

## 9528 光駆動塩素イオンポンプ、ハロロドプシンの構造安定性に及ぼす塩の効果

助成研究者：杉山 康雄 (名古屋大学 理学部)

共同研究者：永野 一樹 (名古屋大学)

### 1. 研究目的

高度好塩菌 (ハロバクテリア) は特徴的に、その細胞膜にレチナールを発色団とするタンパク質をもつ。現在までに光エネルギー変換レチナールタンパク質としてバクテリオロドプシン (bR; プロトンポンプ) とハロロドプシン (hR; 塩素イオンポンプ) が見出されている。bR は細胞膜中で紫膜を形成する。紫膜はbRと脂質 (重量比3:1) から成り、塩、熱、pH等に対して安定である。一方、hRの存在量はbRの数十分の一で、また、bRの様に紫膜を形成していない。そして、0.1M NaCl中では不安定で徐々にレチナールを遊離して変性することが報告されていた。しかしながら、大量調製の容易なbRに比べ、80Lの培養から3mgのhRしか精製できないのでhRの構造安定性を系統的に検討することは困難であった。最近、hRを大量に発現するハロバクテリアが遺伝子操作で作成され、hRの大量調製が容易となった。そこで本研究では、大量発現hRを用いて、その塩、熱、pHに対する安定性を詳細に調べ、hRの保存法と構造安定性との関係を明らかにすることを目的とする。

### 2. 研究方法

hRを大量に発現する組み換え好塩菌を40度Cで5日間振盪培養した。集菌後、紫膜調製法に準じた方法で紫膜画分を得た (hR紫膜)。hR紫膜を2MNaClと5%のコール酸ナトリウムで可溶化し、フェニルセファロースカラムを用いてhRを精製した。溶出には2MNaCl, 25mMTris-HCl, pH7.2, 0.5%MEGA-9を用いた (精製hR)。また、MEGA-9を透析除去した精製hRも調製した。これらの試料を様々な条件で保存したのち吸収スペクトルを測定し、hRの安定性を調べた。

### 3. 研究結果

hR紫膜は、吸収スペクトルとSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動から純度40~50%であった。また、予想に反して、蒸留水中でもhR紫膜の退色 (565nm吸光度の減少) が急速に進むことはなく、4度Cで保存すれば一週間で20%程度の退色 (変性) であった。

hR紫膜を界面活性剤で可溶化し高塩濃度溶液中でhRを精製した。精製hRを0.5%MEGA-9を含む種々の濃度のNaClで希釈し直ちに吸収スペクトルを測定したところ、少なくとも80mMまでNaCl濃度を下げても吸収スペクトルは変化しなかったが、保存時間とともに $A_{570}$ 値が減少し、 $A_{380}$ 値が増加した。この変性過程は低塩濃度と高温で促進された。しかしながら、可溶化精製hRからMEGA-9を除去したところ、4度Cから40度Cの温度範囲では、一週間経っても精製hRの退色は見られなかった。従って、界面活性剤を除去した精製hRは安定となることがわかった。これらの結果から、膜タンパク質hRの構造安定性について考察する。



## 9528 光駆動塩素イオンポンプ、ハロロドプシンの構造安定性に及ぼす塩の効果

助成研究者：杉山 康雄 (名古屋大学 理学部)

共同研究者：永野 一樹 (名古屋大学)

## 1. 研究目的

高度好塩菌 (ハロバクテリア) は殆ど飽和の塩水 (25% NaCl) 中でのみ生育できる古細菌の一グループである。通常アミノ酸を炭素源とエネルギー源として細胞膜にある呼吸鎖電子伝達系を作動させ生育している。ハロバクテリアの自然界での生育環境は砂漠や高地の塩湖や塩地、そして、塩分濃度の上がった湾内の塩溜まり等であり、高温、高強光下で水中の酸素分圧が低下する。そのような条件でもハロバクテリアは細胞膜にあるレチナールを発色団とするタンパク質によって光エネルギーをATPの化学エネルギーへ変換できるので生存可能となる。現在までに光エネルギー変換レチナールタンパク質としてバクテリオロドプシン (bR; プロトンポンプ) とハロロドプシン (hR; 塩素イオンポンプ) が見出されている。bRは細胞膜中で二次元に規則正しく配向しパッチ状の紫膜を形成する。紫膜はbRと脂質 (重量比3:1) から成り、塩濃度、温度、pH等に対して安定である。bR (248アミノ酸残基からなる) の立体構造は3Åの分解能で決定されている (1)。そのモデルによると、膜を貫通する七本の両親媒性ヘリックスがその親水性側面と疎水性側面をそれぞれ分子内部と脂質2重層に向けてパッキングし、分子内部にレチナールポケットを形成している。このパッキング様式がbRの構造安定化をもたらしていると思われるがその物理化学的詳細は知られていない。

一方、ハロバクテリアの細胞膜中でのhRの存在量はbRの数十分の一で、また、bRの様に紫膜を形成していない。そして、菌膜小胞を0.1M NaCl中に55時間保存すると、そのhR量は30%に減少することが報告されていた (2)。また、我々は1984年非イオン性界面活性剤で可溶化して精製したhRは2M NaCl中から2M NaNO<sub>3</sub>中へ移すと徐々にレチナールを遊離して変性することを報告した (3)。したがって、hRはbRより構造安定性が明らかに低い。しかしながら、大量調製の容易なbRに比べ、80Lの培養から3mgのhRしか精製できなかったのでhRの構造安定性を系統的に検討することは困難であった。その後、1987年hRのアポタンパク質 (hO) 遺伝子が単離され、そのアミノ酸配列はbRと30%の相同性であること、そして、立体構造も似ていることが示唆された (4)。最近 (1993年)、hRを大量に発現するハロバクテリ

アが遺伝子操作で作成され、hRの大量調製が容易となった（5、6）。そして、その七本の両親媒性ヘリックスはハロバクテリアの細胞膜中でbRと同様な折り畳まれ方をしていることが電子顕微鏡像の解析から明らかになった（7）。そこで本研究では、大量発現hRを用いて、その塩、温度、界面活性剤、pHに対する安定性を詳細に調べた。そして、hRの保存法と構造安定性との関係を明らかにし、bRとの比較によって、hRの構造安定性を高める要件を見出し、さらに、研究目的に応じたhRの安定な調製法を確立することを目的とする。

## 2. 研究方法

### 2-1. 好塩菌の培養と実験材料の調製

#### 2-1-1. hR紫膜の調製

hRを大量に発現する組み換え好塩菌（J.K.Lanyiカリフォルニア大学教授から分譲された）を1Lの培地（25% NaCl, 1% MgSO<sub>4</sub>, 0.3% Na-citrate, 0.2% KCl, 0.02% CaCl<sub>2</sub>, 1% polypeptone, pH 7.2）中で40度C、5日間振盪培養した。通常8 L（1 L、8本）培養した。集菌後、基礎塩溶液（25% NaCl, 1% MgSO<sub>4</sub>, 0.2% KCl, 0.02% CaCl<sub>2</sub>）で洗った後、少量の基礎塩溶液で懸濁し50倍容量の蒸留水に一晩透析した。生じた溶菌液にDNaseを加え、30分放置した後、紫色の膜断片を遠心（30,000rpm, 30分）で集め、0.1M NaClで3回洗った。次いで、蒸留水で洗浄したのち、ショ糖密度勾配遠心（25,000rpm, 18時間、20度C）で膜画分を分離した。紫膜画分を蒸留水で希釈して、遠心（30,000rpm, 30分）によってショ糖を除き、遠心ペレットを蒸留水で懸濁し、4度Cで保存した（hR紫膜）。

#### 2-1-2. hRの精製

hR紫膜に終濃度2MのNaClと5%のコール酸ナトリウムを加え、室温で30分攪拌し、遠心（30,000rpm, 30分）した。可溶化した上清をあらかじめバッファーA（2M NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.5% コール酸ナトリウム）で平衡化してあるフェニルセファロースカラムにのせてからバッファーAで淡い黄色のフラクションが溶出されつくすまでよく洗った（この条件ではhRは溶出されない）。次いで、バッファーB（2M NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.5% MEGA-9）によって紫色のフラクションを溶出させ、4度Cで保存した。紫画分の濃縮は限外ろ過で行った。

#### 2-1-3. MEGA-9を除去した精製hRの調製

フェニルセファロースカラムで精製したhRを2M NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.2に対して透析しMEGA-9を除去した。この操作で凝集したhRを遠心（25,000 rpm,

30分) によって回収し、2M NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.2で懸濁し4度Cで保存した。

## 2-2. hRの構造安定性の測定

hR紫膜、精製hR、及び、MEGA-9を除去した精製hRを塩の種類と濃度、温度を変えて保存し、吸収スペクトルを経時的に測定した。熱変性に伴う二次及び三次構造変化はCDで測定した。

## 3. 研究結果

### 3-1. hR紫膜の構造安定性

bR紫膜は細胞膜中でbR分子が自己集合しているため、低張処理で溶菌させて細胞膜を断片化すると他の膜成分から容易に分離することができる。そして、酸 (pH 1)、アルカリ (pH 11)、熱 (95度)、種々の飽和塩溶液、尿素、グアニジン塩酸、30%エタノール中でもbRのクロモホアは安定で、また、連続光照射によっても退色しない (動物の目にあるロドプシン類との相違)。一方、野生型のhR産生ハロバクテリア株では、hR分子は膜中で分散しており、低張処理で溶菌させても“紫膜”として単離することはできなかった。本研究で用いたhR大量発現菌の集菌後のペレットは紫色であり、低張処理による溶菌で断片化した膜画分も紫色である。ショ糖密度勾配遠心では35% (w/w) フラクシオンに紫のバンドとなるので、bR紫膜 (40% (w/w) フラクシオン) より浮遊密度が小さい。これをhR紫膜と名付けた。図2は蒸留水中のhR紫膜の吸収スペクトルである。可視部と紫外部の吸収極大波長は、それぞれ、565 nmと275nmにあり、 $A_{280}/A_{560}$ 比は5であった。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動ではhR以外に多数の挟雑タンパク質のバンドが認められ、純度40-50%であった (図1)。分別遠心操作ではこれ以上精製を進めることはできなかった。この結果は、hRはbRと異なり大量発現しても細胞膜中でhRだけからなる領域を形成しないことを示唆している。また、予想に反して、蒸留水中でもhR紫膜の退色 (565 nm 吸光度の減少) が急速に進むことがなかった。蒸留水中にhR紫膜を保存し退色の時間経過を調べた (図2)。その結果、ハロバクテリアの脂質を結合したhR分子 (hR紫膜) は4度Cで保存すれば一週間で20%程度の退色 (変性) が起こること、室温ではこの過程が促進されることがわかった。

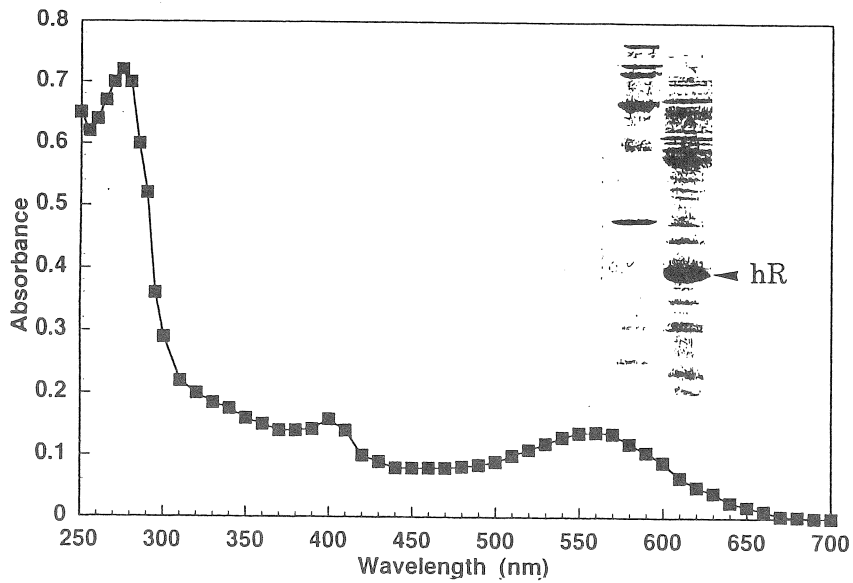


図1. hR紫膜の吸収スペクトル（蒸留水中）とSDS-PAGEの泳動パターン。hR紫膜はbR紫膜調製法に準じた方法で調製した。SDS-PAGEは15%ポリアクリルアミドゲルでおこなった。

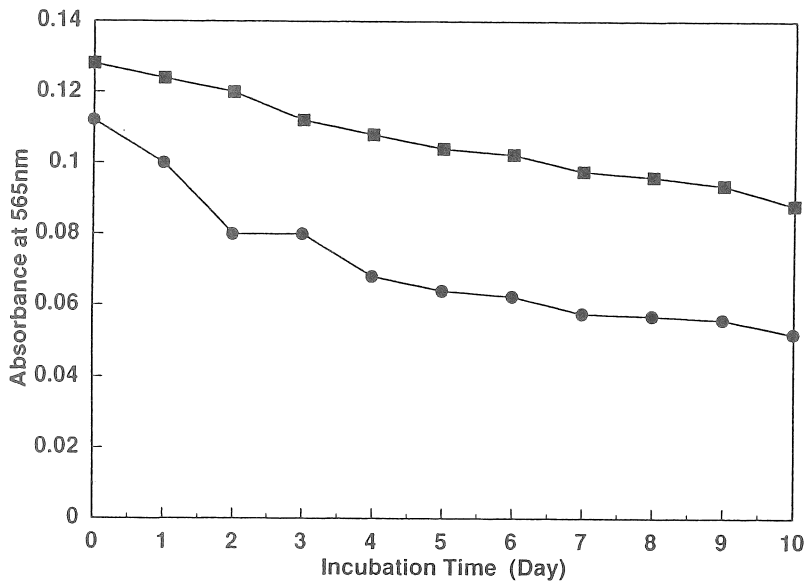


図2. hR紫膜の保存に伴う変性。蒸留水中のhR紫膜を4度C (■) と室温 (●) で暗中に保存した。一定時間ごとに吸収スペクトルを測定し、565nmの吸光度を保存時間に対してプロットした。

### 3-2. 可溶化精製hRの安定性

hR紫膜が蒸留水中でも安定であるのに対し、非イオン性の界面活性剤で可溶化し

たhRは低塩濃度では退色する。このことは可溶化によって内在性の脂質が除去されるとhRは低塩感受性になることを示唆している。そこで、hR紫膜を界面活性剤で可溶化し高塩濃度溶液中でhRを精製した。従来フェニルセファロースカラムに吸着させたhRを溶出させるために $C_{12}E_9$ やoctyl glucoside (OG) が用いられてきたが、今回我々はMEGA-9を使用した。精製hRの2M NaCl, 0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-HCl (pH 7.2) 中での吸収スペクトルを図3に示した。紫外部と可視部吸収極大波長は、それぞれ、280と 575 nmであった。精製直後には $A_{280}/A_{575}$ 比1.6の標品が得られる。この精製hRを0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-HCl (pH 7.2) を含む種々の濃度のNaClで希釈し直ちに吸収スペクトルを測定したところ、少なくとも80 mM までNaCl濃度を下げても吸収スペクトルは変化しなかった。図4に $A_{570}$ を塩濃度に対しプロットした。これらの試料を室温で保存したところ、0.2 M 以下のNaCl中では会合による濁度の上昇が見られた。一方、0.5 M以上のNaCl中では可溶化されたままであった。そこで、0.5から2.0 M NaCl中 (0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-HCl (pH 7.2) を含む) に保存し (室温)、一定時間ごとに吸収スペクトルを測定した。図5に示す様に、精製hRは保存時間とともに $A_{570}$ 値が減少し、 $A_{380}$ 値が増加した。これはhRからレチナル分子が遊離すること、そして、その過程は塩濃度が低くなると促進されることを示している。また2.0 M NaCl, 0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-HCl (pH 7.2) 中のhRは4度Cで保存すると室温の場合に比べ、レチナルの遊離速度が減少した (図6)。従って、0.5% MEGA-9中のhRの退色は塩濃度と温度に影響される。

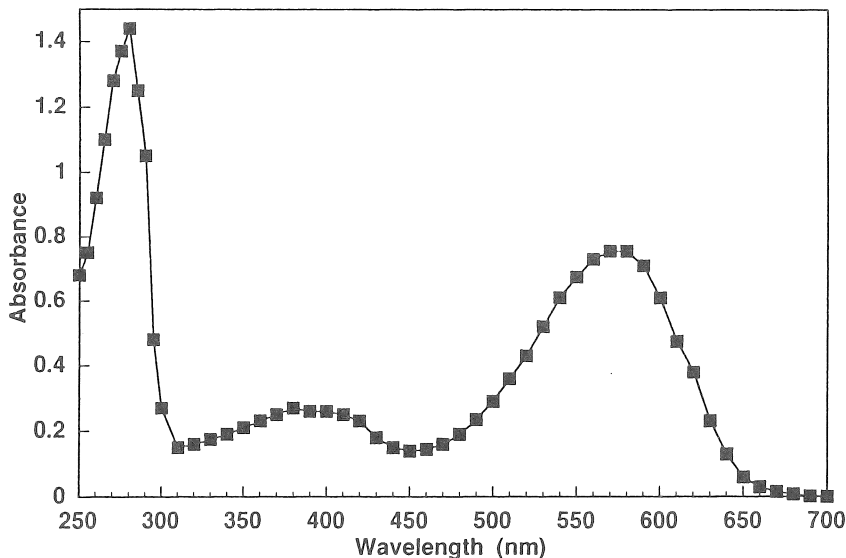


図3. 精製hRの吸収スペクトル。hR紫膜を可溶化し、疎水性クロマトグラフィーで精製した。2M NaCl, 0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-HCl (pH 7.2)中で測定した。

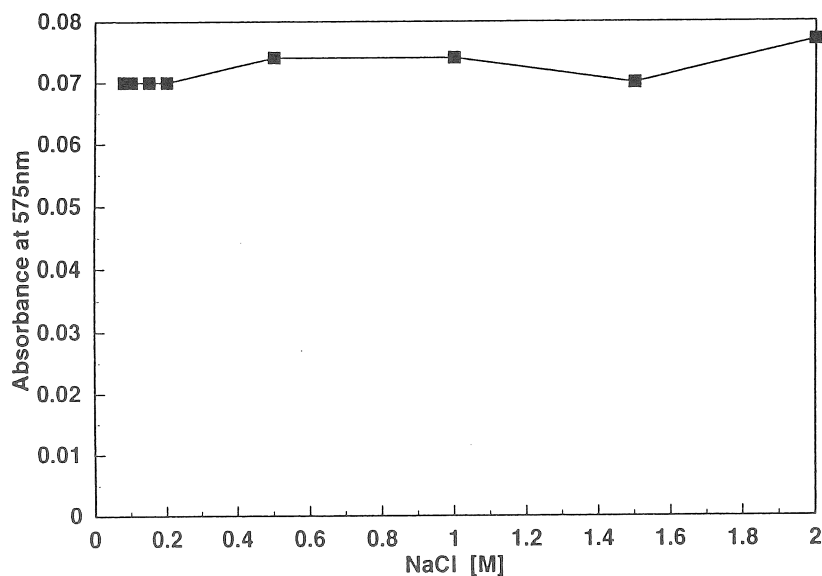


図4. 精製hRの安定性に及ぼすNaClの効果。精製hR (2M NaCl, 0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2)) を限外ろ過で濃縮してから、0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2)を含む種々の濃度のNaClで希釈し、直ちに吸収スペクトルを測定した。575nmの吸光度をその溶液のNaCl濃度に対してプロットした。

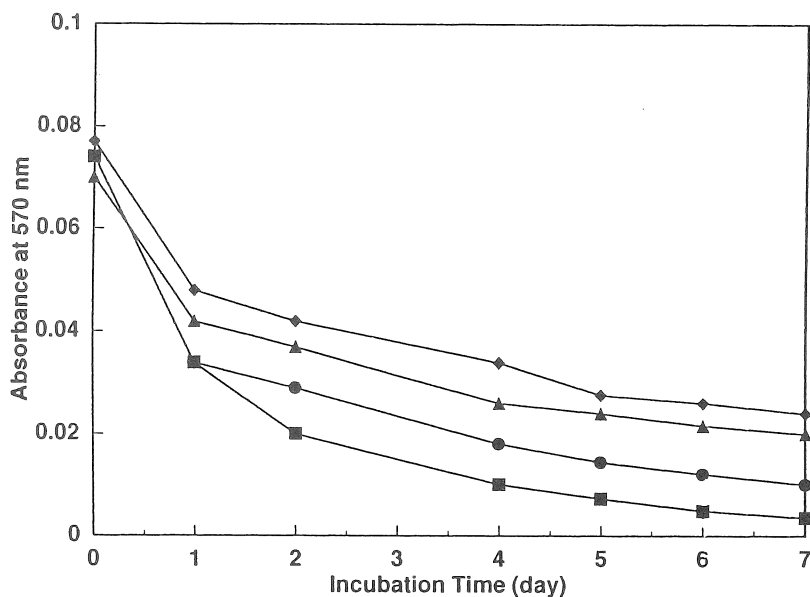


図5. 種々の濃度のNaCl (0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2)を含む) 中に保存した精製hRの変性。図4で吸収スペクトルを測定した試料を室温で保存した。一定時間ごとに吸収スペクトルを測定し、575 nmの吸光度を保存時間に対してプロットした。NaCl濃度は0.5 M (■)、1.0 M (●)、1.5 M (▲)、2.0 M (◆)である。



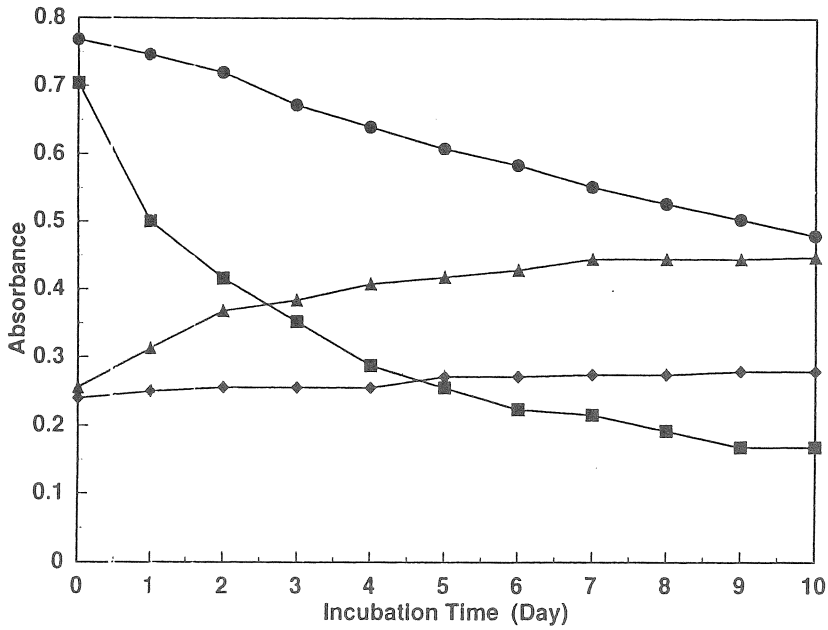


図6. 精製hRの変性に及ぼす温度の影響。精製hR (2M NaCl, 0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2)) を4度 (●、◆) と室温 (■、▲) で保存し、一定時間ごとに吸収スペクトルを測定した。575nm (●、■) と380nm (◆、▲) の吸光度を保存時間に対してプロットした。

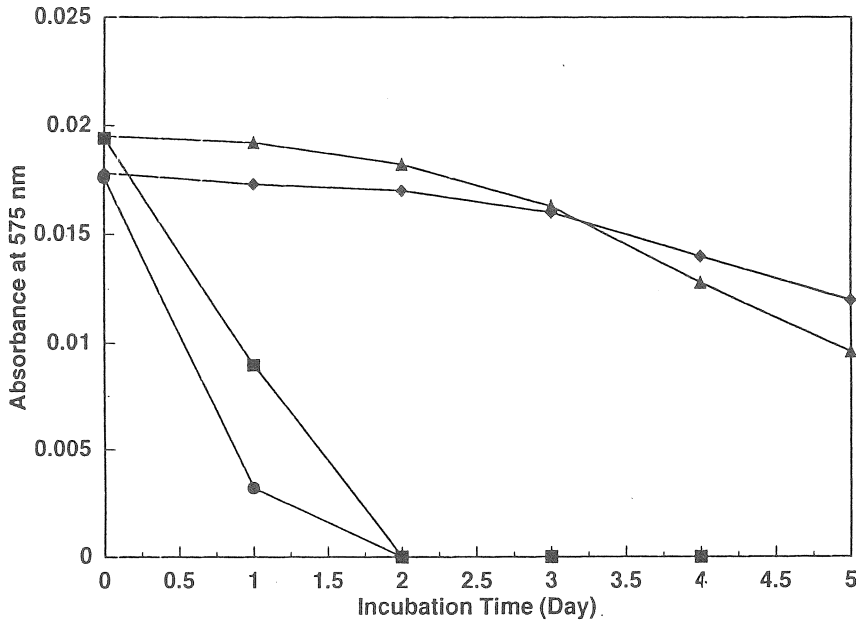


図7. オクチルグルコシド (OG) の精製hR及ぼす影響。精製hR (2M NaCl, 0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2)) を2M NaCl, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2)に対して透析しMEGA-9を除いた。遠心で回収したhRを2M NaCl, 0.5% OG, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2) (▲、■)、1M NaCl, 0.5% OG, 25 mM Tris-Cl (pH 7.2) (◆、●) で可溶化し、4度 (▲、◆) と室温 (■、●) で保存した。一定時間ごとに吸収スペクトルを測定し575nmの吸光度を保存時間に対してプロットした。

界面活性剤を0.5% MEGA-9から0.5% OGに置き換えてhRの安定性を調べたところ、室温に保存すると二日でhRは完全に退色した。1M NaCl中のほうが2M NaCl中より早く退色した。0.5% MEGA-9中と同様に4度Cで保存すると室温の場合に比べ、レチナールの遊離速度が減少した(図7)。

### 3-3. 可溶化精製hRからMEGA-9を除去した精製hRの安定性

可溶化精製hRの安定性は共存する界面活性剤によって異なることがわかったので、次に界面活性剤を除去した精製hRを調製した。フェニルセファロースカラムから溶出した精製hR(2.0 M NaCl, 0.5% MEGA-9, 25 mM Tris-HCl (pH 7.2))を2.0 M NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.2)に対して透析し、MEGA-9を除いた。この操作でhRは会合して沈殿を生じる。遠心で集めた精製hRを2.0 M NaClと1.0 M NaClに懸濁し保存した。4度Cから40度Cの温度範囲では、一週間経っても精製hRの退色は見られなかった(図8)。従って、精製hRから界面活性剤を除去するとhRは安定となることがわかった。

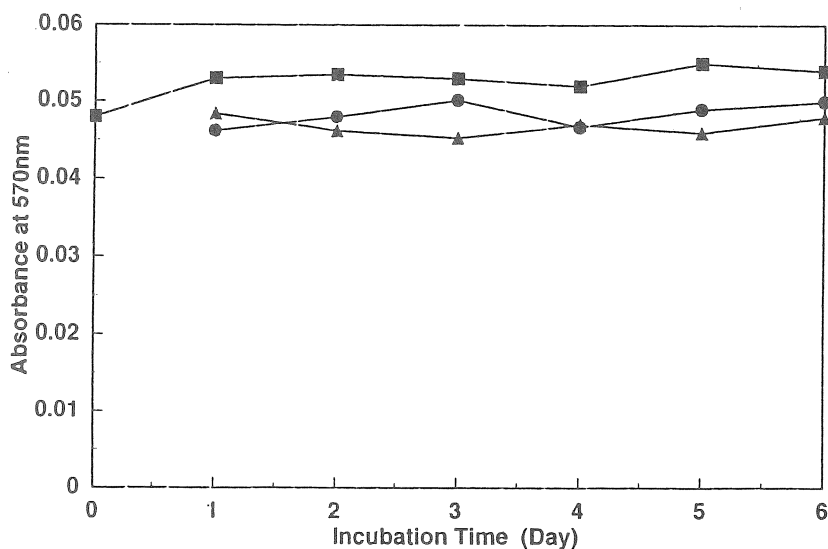


図8. MEGA-9を除いた精製hRの安定性。透析でMEGA-9を除いた精製hRを2M NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.2)中、4度(■)、20度(●)、40度(▲)で保存した。一定時間ごとに、一部を取り出し、MEGA-9を加えて可溶化し(散乱光を減らし、正確なスペクトルを得るため)、直ちに吸収スペクトルを測定した。

#### 4. 考察と今後の課題

大量発現株から調製したhRの構造安定性を様々な条件で調べた。今回は主として、等温保存過程でのhRの変性(紫色の退色)を追跡した。hR標品は、hR紫膜(純度50%)、精製hR(界面活性剤を含む)、精製hR(内在リン脂質のほとんどを除去し、また、界面活性剤を含まない)の3種類である。hR紫膜は当初の予想と異なり、塩の種類によらず、あらゆる塩濃度で安定であった。しかしながら、bR紫膜が同じ条件下で全く変性しないことに比べれば、幾分、不安定であった。界面活性剤を含む精製hRは高塩溶液中、また、低温に保存しても徐々にレチナルが遊離してしまうことがわかった。従って、このような条件下で長時間にわたって光化学反応を測定すること(特に室温以上)は避けなければならないであろう。界面活性剤を除去した精製hRは大変安定になるが、不溶性になる。従って、脂質を加えて分散させる、あるいは、プロテオリポソームにする必要がある。

一般に膜タンパク質の構造安定性はリン脂質二重膜に埋もれた領域でヘリックスのパッキングが保たれることと関係する。我々はバクテリオオプシン(bO)の*in vitro*での構造形成過程の解析から、7本のヘリックスがパッキングしてレチナルポケットが形成維持されるためには適切な界面活性剤とリン脂質が必要であることを報告した(11)。また、膜貫通ヘリックスをつなぐループ領域が構造形成や構造安定性に関与するという知見も得ている(12)。bRとhRのアミノ酸配列を比較すると、ヘリックスをつなぐループ領域の長さや各ヘリックスの疎水性側面の性質に相違が見られるので、今後、構造安定性との関連を見出す必要がある。

#### 5. 参考文献

- (1) Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, E. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 213, 899-929.
- (2) Hazemoto, N., Kamo, N., Terayama, Y., Kobatake, Y., and Tsuda, M. (1983) Photochemistry of two rhodopsinlike pigments in bacteriorhodopsin-free mutant of *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* 44, 59-64.
- (3) Sugiyama, Y. and Mukohata, Y. (1984) Isolation and characterization of halorhodopsin from *Halobacterium halobium*. *J. Biochem.* 96, 413-420.
- (4) Blanck, A., and Oesterhelt, D. (1987) The halo-opsin gene. II. Sequence, primary structure of halorhodopsin and comparison with bacteriorhodopsin. *The EMBO J.* 6, 265-273.

- (5) Heymann, J.A.W., Havelka, W.A. and Oesterhelt, D. (1993) Homologous overexpression of a light-driven anion pump in an archaebacterium. *Mol. Microbiol.* 7, 623-630.
- (6) Walter, T.J., and Braiman, M.S. (1994) Anion-protein interactions during halorhodopsin pumping: Halide binding at the protonated Schiff base. *Biochemistry* 33, 1724-1733.
- (7) Havelka, W.A., Henderson, R., Heymann, J.A.W. and Oesterhelt, D. (1993) Projection structure of halorhodopsin from halobacterium halobium at 6 Å resolution obtained by electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 234, 837-846.
- (8) Havelka, W.A., Henderson, R., and Oesterhelt, D. (1995) Three-dimensional structure of halorhodopsin at 7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 247, 726-738.
- (9) Steiner, M., Oesterhelt, D., Ariki, M., and Lanyi, J.K. (1984) Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. 1. Effects on the chromophore. *J. Biol. Chem.* 259, 2179-2184.
- (10) Varo, G., Zimanyi, L., Fan, X., Sun, L., Needleman, R., and Lanyi, J.K. (1995) Photocycle of halorhodopsin from *Halobacterium salinarium*. *Biophys. J.* 68, 2062-2072.
- (11) Sugiyama, Y., and Mukohata, Y. (1996) Dual roles of DMPC and CHAPS in the refolding of bacterial opsins in vitro. *J. Biochem.* 119, in press
- (12) Sugiyama, Y., Koyanagi, T., Nagano, K., Yamada, N. The chromophore regeneration of the insertion and deletion mutants in the loop region of bacterial opsins. (in preparation)

9528 Effects of salt on the stability of light-driven chloride pump, halorhodopsin.

Yasuo Sugiyama and Kazuki Nagano  
Department of Biology, School of Science, Nagoya University

Summary

Halophilic archaeobacteria have the characteristic retinal proteins in their cytoplasmic membrane. Bacteriorhodopsin (bR) is a light-driven proton pump and forms a two-dimensional crystalline patches in the membrane, which is known as purple membrane (PM). bR in PM is stable in a medium containing high concentration of salts, an acidic or alkaline solution and furthermore at high temperature (above 100 °C). In contrast, the amount of halorhodopsin (hR), a light-driven chloride pump, is less than 10% of the bR content and the crystalline membrane domain of hR does not naturally form. It was reported that hR in the membrane was not stable in 0.1 M NaCl and slowly denatured. However, it was difficult to examine the effects of salts and temperature on the stability of hR systematically, since only 3 mg of hR was purified from 80 L culture. Recently, recombinant halobacterium overexpressing hR was constructed from which large amounts of hR were easily isolated. In this study we examined the stability of hR chromophore under the various storage conditions.

hR/PM was prepared from hR overexpressing *Halobacterium salinarium*. SDS-PAGE of hR/PM indicated that the purity of hR was 40-50 %. Since the absorbance at 565 nm decreased by 20 % after one week at 4 °C, hR/PM was stable even in distilled water.

hR was purified by a phenyl-Sepharose column chromatography in the presence of MEGA-9. The absorbance at 570 nm of purified hR in 0.5 % MEGA-9 decreased and became to be 30 % after one week even in the presence of 2 M NaCl (isothermal bleaching). The rate of this bleaching was accelerated in a low salt medium and at a higher temperature. However, when MEGA-9 was removed from the purified hR by dialysis, hR was very stable in the range from 4 °C to 40 °C. Therefore, the stability of hR was related to the concentration of salt, detergent and temperature.