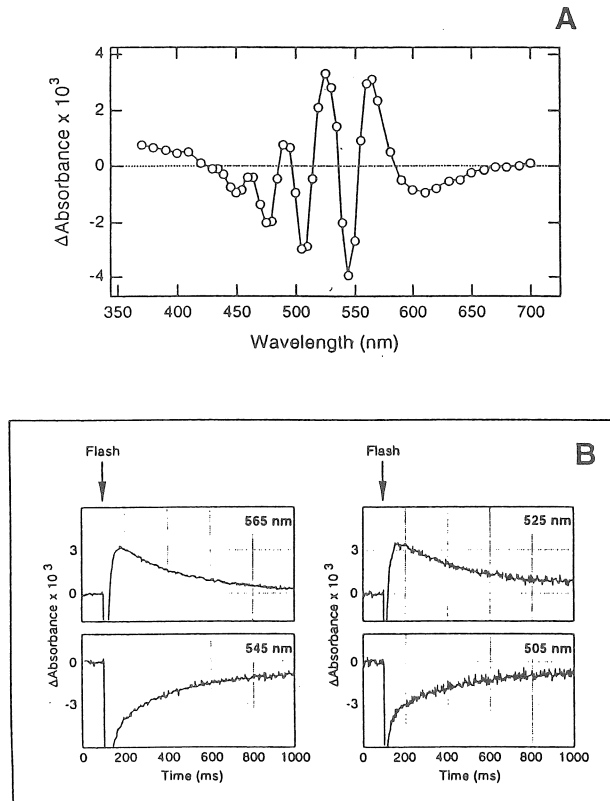


Fig. 2. Flash-induced absorbance changes in membrane vesicles from wild-type mex cells. A red flash (620 ± 5 nm) was used as an actinic light. The other conditions were the same as in Fig. 1. (A) The absorbance difference spectrum at 100 ms after the flash. (B) Time courses of the absorbance changes induced by the red flash at selected positive and negative peak wavelengths: 565 nm, 545 nm, 525 nm and 505 nm.

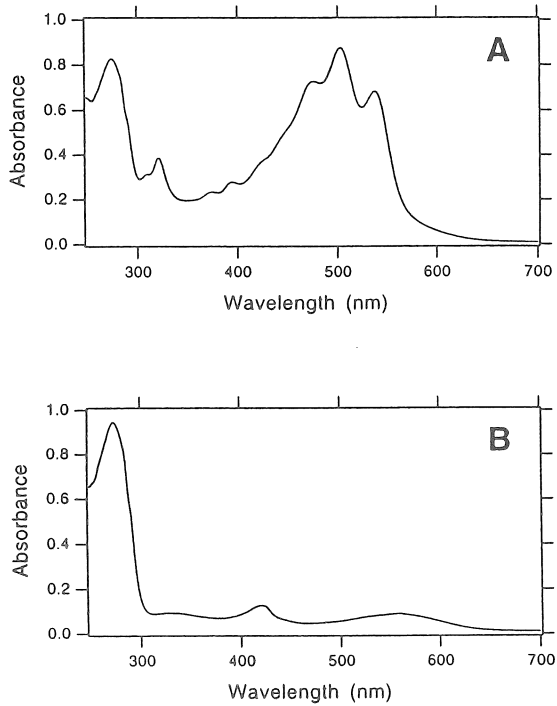


Fig. 3. Absorption spectra of membrane fraction from wild-type mex cells (A) and white mutant mex W1 cells (B). The membranes were suspended in 0.5 % MEGA-9, 4 M NaCl, 25 mM Pipes/NaOH, pH7.2. Protein concentrations were 4.2 mg/ml (A) and 6.1 mg/ml (B), respectively.

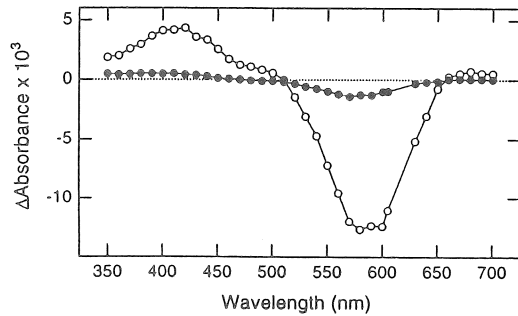


Fig. 4. Flash-Induced absorbance difference spectra in the membrane vesicles from white mutant mex W1 cells at 0.1 ms (O) and 45 ms (●) after a red flash (618 ± 10 nm). The absorbance changes were measured as shown in Fig. 1.

560 nmと410 nm付近の2つの小さな吸収帯は、カロテノイドのものではなくメックスバクテリオロドプシンとチトクロームのものであると考えられる。mex W1株の細胞膜小胞に赤色閃光を照射したときの吸収差スペクトルを測定した(図4)。野生株のもので見られたような波型の吸収は観測できず、メックスバクテリオロドプシンのフォトサイクルによると思われる580 nm 付近の負のバンドと410nm付近の正のバンドが見られた。これらの結果は、mex野生株の細胞膜小胞で440-590 nmの領域で見られた波型の吸収変化は野生株に含まれるカロテノイドによるものであることを強く示している。

3. 3. mex野生株の持つカロテノイドの吸収スペクトル

mex野生株中のカロテノイドの吸収スペクトルについて調べた。図5にはmex野生株から抽出した全脂質の吸収スペクトルを示した。カロテノイドはこの全脂質に含まれる。バクテリオルベリンに特徴的な3つのピークを有するスペクトルを持ち、600 nm以上には吸収は無かった。野生株の膜小胞励起に用いた閃光には600 nm以下の光は含まれていないため、カロテノイド由来の波型の吸収変化はカロテノイドを直接光励起することにより起こるわけではないことが示唆された。

3. 4. 光駆動のイオンポンプにより生じる膜電位

mex野生株の細胞膜には光駆動のイオンポンプであるメックスバクテリオロドプシンとメックスハロロドプシンが存在している[2]。我々が閃光に用いた赤色光でこれらのイオンポンプが励起され、膜電位が発生するかどうかをpH変化により調べた(図6)。pH変化Aでは赤色光励起によりpHの減少が観測された。これはメックスバクテリオロドプシンが光励起されプロトンを汲み出し酸性化を起こしていることを示している。プロトノフォア存在下で赤色光を照射したpH変化Bではアルカリ化が観測された。これは既報[2、3]のとおり、メックスハロロドプシンの塩

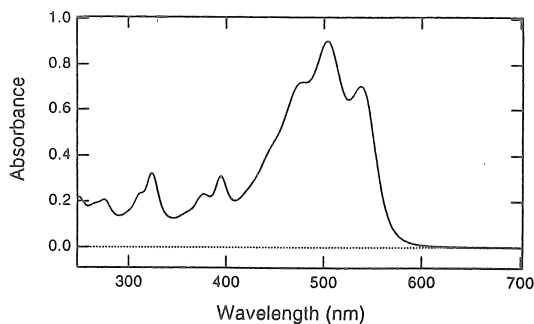


Fig. 5. Absorption spectrum of the total lipids from wild-type mex cells.

The total lipids were dissolved in chloroform.

素イオン汲み込みにより発生した内側負の膜電位により、正の電荷を持つプロトンが受動的に小胞内に取り込まれ起こったと考えられる。これらの結果は閃光に用いられた赤色光により両イオンポンプが励起され内側負の膜電位が発生していることを示している。

3. 5. バリノマイシンにより誘起されるK⁺拡散電位

前の段落で示したように、mex野生株細胞膜小胞の励起に用いられた赤色光はイオンポンプを励起し膜電位を発生させていた。このことはカロテノイド由来の波型の吸収変化は膜電位変化により引き起こされている可能性を示唆した。このことを確かめるために光を用いずに膜電位を発生させるバリノマイシン誘起のK⁺拡散電位法により、mex野生株細胞膜小胞に膜電位をかけ吸収変化を測定した(図7A)。赤色閃光励起による差スペクトルで見られたような波型の吸収変化が観測できた。

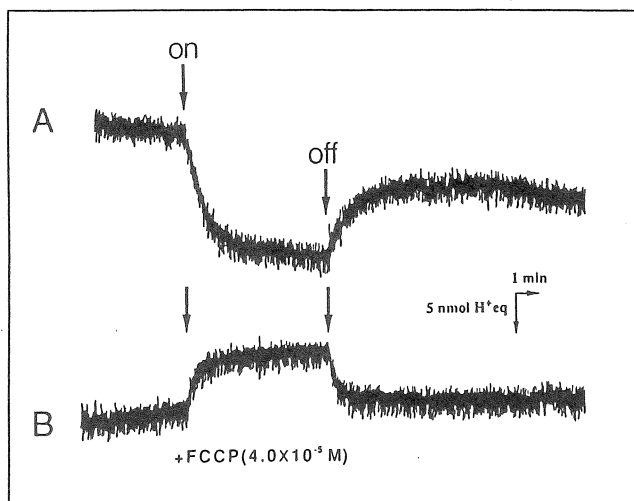


Fig. 6. Light-induced pH changes of the membrane vesicle suspension from wild-type mex cells. 3 M KCl-loaded membrane vesicles were suspended in 2.5 ml of 3 M KCl, 0.25 mM Pipes/NaOH, pH7.2. Protein concentration was 1.0 mg/ml. All measurements were done at 25 °C. An actinic light (620±5 nm) was delivered for the times indicated by arrows. (A) No addition to the membrane vesicle suspension. (B) 10 µl of FCCP dissolved in DMSO was added to the vesicle suspension. The final concentration of FCCP was 4.0×10^{-5} M.

その拡散電位誘起の吸収変化を膜電位に対してプロットしたのが図7Bである。-20から-90 mVの範囲でほぼ直線関係が観測できた。0から-20 mVではほとんど吸収変化が観測できず閾値の存在が考えられる。これらの結果はmex野生株細胞膜小胞で観測されたカロテノイド由来の波型の吸収変化は膜電位により生じていることを強く示している。このことは膜電位を打ち消すイオノフォアにより、吸収変化が打ち消されることによっても確かめられた。

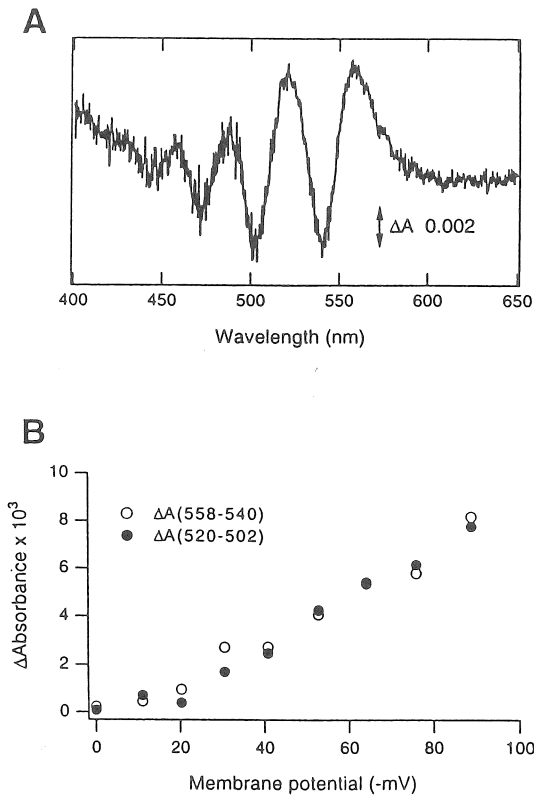


Fig. 7. (A) Absorbance difference spectrum induced by K^+ diffusion potential in the membrane vesicles from wild-type mex cells. Protein concentration of the vesicle suspension was 1.0 mg/ml. Difference spectrum was measured at 30 s after the addition of valinomycin to a final concentration of 0.375 μ M. Applied diffusion potential was -88.8 mV. Temperature was 21 °C. (B) Dependence of the carotenoid absorbance change on the membrane potential. Absorbance difference between the positive and negative peaks: $\Delta A(558-540)$ and $\Delta A(520-502)$ were plotted against the applied membrane potential. The other conditions were the same as in Fig.7A.

4. 考察と今後の課題

この報告で述べたようにmex野生株中のカロテノイドは膜電位依存性の吸収変化を示した。このようなタイプの吸収変化は光合成系で研究されている [10] が、高度好塩性の古細菌では今までは報告が無い。極めて多くの研究がなされている高度好塩菌種である *Halobacterium salinarium* も mex 野生株と同様なカロテノイドを持ち、多くの分光学的な研究報告があるが、ここで示したような膜電位依存性のカロテノイド吸収変化の報告は無かった。持っているカロテノイドは同じで、持っている光駆動のイオンポンプも極めてよく似ているのに *salinarium* では見られず、mex株では見られるのはなぜかは今後の課題である。おそらくカロテノイドを取り巻く環境の違いによるのであろう。膜電位依存性の吸収変化に必須な環境要因は何かはこれら2つの株の詳細な比較研究により明らかになるであろう。

カロテノイドの膜電位依存性の吸収変化を利用するとイオンポンプのイオン輸送過程のより精密な測定を実現できる可能性があり、その様な精密な測定はイオンポンプの機能解明に大きく貢献する可能性を秘めている。

5. 文献

- [1] Spudich, J. L. and Bogomolni, R. A. (1988) Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17, 193-215
- [2] Otomo, J., Tomioka, H. and Sasabe, H. (1992) J. Gen. Microbiol. 138, 1027-1037
- [3] Otomo, J., Tomioka, H., and Sasabe H. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1112, 7-13
- [4] Otomo, J., Urabe, Y., Tomioka, H., and Sasabe H. (1992) J. Gen. Microbiol. 138, 2389-2396
- [5] Bligh, E. G. and Dyer, W. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917
- [6] Renthall, R. and Lanyi, J. K. (1976) Biochemistry 15, 2136-2143
- [7] Manor, D., Hasselbacher, C. A. and Spudich, J. L. (1988) Biochemistry 27, 5843-5848
- [8] Kelly, M., Norgard, S and Liaaen-Jensen, S. (1970) Acta. Chem. Scand. 24, 2169-2182
- [9] Kushwaha, S. C., Kramer, J. K. G. and Kates, M. (1975) Biocim. Biophys. Acta 398, 303-314
- [10] Witt, H. T. (1979) Biochim. Biophys. Acta 505, 355-427

Structure and function of light-driven ion pumps in halophilic archaeobacteria

Hiroaki Tomioka¹, Hiroyuki Sasabe², Masahiro Kamekura³, Toshihisa Yoshida¹, Hideki Kandori⁴, Yoshiko Shudo⁵ and Sunichi Seki⁶

¹ Department of Chemistry, Faculty of Education, Saitama University

² The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

³ Noda Institute for Scientific Research

⁴ Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University

⁵ Department of Electronic Engineering, University of Electro-Communications

⁶ Department of physics, Science University of Tokyo

Photoreceptor protein, rhodopsin, olfactory receptor, hormone receptors and neurotransmitter receptors have a common structural motif, 7 transmembrane alpha-helices. Photon absorption and ligand bindings causes conformational changes in the receptors and the receptors take the excited states. Characterizations of the conformational changes and the actions of receptor proteins are required for revealing the structure-function relationship. Halobacterial rhodopsins which belong to the 7-helices family are stable proteins. The stability gives halobacterial rhodopsins advantages over other receptors in the various analyses. Four kinds of halobacterial rhodopsins have been found in the cell membranes. Two of them are light-driven ion pumps which convert the light energy into the chemical energy. The conformational changes of halobacterial rhodopsins are characterized by monitoring the color changes of the retinal chromophore.

Membrane vesicles of wild-type *Halobacterium* sp. mex strain show a wavy absorbance change which has not been so far reported in halophilic archaeobacteria. A white mutant strain lacking carotenoids did not show the wavy absorbance change. The wavy absorbance change in the range of 440-590 nm was induced by a red flash (600-640 nm), which photoexcited electrogenic ion pumps, mex bacteriorhodopsin and mex halorhodopsin but not carotenoids. The wavy change was also caused by K⁺ diffusion potentials without light. These results suggest that the wavy absorbance change in the membrane vesicles is the voltage-dependent absorbance change of the carotenoids. This absorbance change have potential in the precise evaluation of the membrane voltage. It may bring the great development in the understanding the mechanism of the ion pumping by proteins.