トピックス

好熱性細菌のレチナールタンパク質

塚本 卓¹, 須藤雄気^{1,2}

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(薬学系)

²JST CREST

1. はじめに: 微生物レチナールタンパク質研究の動向

光受容タンパク質のうち、レチナール (アルデヒド型ビタミンA) を発色団にもつものを総称してレチナールタンパク質と呼びます。レチナールタンパク質は、動物から微生物に至るまで多くの生物に備わっており、動物型は視覚や色覚を、微生物型はエネルギー産生や走光性の情報伝達を担っています¹⁾。動物型レチナールタンパク質の研究は1800年代後半から行われてきましたが、微生物型の研究が始まったのは1971年のことでした²⁾。それからおよそ40年後、新しいレチナールタンパク質が次々に発見され^{1), 3)}、加えて神経細胞の光操作技術 (光遺伝学) の登場によって、レチナールタンパク質がツール分子として利用できるようになったことで⁴⁾、微生物型レチナールタンパク質の研究は今、“熱い”時代を迎えています。

2. 好熱性細菌から発見されたレチナールタンパク質

2000年以降、次世代シーケンサーを利用した大規模なゲノム解析が行われ、地球上のさまざまな微生物がレチナールタンパク質をコードする遺伝子をもっていることがわかってきました。これら微生物のほとんどは、塩湖、淡水湖、海などの中低温環境に生息しています。その一方で、温泉のような高温環境にすむ微生物 (好熱菌) からは、レチナールタンパク質遺伝子は見つかっていませんでした。このことは、発色団であるレチナールが、高温条件 (50°C 程度) ですみやかに分解してしまうという性質から説明されてきました。すなわち、好熱菌にはレチナールタンパク質がないと考えられていました。

こうした背景のなか、2012年にMurugapiranらによって2種類の高度好熱菌のゲノムが解読され⁵⁾、レチナールタンパク質遺伝子が見つかりました。私たちはこのうち、およそ75°Cの温泉にすむ *Thermus thermophilus*

JL-18株由来のレチナールタンパク質に着目し、その物性研究を行うことにしました。興味深いことに、この株にはレチナール生成に関わるタンパク質群の遺伝子も備わっており、このレチナールタンパク質がきちんと生理的な役割をもって生体内に発現している可能性が考えられました。私たちは、この新しいレチナールタンパク質をサーモフィリックロドプシン (TR) と命名し、まずは基本的な機能の解析を行いました⁶⁾。

3. 分子機能

TRは、真正細菌型レチナールタンパク質ファミリーに属し、なかでも2005年に好塩性細菌から発見された光駆動プロトンポンプ・キサントロドプシン (XR)⁷⁾に類似しています (図1A)。そこで、私たちはTRを大腸菌に発現させ、イオン輸送活性を測定しました。その結果、TRは、XRを含む既知のプロトンポンプ型レチナールタンパク質と同様に、細胞外向きにプロトンを輸送することがわかりました (図1B)。

さらに、TRを界面活性剤存在下で精製し、可視吸収スペクトルを測定したところ、TRは530 nmの緑色光をもっともよく吸収することがわかりました

図 1
(A) 分子系統樹. (B) TR の光誘起プロトン輸送. (C) TR の可視吸収スペクトル.

Retinal Proteins in Thermophilic Bacteria

Takashi TSUKAMOTO¹ and Yuki SUDO^{1,2}

¹Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

²JST CREST

(図 1C). そのほか、プロトン輸送に重要な解離基 (His61, Asp95, Asp229, レチナールシッフ塩基) の pK_a , 明暗状態でのレチナール組成, 光反応カイネティクスの解析を行い, TR は総じて真正細菌のプロトンポンプ型レチナールタンパク質に共通の機能的特徴をもっていることがわかりました^{6), 8)}.

4. 熱に対する安定性

T. thermophilus JL-18 の生息温度は, およそ 75°C です. その環境下でレチナールを保持し, 生理的な役割をもつならば, TR は熱に対して安定でなければなりません. そこで, 精製した TR をもちいて熱安定性を調べました. 図 2A は, 75°C で経時的に測定した TR の可視吸収スペクトルです. 210 分加熱しても, およそ 80% が活性を保っています. 図 2B は, 75°C における熱変性の速度定数を比較したものです. 古細菌のプロトンポンプ (HwBR, AR3) および, 類縁の真正細菌のプロトンポンプ (GR) と比較して, TR は変性速度定数が小さく, 熱に対してきわめて安定であることがわかりました.

当初, 高い熱安定性の原因は, 変性の活性化エネルギー (E_a) が大きいことだろうと考えていました. しかし, アレニウスプロット (図 2C) から, 予想に反してどのタンパク質もほぼ同じ E_a であることがわかりました. また, TR はアレニウスプロットの y 切片, すなわちアレニウスの式における頻度因子 A が小さいことがわかりました. このパラメーターは, アイリ

図 2 (A) 75°C における可視吸収の時間減衰. (B) 75°C における変性速度定数の比較. (C) アレニウスプロット. 括弧内に変性の活性化エネルギー E_a (kcal/mol) を示した. (D) XR (PDB ID: 3DDL) の構造に, TR の疎水性残基クラスターをマップした.

ングの式からエントロピーの項と見なすことができます. このことから, TR の熱に対する構造安定化には, 疎水性相互作用に代表されるエントロピー的力が起因していると考えられました. 実際に, TR の推定細胞外側領域には疎水性アミノ酸が多く配置されています (図 2D). 私たちは現在, この疎水性クラスターが構造安定化に寄与しているのではないかと考え, TR の高い熱安定性を生むしくみの解明に向けて研究に取り組んでいます.

5. 多量体構造

一般に, タンパク質の多量体形成は構造安定化やアロステリック効果などの機能変調をもたらすことが知られています. 微生物型レチナールタンパク質も同様に多量体を形成しますが, このような作用の詳細に迫った例は少なく, 研究の途上にあります^{9), 10)}. そこで私たちは, TR をもちいて多量体形成による構造安定化効果と機能変調の解析を行いました⁸⁾.

図 3 は, 精製した TR の熱刺激による多量体構造転移についてまとめたものです. ゲルろ過クロマトグラフィーおよび可視円偏光二色性分光法による解析から, TR は低温領域 (25°C) で三量体を形成し, 高温領域では 68°C を境に単量体への構造転移が起こることがわかりました. このことから, 私たちは, 75°C の温泉にすむ好熱菌の生体内では, TR は単量体で存在していると考えています. 興味深いことに, 単量体へ転移すると, その後低温に戻したとしても三量体には戻らないこともわかりました. 熱刺激で単量体へ不可逆転移する性質を利用して, 三量体 TR と単量体 TR それぞれの熱安定性ならびに, 吸収波長や光反応などの光化学的性質を解析しました. その結果, これらの性質は多量体状態によらず, 単量体と三量体で大きな差異は認められないことがわかりました⁸⁾.

図 3 熱刺激による TR の多量体構造転移.

6. | おわりに: 今後の展開

私たちは、好熱菌のレチナールタンパク質に着目して、その物性を明らかにしました^{6), 8)}。現在では、*T. thermophilus* の他に、4 種類の好熱菌からレチナールタンパク質遺伝子が見つかっています。今後、私たちは、高強度レーザー分光など試料の安定性が求められる分析、膜タンパク質安定化法の開発、光遺伝学のためのツール分子や材料としての応用にむけて、基礎から応用まで“熱く”研究を展開していきたいと考えています。

本研究は、名古屋大学の谷ヶ崎仁博士、川瀬由紀江さん、名古屋工業大学の井上圭一助教、神取秀樹教授、北海道大学の出村誠教授、その他多くの共同研究者のご協力をいただき、成し遂げられました。この場を借りて御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ernst, O. P. *et al.* (2014) *Chem. Rev.* **114**, 126-163. DOI: 10.1021/cr4003769.
- 2) 土井聡子, 須藤雄気 (2015) *ビタミン* **89**, 83-86.
- 3) Brown, L. S. (2013) *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 553-561. DOI: 10.1016/j.bbabo.2013.05.006.
- 4) Boyden, E. S. *et al.* (2005) *Nat. Neurosci.* **8**, 1263-1268. DOI: 10.1038/nn1525.
- 5) Murugapiran, S. K. *et al.* (2013) *Genome Announc.* **1**, e00106-e00112. DOI: 10.1128/genomeA.00106-12.
- 6) Tsukamoto, T. *et al.* (2013) *J. Biol. Chem.* **288**, 21581-21592. DOI: 10.1074/jbc.M113.479394.
- 7) Balashov, S. P. *et al.* (2005) *Science* **309**, 2061-2064. DOI: 10.1126/science.1118046.
- 8) Tsukamoto, T. *et al.* (2014) *J. Phys. Chem. B.* **118**, 12383-12394. DOI: 10.1021/jp507374q.
- 9) Tsukamoto, T. *et al.* (2012) *Biophys. J.* **102**, 2906-2915. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.05.008.
- 10) Tsukamoto, T. *et al.* (2013) *FEBS Lett.* **587**, 322-327. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.12.022.

塚本 卓

塚本 卓 (つかもと たかし)

岡山大学医歯薬学総合研究科 (薬学系) 助教
2013 年北海道大学大学院生命科学院博士後期課程修了, 博士 (生命科学)。名古屋大学大学院理学研究科博士研究員, 岡山大学医歯薬学総合研究科 (薬学系) 非常勤研究員を経て, 14 年より現職。
研究内容: 微生物ロドプシンの動作機構の解明
連絡先: 〒700-8530 岡山市北区津島中 1-1-1
E-mail: t-tak@pharm.okayama-u.ac.jp

須藤雄気

須藤雄気 (すどう ゆうき)

岡山大学医歯薬学総合研究科 (薬学系) 教授
2005 年北海道大学大学院薬学研究科修了, 博士 (薬学)。テキサス大学ヒューストン校ボスドク, JST・さきがけ研究員などを経て, 14 年より現職。
研究内容: 光が駆動する生命現象の解明と創薬研究への展開
連絡先: 同上
E-mail: sudo@pharm.okayama-u.ac.jp
URL: <http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/bukka/index.html>