

9727 高度好塩菌の水溶性タンパク質と膜タンパク質の好塩性の比較

助成研究者：杉山 康雄 (名古屋大学 大学院理学研究科)
 共同研究者：井原 邦夫 (名古屋大学 大学院理学研究科)

1. 研究目的：高度好塩菌は殆ど飽和の塩水中でのみ生育できる古細菌の一グループである。生物が高塩環境に適応するためには、細胞内部に有機小分子を大量に生成するか、あるいは、無機イオン（主としてKCl）をためこみ、浸透圧差による細胞の破壊から免れる機構を獲得する必要がある。高度好塩菌は後者を選択し、それ故、細胞の生化学的装置や酵素はすべて、高塩濃度で機能しなければならない。実際、好塩菌の水溶性酵素（リンゴ酸脱水素酵素）は2M KClやNaCl中で活性を示し、低塩濃度では失活する。この水溶性酵素の好塩機構は比較的良く解明されているが、細胞の生化学的装置、特に膜系や遺伝情報変換系を構成する成分の好塩機構についての知見は乏しい。そこで、立体構造の知られた高度好塩菌の水溶性タンパク質と膜タンパク質の構造とその安定性の比較、及び、様々なレチナールタンパク質の分裂酵母での機能発現の検討から、両者の塩環境への適応戦略の共通点と相異点を明らかにする。

2. 研究結果：高度好塩菌のリンゴ酸脱水素酵素とフェレドキシンは3次元立体構造が解明され、その結果、酵素表面全体に酸性アミノ酸を分布させること、及び、酸性アミノ酸に富む余分な領域を表面の一部につけ加えることが好塩性獲得の手段となっていると示唆されている。好塩菌の膜タンパク質で立体構造の知られているのはバクテリオロドプシン (bR；光駆動プロトンポンプ) だけであり、また、bRとアーキロドプシン (aR；光駆動プロトンポンプ) は細胞膜で2次元結晶構造をとり、単離しても、あらゆる塩濃度で安定である。一方、ハロロドプシン (hR；光駆動塩素イオンポンプ) は膜中で2次元結晶をつくらず、熱安定性が低いこと、及び、単離すると低塩環境で等温変性することが分かった。しかしながら、いずれのレチナールタンパク質でも表面ループ領域の酸性アミノ酸の分布に大きな違いは見られない。さらに、ハロロドプシン遺伝子を分裂酵母で発現させたところ、7本の膜貫通ヘリックスは膜に適切に組み込まれてフォールディングし、レチナールを加えると紫色の酵母が培養できた。

これらの結果は (1) 好塩菌の膜タンパク質の構造形成には高塩濃度は必須でないこと、(2) 好塩菌の膜タンパク質の塩安定性と酸性アミノ酸の分布の相関は少ないので、膜タンパク質の構造を安定化する別の機構を見い出す必要があることを示唆している。

9727 高度好塩菌の水溶性タンパク質と膜タンパク質の好塩性の比較

助成研究者：杉山 康雄 (名古屋大学 大学院理学研究科)

共同研究者：井原 邦夫 (名古屋大学 大学院理学研究科)

1. 研究目的

高度好塩菌は殆ど飽和の塩水中でのみ生育できる古細菌の一グループである。生物が高塩環境に適応するためには、細胞内部に有機小分子を大量に生成し同時に細胞外へ無機イオンを放出する、あるいは、細胞内へ無機イオン（主としてKCl）をためこむことによって、浸透圧差による細胞の破壊から免れる機構を獲得する必要がある。高度好塩菌は後者を選択し、それ故、細胞の生化学的装置や酵素はすべて、高塩濃度で機能しなければならない。実際、好塩菌の水溶性酵素（リンゴ酸脱水素酵素）は2M KCl や NaCl 中で活性を示し、低塩濃度では失活する(1)。この水溶性酵素の好塩機構は比較的良く解明されているが、細胞の生化学的装置、特に膜系や遺伝情報変換系を構成する成分の好塩機構についての知見は乏しい。そこで、立体構造の知られた高度好塩菌の水溶性タンパク質と膜タンパク質の構造安定性の比較、及び、様々なレチナルタンパク質の分裂酵母での機能発現の検討から、両者の塩環境への適応戦略の共通点と相異点を明らかにする。

このような細胞構成成分の好塩性とその生物学的意義の解析に加え、本研究では、結晶構造解析に向けて、保存条件、特に、塩環境が精製した膜タンパク質の構造安定性に及ぼす影響を詳細に検討すること、及び、膜タンパク質が自己集合し2次元あるいは3次元の結晶を形成する機構を探ることを目的とする。

2. 研究方法

2.1 材料

高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* R₁M₁, *Halobacterium salinarum* LX, *Halorubrum* ap. aus-1 は常法に従って40℃で5日から7日培養した。集菌後、基礎塩溶液で洗浄した。バクテリオロドプシン (bR) 紫膜とアーキロドプシン (aR) -1 赤紫膜は、それぞれ、R₁M₁株と aus-1 株の菌懸濁液を蒸留水 (50 倍 volume) に対して透析して溶菌させ、遠心操作 (30,000 rpm, 30 分) で集めた膜画分を蒸留水で数回洗浄後、ショ糖密度勾配遠心によって単一なバンドとして回収した。ハロロドプシン (hR) 紫膜は LX 株を同様にして溶菌させ、10 mM NaCl で数回遠心洗浄した。精製 hR は hR 紫膜を 2M NaCl 存在下 5% コール酸ナトリウムで可溶化し、疎水性力

ラムクロマトグラフィー (Phenyl-Sepharose) で調製した。いずれの試料も 4℃ で保存した。

2.2 分裂酵母発現系の構築

既に構築してあった大腸菌でのアーキオプシン (*aop*) とハロオプシン (*hop*) 遺伝子発現ベクター (2) の *NdeI/BamHI* 断片を分裂酵母発現ベクター-pREP-1 へ導入した (pREP-aR と pREP-hR)。また、酵母での green fluorescent protein (*gfp*) 発現ベクター (pREP-*gfp*)、及び、*gfp* との融合タンパク質発現ベクター (pREP-aR*gfp* と REP-hR*gfp*) を作成した。これらを *Schizosaccharomyces pombe* HM123 株 (*leu-*) へ形質導入し最小培地で生育するコロニーを選別した。レチナルタンパク質の発現は、最小培地にレチナルを添加して培養した酵母の着色、あるいは、間接蛍光抗体法で確認した。また、*gfp* との融合タンパク質の発現は蛍光顕微鏡で観察した。

2.3 電子顕微鏡による細胞膜の観察

高度好塩菌 *aus-1* 株のペレットを凍結切断しプラチナ/カーボン蒸着させてレプリカを作製し電子顕微鏡撮影した。

2.4 hR 紫膜と精製 hR の熱安定性

熱変性過程は種々の温度に保った精製試料の吸収スペクトルを経時的に測定して追跡した。

3. 研究結果

3.1 高度好塩菌のレチナルタンパク質の構造安定性

我々は、今までに、種々のカオトロピックイオン、SDS、及び、熱が bR や hR の 3 次構造に及ぼす影響を系統的に調べ以下の結果を得た。1) bR 紫膜は蒸留水中、及び、様々な塩溶液中でレチナルが遊離することはないが、hR 紫膜は塩濃度によらず、どのような溶液中でも徐々にレチナルが遊離する。2) CMC より低い濃度の SDS は bR 紫膜を変性させないが、hR 紫膜にモノマー状態で結合して 3 次構造を壊す。その過程は 570 nm→380 nm であり、中間体を経ない。3) bR 紫膜は 80℃ 程度までは安定であり、 $T_m=95^\circ\text{C}$ で熱変性する。一方、hR 紫膜は常温でも等温変性し、温度を上げると変性速度が高まる。また、いったん変性した試料の温度を下げても 570 nm の吸光度は回復しない。4) 精製 hR の熱安定性は塩濃度を上げたり (4 M 以上) 界面活性剤の濃度を下げると高まる。これらの結果から、1) hR は bR より膜外ループ領域の熱的ゆらぎが大きく、そのため高温や低塩環境で不安定になる。モノマーの SDS は主として膜外ループ領域へ結合し、常温での等温変性過程を促進する。2) hR の膜貫通ヘリックス間のパッキングも bR より弱く膜外ループ領域の熱的ゆらぎの影響を受けやすいと推察した。

bR の立体構造座標 (3) を基に hR の構造モデルを作成する (生物分子工学研究所

木村能章博士からの私信) と 1) 7本の膜貫通 α -ヘリックスのC α の座標はあまり大きな違いが見られないこと、2) ヘリックスBとC、EとFをつなぐループ領域に違いがあることが分かった。しかしながら、側鎖のパッキングの差異や脂質との相互作用部位については評価できないので、bR と hR の構造安定性の違いの由来は分からない。これを解決する最善の方法はhRを結晶(2次元あるいは3次元)化し、その3次元構造を電子顕微鏡(電子線回折)やX線結晶解析で決定することである。そのためには、1) 精製hRを長期間安定に保存する条件(塩、pH、温度)、2) 結晶化と結晶の成長に適切な沈殿剤、洗剤、及び、添加剤を見い出すことが必要である。そこで、精製hRの構造安定性に及ぼす洗剤の影響を調べた。bRの結晶化に有効であると報告(4)されている洗剤オクチルグルコシド(OG)やオクチルチオグルコシド(OTG)等はhRを変性させた。様々な洗剤の影響を調べた結果、スクロースモノラウレート(SML)、ドデシルマルトシド(DM)が有効であったので、これらについて詳しく検討した。0.5% SML存在下に種々の濃度のNaCl中に精製hRを52°Cに保存し経時的に吸収スペクトルを測定して変性(退色)過程を追跡した(図1)。MEGA-9中(2時間で50%変性; 昨年報告)と異なり、2M~4M NaCl中では5時間後も殆ど変性しなかった。また、加熱しても可視部(図2)と紫外部(図3)CDスペクトルは殆ど変化しなかった。

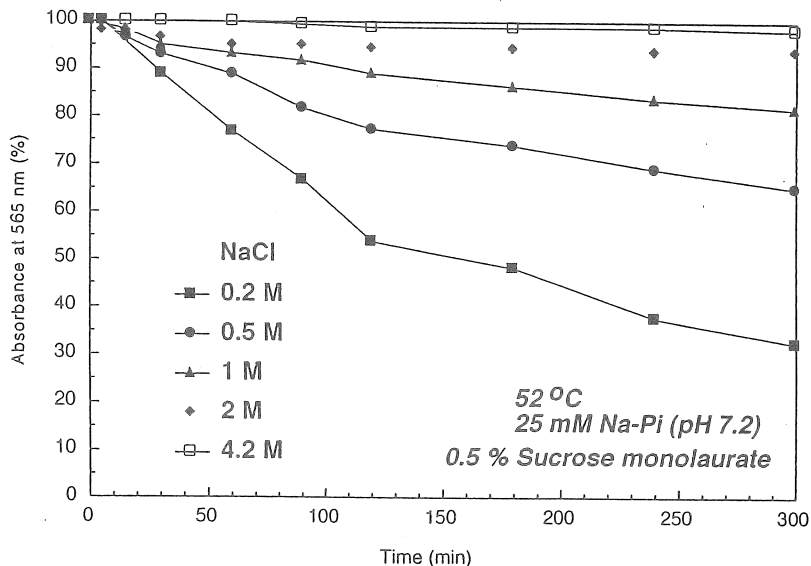
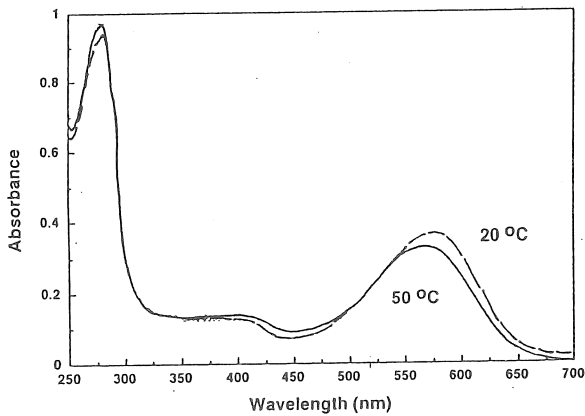


Figure 1. The isothermal denaturation of the purified hR. The purified hR was solubilized in 0.5 % sucrose monolaurate in various concentrations of NaCl. The absorption spectra were measured at 52 °C and the indicated time. A_{570} (percentage) was plotted against the incubation time.

Absorption spectra of hR in 2 M NaCl, 25 mM PI (pH 7.2) and 0.5% SM



CD spectra of hR in 2 M NaCl, 25 mM PI (pH 7.2) and 0.5% SM

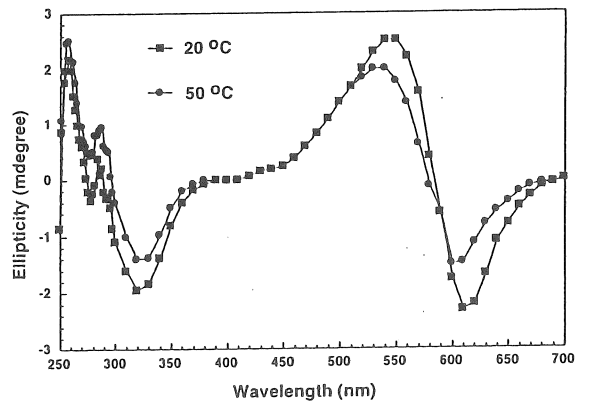


Figure 2. Absorption (left) and CD (right) spectra of the purified hR. The purified hR in 2 M NaCl, 25 mM Na-Pi (pH 7.2) and 0.5 % sucrose monolaurate was incubated at 50 °C for 30 min and the CD spectra were measured at 50 °C.

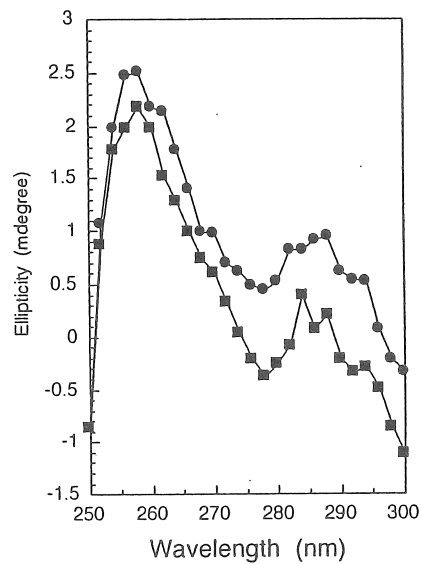
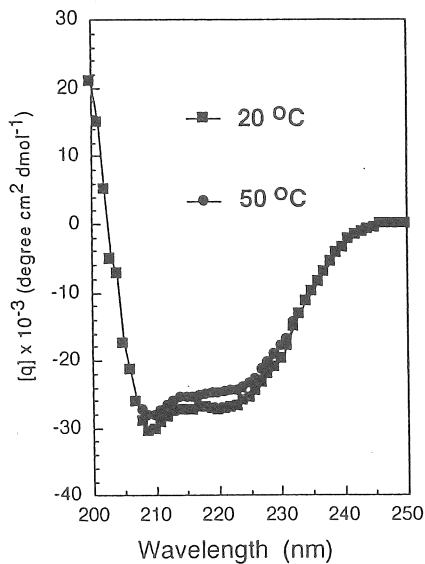


Figure 3. The far-UV (left) and near-UV (right) CD spectra of the purified hR. Measuring conditions were the same as in Figure 2.

そこで、精製 hR を種々の濃度の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中に hR を保存し経時的に吸収スペクトルを測定して変性（退色）過程を追跡した（図 4）。保存温度は 4°C と室温とした。pH 5 と pH 7 いずれでも、3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中では SML 添加によっても hR は完全に可溶化されなかった（濁度が高く 570 nm の見かけの吸光度が高い）。図で 570 nm の見かけの吸光度が保存の初期よりも徐々に大きくなるのは、保存に伴い会合が起こったことを示している。殆どの場合、会合は退色を伴った。調べた範囲（2 か月程度）では、pH 5 で 2M~3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中 4°C での保存が一番安定であった（図 4C）。室温保存すると、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度が低いほど会合が早く起こった（図 4D）。SML 可溶化 hR は 1M~2M のリン酸中（pH 5.4）では特に安定に存在した（図 5A, B）。DM 可溶化 hR は 4°C では退色しなかったが徐々に会合した（図 5C）。一方、室温では徐々に退色した（図 5D）。現在、これらの結果をふまえて蒸気拡散法で hR の結晶化を試みている。

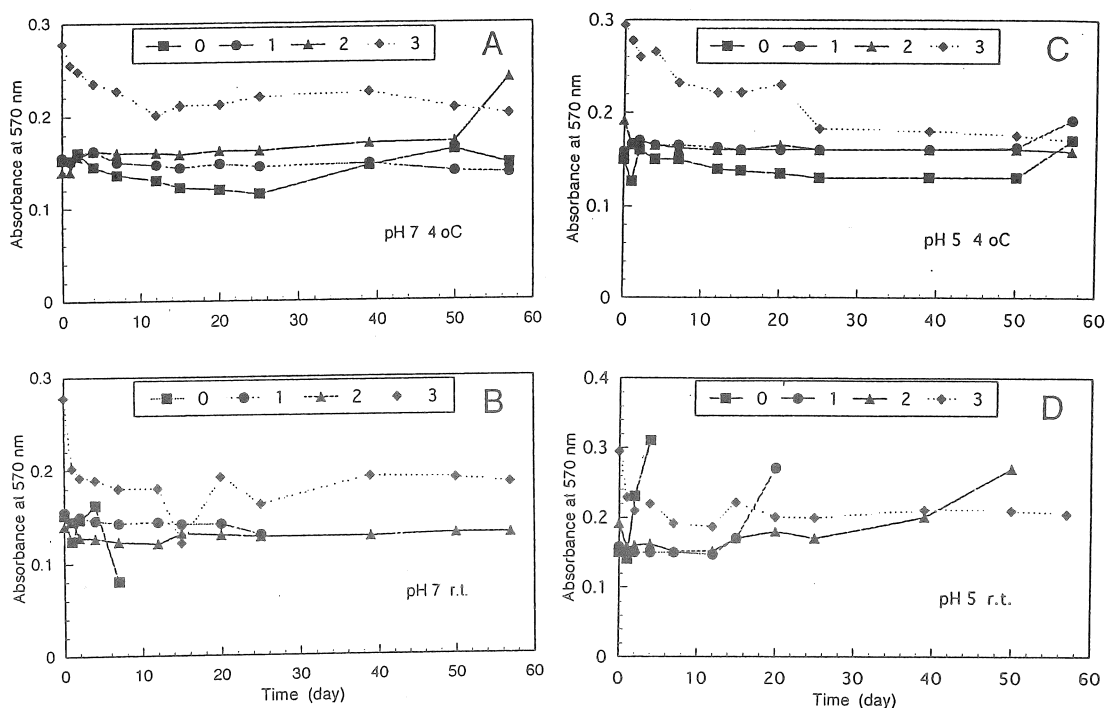


Figure 4. The effects of the storage conditions on the chromophore of the purified hR. The purified hR was incubated in 0.5 % sucrose monolaurate, 1 M (●), 2 M (▲) or 3 M (◆) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. pH was adjusted at 7 or 5. Absorbance at 570 nm was plotted against the incubation time.

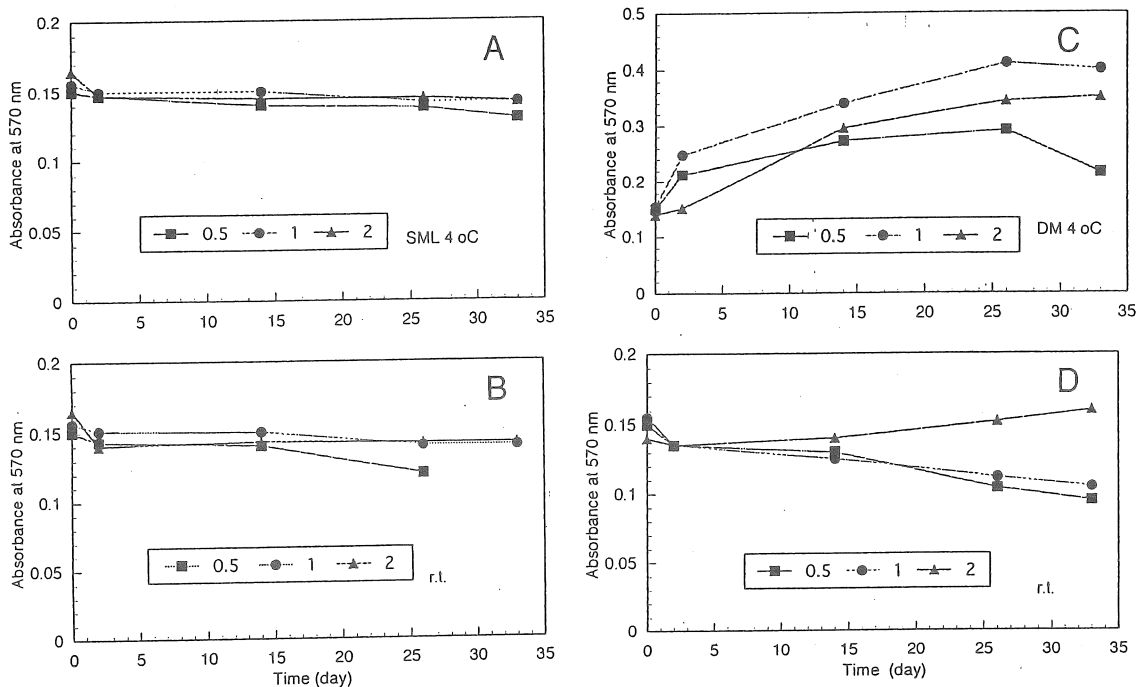


Figure 5. The effects of the storage conditions on the chromophore of the purified hR. The purified hR was incubated in 0.5 M (■), 1 M (●) or 2 M (▲) Na-phosphate (pH 5.3). Sucrose monolaurate or dodecyl maltoside was added to solubilize hR. Absorbance at 570 nm was plotted against the incubation time.

3.2 アーキロドプシンの細胞膜中での自己集合

高度好塩菌のレチナルタンパク質のうち、細胞膜中で2次元結晶となるのはbRだけである。我々が西オーストラリアの塩地で採取した好塩菌から見出したアーキロドプシン(aR)はbRと60%相同なアミノ酸配列で(5)、また、バクテリオルベリンを1分子結合している(6)。aRは*Halorubrum* sp. aus-1株から赤紫膜として調製できる。今回、菌体の凍結割断レプリカの電子顕微鏡写真を観察したところ、細胞膜には規則正しく粒子が配列した領域があり、また、それは細胞膜の50%をも占めることが分かった。図6には断面E face(細胞膜のouter leaflet)とP face(細胞膜のinner leaflet)の拡大写真を示した。これは、従来から知られている*Halobacterium salinarum*の紫膜パッチに相当するものと思われる。従って、aR分子も細胞膜で自己集合し2次元結晶を形成できることが分かり、現在、赤紫膜の電子顕微鏡観察、及び、3次元結晶化を試みている。

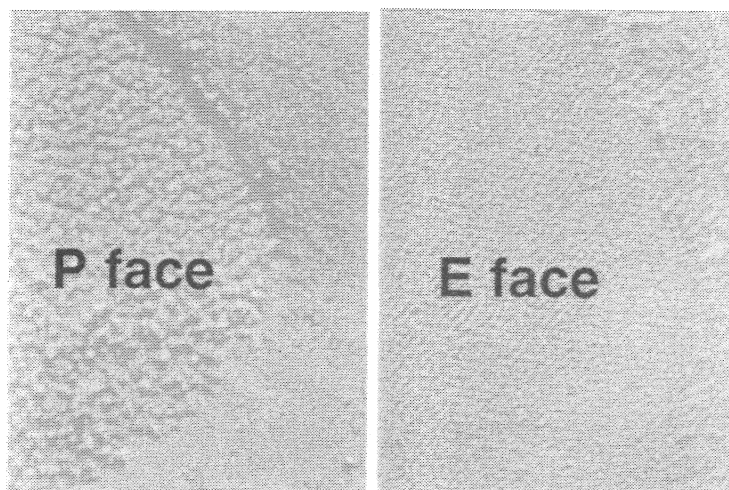


Figure 6. Electron micrograph of a freeze-fractured cell from *Halorubrum* sp. aus-1.

3.3 レチナルタンパク質の分裂酵母での発現

hR は低塩濃度でも瞬時に変性することはなかったので、好塩菌の膜タンパク質の構造形成 (*in vivo* 及び *in vitro* フォールディング) に高塩環境が必要であるかどうかを異種細胞での発現系を使って調べた。我々は以前、レチナルタンパク質遺伝子を大腸菌で発現させても膜に組み込まれないことを示した (2)。そこで、今回、分裂酵母の発現ベクター (チアミンで制御できる *nmt1* プロモーターの下流) に *aop* と *hop* 遺伝子を組み込んだ。アーキオプシンとハロオプシンともに酵母の膜に挿入され、レチナルを添加して培養すると紫色の酵母となった。従って、hR の *in vivo* フォールディングは高塩濃度を必要とせず、むしろ、発現させる宿主細胞の膜への組み込み装置に依存するようである。発現場所は間接蛍光抗体法で細胞内膜系であることが分かった (図 7)。また、green fluorescent protein (gfp) を分裂酵母で発現させると細胞質に一様に分布するのに対し、アーキオプシンとハロオプシンを *gfp* との融合タンパク質として発現させるといずれも核膜 (ER 膜) や液胞膜に局在することが分かった (図 8)。この結果は間接蛍光抗体法の結果を支持した。

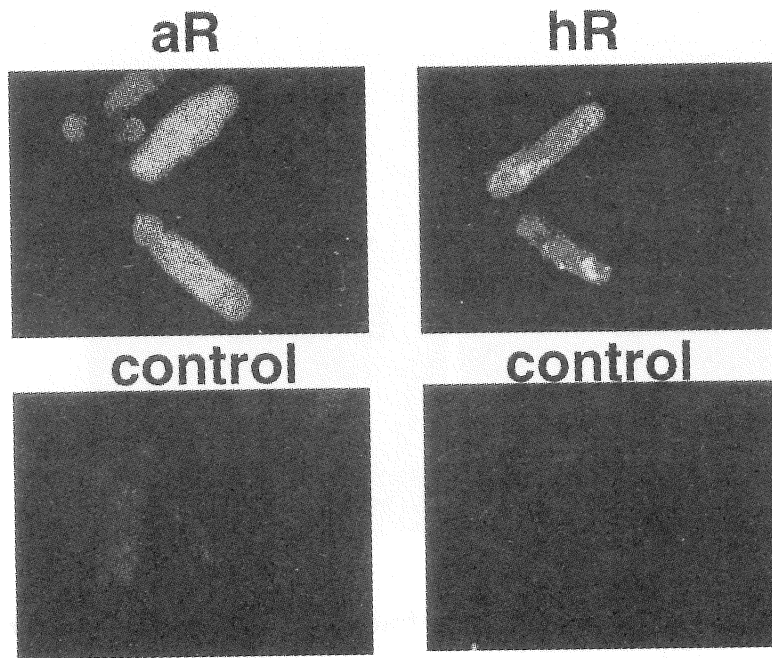


Figure 7. Confocal fluorescent micrograph of *Schizosaccharomyces pombe* expressing aR (left) and hR (right). *S. pombe* cells were fixed and incubated with *anti-aR* or *anti-hR* antibody. Expression was detected by FITC-labeled anti-rabbit Ig-G.

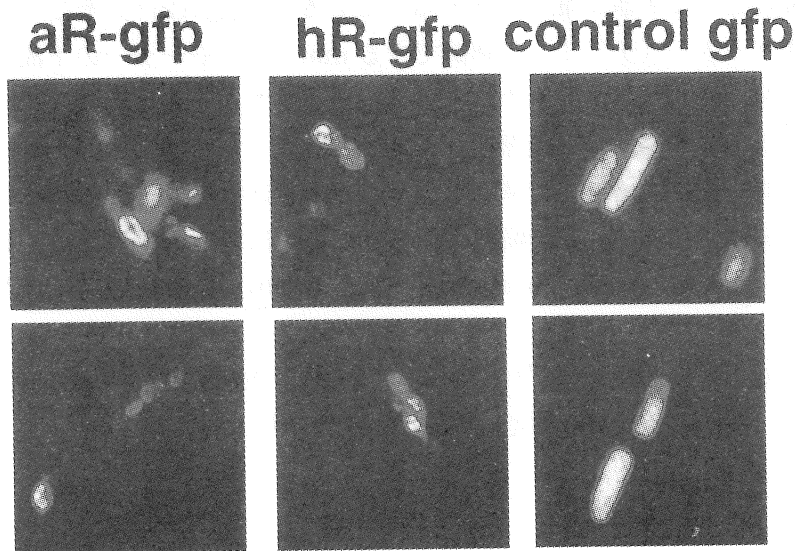


Figure 8. Fluorescent micrograph of *Schizosaccharomyces pombe* expressing aR-gfp, hR-gfp and gfp (control).

4. 考察と今後の課題

高度好塩菌のリンゴ酸脱水素酵素とフェレドキシンは3次元立体構造が解明され、その結果、酵素表面全体に酸性アミノ酸を分布させること、及び、酸性アミノ酸に富む余分な領域を表面の一部につけ加えることが好塩性獲得の手段となっていると示唆されている(1, 7)。一方、好塩菌の膜タンパク質で立体構造の知られているのはバクテリオロドプシン (bR; 光駆動プロトンポンプ) だけである。今回、我々は、アーキロドプシン (aR; 光駆動プロトンポンプ) も細胞膜で2次元結晶構造をとることを見出し、現在その立体構造の解明に向けて、赤紫膜のクライオ電子顕微鏡観察、及び、X線結晶解析のための結晶化を始めている。bRとaRはあらゆる塩濃度で安定である。一方、ハロロドプシン (hR; 光駆動塩素イオンポンプ) は膜中で2次元結晶をつくらず、熱安定性が低いこと、及び、単離すると低塩環境で等温変性することを明らかにしてきた。しかしながら、いずれのレチナルタンパク質でも脂質2重層から露出した表面ループ領域にある酸性アミノ酸の分布には大きな違いは見られなかった。また、分子動力学によってhRの立体構造を予測してみても、bRとhRの構造には大きな相違は見い出されなかった。さらに、ハロオプシン遺伝子を分裂酵母で発現させたところ、7本の膜貫通ヘリックスは膜に適切に組み込まれてフォールディングし、レチナルを加えると紫色の酵母が培養できた。

これらの結果は好塩菌の膜タンパク質(レチナルタンパク質)の構造形成には高塩濃度は必須でないことを示している。また、水溶性タンパク質で示されたタンパク質の塩安定性と酸性アミノ酸の分布の相関(1, 7)は少なくともレチナルタンパク質ではあまり顕著でないので、好塩菌の膜タンパク質の構造を安定化する別の機構を見出す必要があると思われる。そのためには、今後、aRとhRの構造解析に加え、他の様々なレチナルタンパク質、及び、高度好塩菌の外膜糖タンパク質、呼吸鎖タンパク質、物質輸送タンパク質等の構造安定性と構造解析を進め、1) 好塩菌の膜タンパク質に本当に好塩性があるのか?、2) 膜タンパク質は一般に塩環境の影響を受けにくいのか?といった問題に解答を与える必要がある。

5. 文献

- (1) Dym, O., Maverech, M. and Sussman, J.L. (1995) *Science* 267, 1344-1346.
- (2) Sugiyama, Y. and Mukohata, Y. (1994) *J. Biochem.* 115, 1021-1026.
- (3) Kimura, Y., Vassilyev, D.G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsushima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, T. and Fujiyoshi, Y. (1998) *Nature* 389, 206-211.

- (4) Schertler, G.F.X., Bartunik, H.D., Michel, H. and Oesterhelt, D. (1993) *J. Biol. Chem.* 234, 156-164.
- (5) Sugiyama, Y., Maeda, M., Futai, M. and Mukohata, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 20859-20862.
- (6) Lukashev, E.P., Govindjee, R., Kono, M., Ebrey, T.G., Sugiyama, Y. and Mukohata, Y. (1994) *Photochem. Photobiol.* 60, 69-75.
- (7) Frolov, F., Harel, M., Sussman, J.L., Mevarech, M. and Shoham, M. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 452-458.

謝辞： *Halorubrum* sp. aus-1 株の電子顕微鏡写真の撮影に対し山形大学医学部解剖学教室の外崎昭教授と鷲岳宏助手に感謝いたします。

Comparative study on the halophilism of the soluble and membrane proteins in Halobacteria.

Yasuo Sugiyama and Kunio Ihara

Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University

Summary

An extremely halophilic archaeobacteria not only tolerate but require NaCl concentrations above 10 to 15 % for survival. In order to adapt to the hypersaline environment, living organisms should acquire mechanisms to prevent the breakdown of the membrane system due to the osmotic pressure. There are two different modes of adaptation. One is the accumulation of organic neutral solutes concomitant with extrusion of the inorganic ions. The other one is the accumulation of inorganic ions to balance the extracellular high salt concentration. The extremely halophilic archaeobacteria acquired the latter mechanisms. Therefore, all the cellular components have to be adapted to function at the extremely high salt concentrations. In fact halophilic malate dehydrogenase (hMDH) requires high salt concentrations (1 to 4 M) both for the stability and the activity. Comparison of the 3D structures of hMDH and ferredoxin and their nonhalophilic cognates revealed structural features for adaptation to high salt concentrations (halophilic substitution and halophilic addition).

In contrast, little is known about the halophilism of the membrane systems in the extremely halophilic archaeobacteria. In this study we compared the structures of retinal proteins. Bacteriorhodopsin and archaerhodopsin form the 2D crystals in the membrane and are stable at both low and high salt concentrations. On the other hand halorhodopsin does not form the 2D crystals in the membrane and is not stable at low salt concentrations. However, there are no remarkable differences in the distribution of the charged acidic residues (numbers and positions) at the surface loops regions among these retinal proteins. Furthermore, when the haloopsin (*hop*) gene was expressed in *Schizosaccharomyces pombe*, the seven transmembrane α -helices were properly folded in the organelle membranes. *S. pombe* harboring the *hop* gene colored purple when growing in the presence of retinal.

The present results indicated that the high salt concentration was not required for the *in vivo* folding of the integrated membrane proteins. Since there is little correlation between the salt stability and the distribution of acidic amino acids in retinal proteins, it is necessary to study the effects of salt on the stability of another types of membrane proteins.