

光照射－固体 NMR を用いた高度好塩菌代謝成分の分析

川村 出

横浜国立大学大学院工学研究院

概要 高度好塩菌は至適増殖 NaCl 濃度が 2.5 M 以上であり、そのほとんどが古細菌に分類され、極限環境に生息する興味深い生物である。その中でも高度好塩菌は β カロチンやリコピンなどの色素やレチナールが結合した光受容タンパク質を持ち、光を利用したイオン輸送、代謝反応および光刺激を感知して光環境に対応する性質は興味深い。また、通常の生物は生息できないが、高度好塩菌は海水の塩濃度の約 10 倍の環境で生命活動を行っており、細胞外の高い Na^+ イオン濃度に対して、細胞内に高濃度の K^+ イオンを蓄えているために浸透圧が保たれることが理由として上げられる。特長的なことは細胞内の K^+ イオン濃度は 5 M にも達し、これは菌体の乾燥重量の約 40%にあたり、細胞内に極めて大量に K^+ イオンを溜め込んでいる。本研究では以上の点に着目し、固体 NMR 法を駆使して高度好塩菌の性質を明らかにすることが目的である。

^{13}C 標識レチナールを含むバクテリオロドプシンを高度好塩菌 *H. salinarum* から精製し、*In-situ* 光照射－固体 NMR を用いて暗と明それぞれの条件で ^{13}C NMR スペクトルを観測した。バクテリオロドプシンは暗順応状態では 13-*cis*、15-*syn* 型と all-*trans* 型のレチナールが 1 : 1 の割合で存在する。実際に測定してみたところ、暗条件での NMR スペクトルでは 13-*cis* 型と all-*trans* 型の信号が同時に観測された。これに 520 nm の光を照射すると 13-*cis* 型の信号が減少し、All-*trans* 型の信号強度が増加した。これは NMR 測定中に All-*trans* 型レチナールのみが存在する明順応状態の観測に成功したことを示している。この結果によって、NMR 測定中にバクテリオロドプシンを光活性化させることができた成果によって、高度好塩菌の代謝成分の変化を追跡することができることが可能となった。

つづいて高度好塩菌の細胞内 K^+ イオンを直接 NMR 観測した。主に 3.6 ppm に信号が観測され、またその信号の右側にわずかにシオルダーピークが観測され、シフト試薬を加えた試料ではメインの信号はシフトしなかったため、ほとんどは細胞内の信号であると示唆されるが、シフト試薬の濃度を変化させるなど条件を変えて測定する必要がある。現時点ではこれらの結果から高度好塩菌の細胞内の K^+ イオンの環境は大きな分布は無いと考えている。

1. 研究目的

高度好塩菌は至適増殖塩 (NaCl) 濃度が 2.5 M 以上であり、そのほとんどが古細菌に分類され、極限環境に生息する興味深い生物である。これまでに高度好塩菌については様々な研究がなされている^{[1]-[5]}。その中でも高度好塩菌は β カロチン、バクテリオルベリンやリコピンなどの色素やレチナールが結合した光受容タンパク質を持ち、光を利用したイオン輸送、代謝反応および光刺激を感知して光環境に対応する性質は興味深い。また、通常の生物は生息できないが、高度好塩菌は海水の塩濃度の約 10

倍の環境で生命活動を行っており、細胞外の高い Na^+ イオン濃度に対して、細胞内に高濃度の K^+ イオンを蓄えているために浸透圧が保たれることが理由として上げられる。細胞内になぜ高い濃度の K^+ を蓄積しているのか、そのメカニズムについてははっきりとはわかっていないが、特長的なことは細胞内の K^+ イオン濃度は 5 M にも達し、これは菌体の乾燥重量の約 40%にあたり、細胞内に極めて大量に K^+ イオンを溜め込んでいる。また、NaCl の結晶に高度好塩菌をトラップさせ、室温暗所で長期保存後も培地中で高度好塩菌の増殖が起きるなど、生命進化の観点か

らもこのような特徴も興味深い。

本研究では以上の点に着目し、次のことを明らかにすることを目的とした。

(1)我々が開発した *In-situ* 光照射－固体 NMR 測定システムを用いて暗明条件下で高度好塩菌代謝成分の分析を行い、高度好塩菌の光を利用した反応を理解する。

(2)多核 NMR を利用して高度好塩菌の細胞内の反応を理解する。特に高度好塩菌の細胞内の K^+ イオンを ^{39}K NMR によって直接観測し、高濃度の K^+ イオン蓄積メカニズムを調べる。

2. 研究方法

2.1 高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の培養とバクテリオロドプシンの調製

高度好塩菌 *H. salinarum* S-9 株を高い NaCl 濃度の培地で pH 7.4、37°C、110 rpm、光照射条件で 1 週間ほど培養し、集菌した。特に LED 光照射ユニットを導入した振盪培養機 (TAITEC BR-43FL) によって光条件で培養することで高度好塩菌の細胞膜中にバクテリオロドプシンを大量発現させた (Fig. 1)。遠心分離機によって培養液から菌体を集菌し、培地と同じ濃度の NaCl を含むバッファーで洗浄した。この好塩菌試料を固体 NMR の試料管にそのまま封入し、 ^{13}C 、 ^{23}Na 、 ^{31}P 、 ^{39}K NMR 測定に用いた (試料 1)。また、NMR 信号のシフト試薬として細胞膜不透過性であるジスプロシウム(III)アセチルアセトネートを用いて、細胞内外のピークを観測した (試料 2)。

光反応の有無を確認するために、バクテリオロドプシンのレチナール異性化をモニターすることにした。そのため

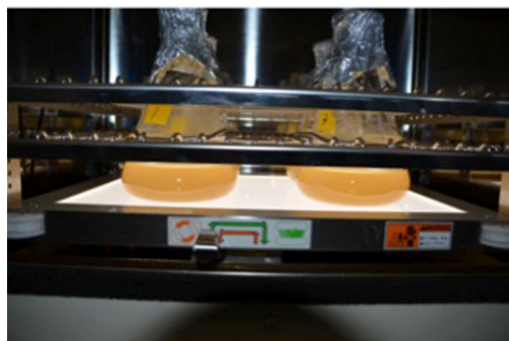
にレチナール欠損株 *H. salinarum* E1001 株の培養過程で $[20-^{13}C]$ レチナールを外因的に加えて、光照射下での培養により高度好塩菌に ^{13}C 標識レチナール－バクテリオロドプシンを大量発現させ、バクテリオロドプシンを含む紫膜を精製した (試料 3)。

2.2 *In-situ* 光照射－固体 NMR 測定

固体 NMR 法は粉末、ゲル、細胞膜に埋め込まれたタンパク質や難溶解性試料など試料状態に依存することなく、非侵襲的な測定が可能である。加えて、溶解した成分に関しても区別して測定することができる。固体 NMR 測定の分解能を上げるための標準的な手法としてマジック角回転 MAS (Magic Angle Spinning) 法があり、試料管を NMR の静磁場方向に対して 54.7° 傾けた軸の周りで高速回転させる手法である。我々はこの手法に光照射が可能なシステムを構築し、MAS 条件での光照射を達成した *In-situ* 光照射－固体 NMR システムを開発している (Fig. 2)^[6,7]。これを利用して、まずはバクテリオロドプシンの光反応を調べて、その後、高度好塩菌の細胞単位に適用する。NMR 装置は 400 MHz の固体 NMR 分光器 CMX-400 Infinity を用い、主な測定手法は MAS 条件下で交差分極 (Cross Polarization) を用いる CP-MAS 法である。MAS 回転数は 4 kHz。光源は出力 50 mW、波長 520 nm の LED 光源を用いた。

2.3 ^{23}Na 、 ^{31}P 、および ^{39}K の NMR 測定

好塩菌内の代謝成分を分析するために、600 MHz の固体 NMR 分光器 Bruker Avance III 600 を用いて ^{13}C 、 ^{23}Na 、 ^{31}P 、 ^{39}K NMR の測定を実施した。MAS 回転数は 6 kHz、測定温度は 25°C で設定した。それぞれ共鳴周波数



1日目



1週間後

Fig. 1. 高度好塩菌の培養(左: 1 日目、右: 1 週間後) 光環境での培養でバクテリオロドプシンが大量発現)

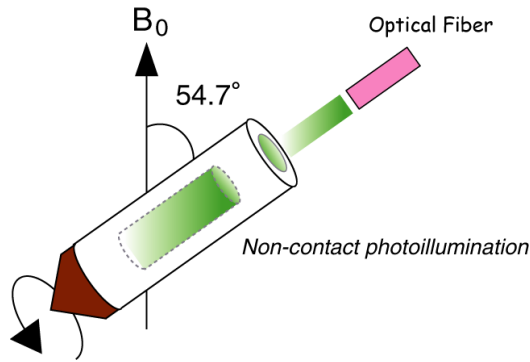


Fig. 2. *In-situ* 光照射一固体 NMR 測定システム

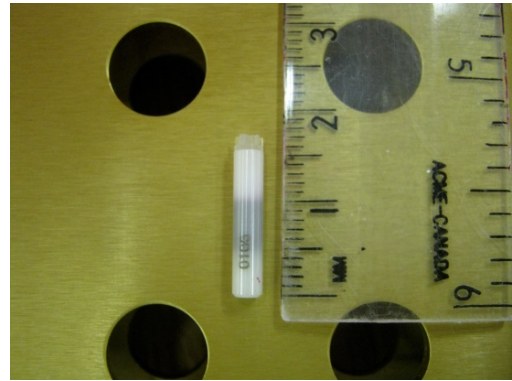


Fig. 3. 固体 NMR 試料管(内径 3 mm)

が異なるが、特に ^{39}K 核は 28.0 MHz (600 MHz 装置において) の共鳴周波数とかなり低いが、天然存在比は 93.1% と高く、 K^+ イオン濃度が高ければ観測可能である。 ^{39}K については低共鳴周波数用の NMR プロブを用いた。ただし、 ^{39}K はスピン量子数が 3/2 の四極子核に分類されるため、運動性が遅い場合は核四極子相互作用が生まれ、信号の線幅の増大につながるため注意が必要であった。試料 1 は高度好塩菌そのものを試料管に入れているため、非常に高塩濃度の試料である。このため、誘電損失の影響を考慮して、径の小さい試料管を使用した (Fig. 3)。

3. 研究結果・考察

3. 1 *In-situ* 光照射一固体 NMR によるバクテリオロドプシンのレチナール光異性化反応の観測

バクテリオロドプシンは光駆動型プロトンポンプ機能を持った膜タンパク質であり、レチナールの光異性化反応をトリガーにして細胞外へプロトンを送り、ATP 合成酵素を駆動させるための電位勾配を形成する。つまり、NMR 測定中にこのタンパク質のレチナール光異性化反応を観測することができれば、高度好塩菌細胞レベルで同様の光照射 NMR 測定を適用し、光を利用した細胞内の反応についてその場観測できると考えた。

試料は 2. 1 に示した試料 3 を用い、*In-situ* 光照射一固体 NMR を用いた暗と明それぞれの条件で ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルを観測した。バクテリオロドプシンは暗順応状態では 13-*cis*、15-*syn* 型と all-*trans* 型のレチナールが 1 : 1 の割合で存在する^[8]。実際に測定してみたところ、暗条件での NMR スペクトルでは細胞膜の信号とともに 13-*cis* 型と all-*trans* 型の信号が 22.2 ppm と 13.1 ppm の化

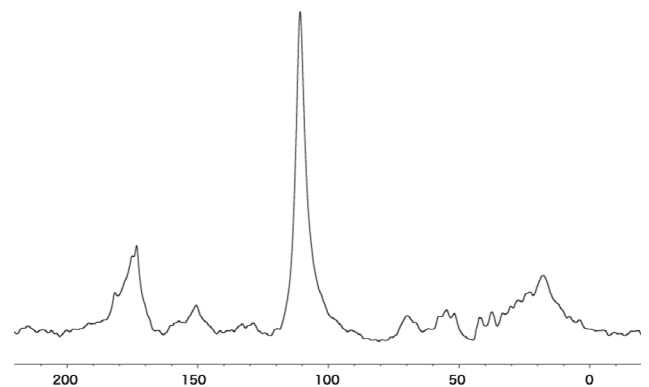


Fig. 4. 高度好塩菌 *H. salinarum* の ^{13}C CP-MAS NMR スペクトル。100 ppm 付近の信号はグリカン構造に由来する。

学シフト値の位置に同時に観測された。これに 520 nm の光を照射し、NMR 信号の変化を観測した。そうしたところ、13-*cis* 型の信号が減少し、All-*trans* 型の信号強度が増加した。これは NMR 測定中に All-*trans* 型レチナールのみが存在する明順応状態の観測に成功したことを示している。この結果によって、NMR 測定中にバクテリオロドプシンを光活性化することが可能となったため、それに伴う高度好塩菌の代謝成分の変化を追跡することができる。

Fig. 4 に高度好塩菌 *H. salinarum* (試料 1) の ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルを示す。脂肪酸鎖の 30 ppm の信号が小さく、グリカン構造由来の 100 ppm の信号が強い。この信号強度比は大腸菌のそれとは信号強度の関係が逆であるため、高度好塩菌の細胞壁やイソプレノイド骨格である細胞膜の特長が現れていると考えている^[1, 9]。現在、代謝成分に由来する特徴的な NMR 信号の帰属や光照射による変化を追跡中である。

3. 2 多核 NMR を用いた高度好塩菌内の代謝成分の直接観測

NMR は観測する核種によって共鳴周波数が異なることから、測定する核の選択性は非常に高く、今回使用した¹³C、²³Na、³¹P、³⁹K はそれぞれ共鳴周波数が異なるので、区別して観測することができる。これらの観測核種を利用して高度好塩菌内を評価した。2. 1に示した試料 **1** を用いた。

Na⁺ は高度好塩菌の細胞外に存在しているため、²³Na NMR 測定 (156.8 MHz) は主に細胞外の信号と考えられる。Fig. 5 に高度好塩菌の ²³Na NMR の信号を示した。1.70 ppm に信号が観測された。これに2. 1で示したシフト試薬であるジスプロシウムを加えると(試料 **2**)、信号がやや高磁場側にシフトした。つまり、このピークは細胞外側の Na⁺ の信号と考えられる。

同様の実験を ³⁹K NMR の信号でも行った。高度好塩菌(試料 **1**)の ³⁹K NMR スペクトルを Fig. 6 (a)に示す。主に 3.6 ppm に信号が観測され、またその信号の右側にわずかにショルダーピークが観測された。信号には核四極子相互作用の影響を考慮する必要があるが、このスペクトルから細胞内カリウムイオンの分布を示しているかもしれない。一方でジスプロシウムを加えた試料ではメインの信号はシフトしなかったが、ショルダーピークが消失した(Fig. 6 (b))。ほとんどは細胞内の信号であると示唆されるが、ジスプロシウムの濃度を変化させるなど条件を変えて測定する必要がある。現時点ではこれらの結果から高度好塩菌の細胞内の K⁺ イオンの環境は大きな分布は無いと考えている。これは Lanyi らのイオン選択性電極などによって得られた考察^[10]と一致するが、Shporer らが ³⁹K NMR の緩和時間を解析した結果では高度好塩菌内に異なる環境にある K⁺ イオンの存在を示唆していること^[11]から、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

³¹P NMR スペクトル(Fig. 7)においては細胞膜や核酸などの信号が混みあって現れているので、区別して観測することができなかつた。³¹P で最も重要な点はバクテリオロドプシンを光活性化させることで ATP の合成をモニターすることができるので、この信号の帰属を行い、反応速度のリアルタイム解析^[12]につなげたい。

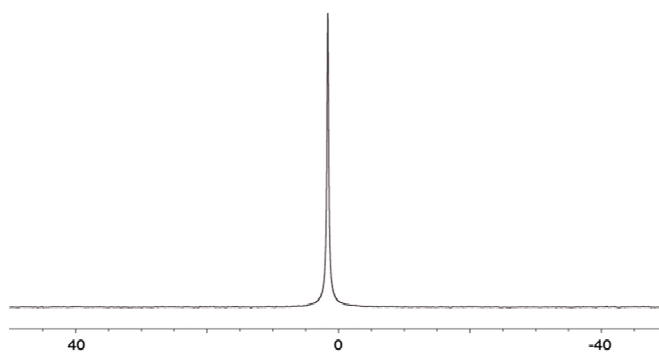


Fig. 5. 高度好塩菌 *H. salinarum* の ²³Na 固体 NMR スペクトル(スペクトル範囲 50 ppm~-50 ppm)

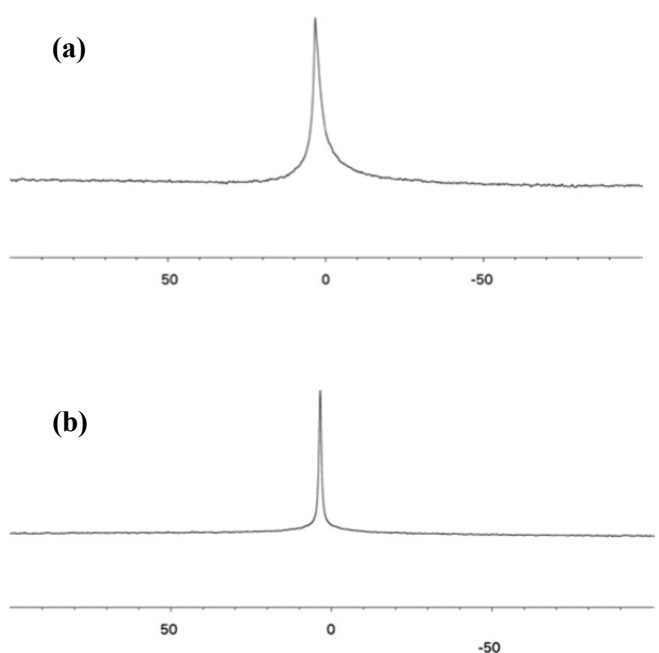


Fig. 6. (a) 高度好塩菌 *H. salinarum* の ³⁹K NMR スペクトル(試料 **1**) 中央の信号の化学シフト値 3.6 ppm。 (b) ジスプロシウム含有高度好塩菌 *H. salinarum* の ³⁹K NMR スペクトル(試料 **2**) 信号の化学シフト値 3.5 ppm。

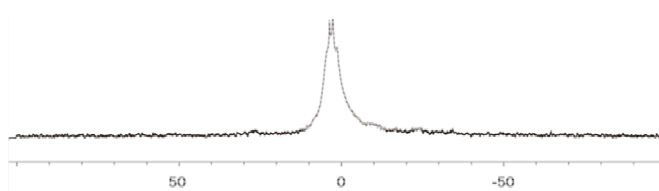


Fig. 7. 高度好塩菌 *H. salinarum* の ³¹P NMR スペクトル

4. 今後の課題

・ 3. 1の結果から、*In-situ* 光照射によって NMR 測定中にバクテリオロドプシンの光活性化を観測することができた。今後は本研究課題の大きな目標である高度好塩菌の信号を ^{13}C 、 ^{31}P NMR などを駆使して観測し、光を利用した代謝活動を明確にしたい。そのためには信号の帰属、分解能を高める工夫が必要である。

・ ^{39}K NMR によって高度好塩菌内のカリウムイオンの信号を観測することができたが、より詳細に細胞内のカリウムイオンの環境を調べるために、核四極子相互作用を消去する MQ-MAS 法の適用を試みて、分解能を上げて測定する。

参考文献

[1] 古賀洋介、亀倉正博 編 “古細菌の生物学” 東京大学出版 (1988)
[2] 亀倉正博 “塩と好塩菌” *J. Jap. Soc. Extremophiles* (2008)

[3] 大島泰郎 “極限環境の生き物たち” 技術評論社 (2012)
[4] 仲山英樹 “好塩菌の塩ストレス適応機構とその応用” *生物工学会誌* 90, 696-700 (2012)
[5] 仲山英樹 “好塩性細菌のゲノム情報からメタルバイオ技術への展開” 極限環境生物の産業展開 (シーエムシー出版) pp. 97-106 (2012)
[6] I. Kawamura *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 129 1016-1017 (2007)
[7] Y. Tomonaga *et al.* *Biophys. J.* 101 L50-L52 (2011)
[8] A. Maeda *et al.* *J. Biochem.* 82 1599-1604 (1977)
[9] M. Renault *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 2998 (2012)
[10] J.K. Lanyi *et al.* *Can. J. Microbiol.* 18 993-995 (1972)
[11] M. Shporer *et al.* *J. Membrane Biol.* 33 385-400 (1977)
[12] S.J. Ullrich *et al.* *Nat. Chem. Biol.* 7 263-270 (2011)

Metabolic Regulation in Halobacteria Analyzed by Photo-Irradiated Solid-State NMR

Izuru Kawamura

Graduate School of Engineering, Yokohama National University

Summary

Halobacteria is one of microorganisms of the Archaea domain that require high salt concentration at least 2.5 M for growth. The bacteria have retinal-binding proteins and pigments, such as lycopene and β -carotene, to pump ions and sense light environment by light absorption. Further, halobacteria was well adapted to hypersaline environments because it stored high concentration of K^+ ions in cell. We have applied solid-state NMR methods to investigate the metabolic reaction of halobacteria relevant to light and high salt concentrations. Using by in-situ photo-irradiated solid-state NMR apparatus, we have successfully detected the photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin, which is a light-driven proton pump in purple membrane of halobacteria, during ^{13}C NMR measurements. Therefore, we might be able to control the photo reaction for growth in halobacteria during NMR measurements. And, in order to examine the distribution of potassium ions in the halobacterial cells, we performed the ^{39}K and ^{23}Na NMR experiments. Major ^{39}K NMR signal of halobacteria was not shifted by addition of shift reagent of Dysprosium (III) acetyl acetonate. This experiment suggests that K^+ ions in the cells are mainly free.