

古細菌の光センサー蛋白質 Sensory rhodopsin II の分子内イベントの解析

生命融合科学コース・生物情報解析科学研究室

田母神淳(博士後期課程3年)、菊川峰志(助教)、出村誠(教授)

Tamogami, J., Kikukawa, T., Ikeda, Y., Takemura, A., Demura, M. and Kamo, N.,
The Photochemical Reaction Cycle and Photoinduced Proton Transfer of Sensory Rhodopsin II
(Phoborhodopsin) from *Halobacterium salinarum*, *Biophys. J.*, 98, 1353-1363 (2010)

高等動物の網膜には、光センサーとして機能する膜蛋白質ロドプシンが存在している。このロドプシンと同様に、レチナールを発色団として内包する蛋白質が、微生物界にも広く存在することが、近年、明らかとなってきた。興味深いことに、これら全ての微生物型ロドプシンは、互いに類似した構造をとるにも拘らず、その機能は、光センサー、光駆動型イオンポンプ、光ゲートイオンチャネルなど多岐に渡っている。光駆動型 H⁺ポンプである bacteriorhodopsin (BR)を産生することで有名な古細菌 *Halobacterium salinarum* には、さらに、光駆動型 Cl⁻ポンプである halorhodopsin (HR)と、光センサーとして機能する sensory rhodopsin I (SRI)、sensory rhodopsin II (SRII)という4種類の微生物型ロドプシンが存在している(図1)。これらは光を吸収すると、複数の構造の異なる中間体を経由して、また元に戻る光化学反応サイクル(フォトサイクル)を示し、この間にそれぞれの機能を発現する。BRとHRは、それぞれ単独で機能するが、SRI、SRIIは、共役するトランスデューサを介して、光信号を細胞質側へ伝達し、最終的に、鞭毛の回転方向を制御する。その結果、*H.salinarum* は、BRやHRによってATPを産生できるオレンジ色の光には集まり、有害な紫外線を含む青緑色の光からは逃げる“正”と“負”の走光性を示す。SRIは、正と負の両方の光レセプターとして機能し、一方、SRIIは負の走光性を専門とする光レセプターとして機能する。

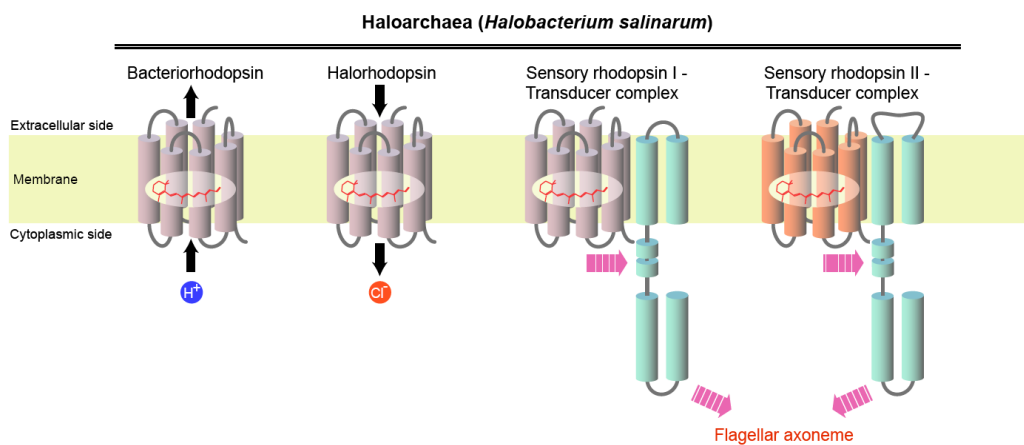


図1. *Halobacterium salinarum* の細胞膜に存在する4種類の微生物型ロドプシン

H.salinarum の持つ微生物型ロドプシンの中で、SRII (HsSRII) は最も発現量が少なく、かつ、界面活性剤への安定性が低い。過去に、HsSRII を含む細胞膜片を用いたフォトサイクルの部分的な解析や、このフォトサイクルが HsSRII からの H⁺ の放出と取込みを伴うことなどが報告された。これらは、光励起に伴う蛋白質の構造変化、したがって、光シグナル伝達機構と密接に係わると考えられるが、詳細な研究は行われていない。我々は、大腸菌発現系によって得た HsSRII をリン脂質膜に再構成することで、高い安定性を維持できることを見出した。本研究では、HsSRII のフォトサイクルと、それに伴う光誘起 H⁺ 移動反応を、過渡吸収分光法 (flash photolysis) と ITO 電極を用いた電気化学的測定法によって、詳細に検討した。

光反応中間体 Y の発見

図 2 (A) は、pH 5 において測定した HsSRII の時間依存的な光誘起吸光度変化である。パルス光照射後 10 msec において、基底状態の光励起に伴う 490 nm 付近の負の吸光度変化と、M 中間体の生成に伴う 350 nm 付近の正の吸光度変化が見られる。その後、M 中間体の崩壊に伴い、540 nm 付近に O 中間体が生成し、その崩壊とほぼ同期して、基底状態が回復する。M と O 中間体の存在は、過去にも報告されていたが、我々は、O 中間体の崩壊後に、もう一つの間mediateが存在することを見出し、これを Y 中間体と名付けた。図 2 (B) には、解析によって推定した 3 つの間mediateの吸収スペクトルを示した。吸収スペクトルの類似性から、Y 中間体の発色団近傍の構造は、基底状態に近いと予想されるが、その崩壊は、約 10 秒と非常に遅く、フォトサイクルの律速過程となっている。光シグナル伝達における Y 中間体の役割の解明は、今後の研究課題である。

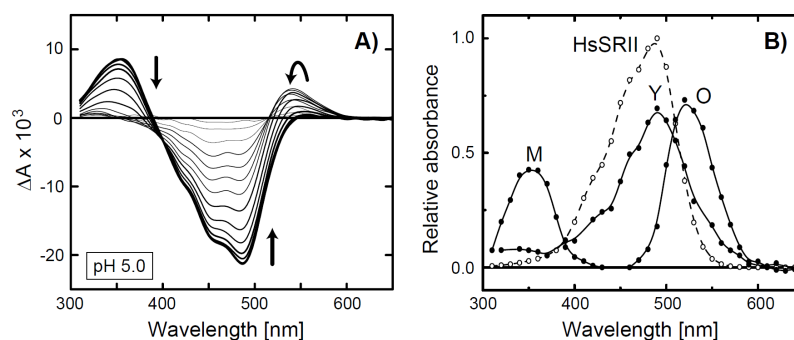


図 2. (A) pH 5 における HsSRII の光誘起吸収スペクトル変化 (10 msec~45 sec)
(B) 基底状態 (HsSRII)、及び、光反応中間体の吸収スペクトル

残基 X-H を介した H⁺ 移動と pH 依存的なフォトサイクルの変化

発色団レチナールは、膜貫通部位に位置する特定の Lys 残基にプロトン化シッフ塩基を介して結合しており、この正電荷は、近傍に位置する脱プロトン化した Asp73 の負電荷によ

って安定化されている。研究が先行している BR との analogy から、M 中間体の生成は、シッフ塩基から Asp73 への H⁺移動を、また、O 中間体の生成は、脱プロトン化したシッフ塩基の再プロトン化を伴うと考えられる。我々は、フォトサイクルと光誘起 H⁺移動反応の詳細な解析から、シッフ塩基の再プロトン化過程には、(1)残基 X-H を介する経路と、(2)蛋白質外液から、直接、プロトンを取り込む経路、の二つが存在し、外液の pH に応じて、使用される経路が変化することを見出した。図 3 は、我々が提案した pH 依存的なフォトサイクルの変化を表している。基底状態における Asp73 と残基 X-H のプロトン化状態に応じて、3 種類のフォトサイクルが存在する。それぞれのフォトサイクルごとに、基底状態 (HsSRII) と登場する中間体の細部の状態が異なることを、ここでは、添え字 a,b,c によって表している。中央のサイクルは、pH 3~7.5 において観測されるフォトサイクルである。この pH 領域で脱プロトン化したシッフ塩基は、上述した二つの経路の両方から H⁺を受け取ることが出来る。残基 X-H の基底状態における pKa は約 7.5 である。これよりアルカリ側では、X-H が脱プロトン化してしまうため、この残基を介した H⁺移動は起こらなくなり、H⁺は、直接、外液から取り込まれるようになる (右端のサイクル)。一方、酸性領域では、Asp73 が基底状態においてプロトン化してしまうため (pKa=3.0)、シッフ塩基の脱プロトン化自体が起こらず、M 中間体も生成しない (左端のサイクル)。しかし、基底状態と良く似た吸収をもつ Z 中間体が生成し、この生成・崩壊は、蛋白質からの H⁺放出と取込みを伴う。生理的な環境では、中央と右端のフォトサイクルが混在すると考えられる。どちらのフォトサイクルがシグナルをトランスデューサに伝達するのか？また、残基 X-H の正体と、その生理的な役割は何か？これらは、今後の魅力的な研究課題である。

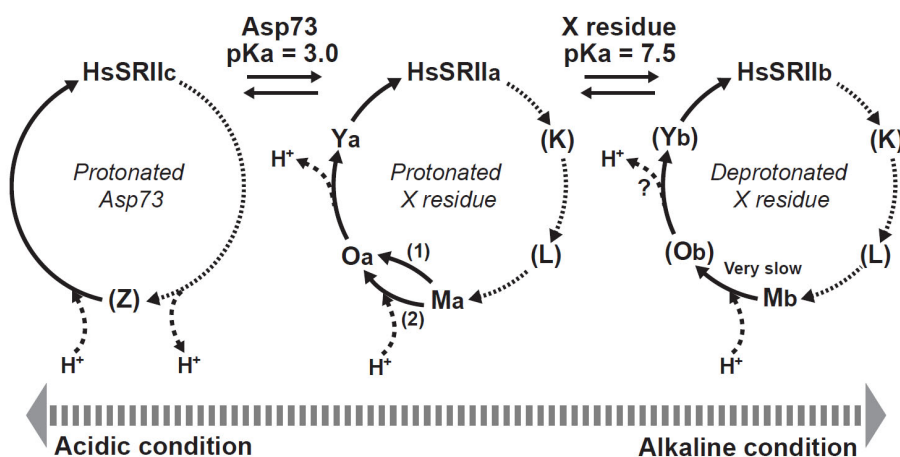


図 3. HsSRII の pH 依存的なフォトサイクルの変化