

「ルミラーフィルムに吸着したバクテリアのもつ光駆動イオンポンプロドプシタンパクの起電特性」

Properties of the electrogenic activity of Light-driven ion pump rhodopsin protein
in bacteria absorbed on Lumirror film

物理学専攻 宗行研究室 宮崎師夫

1.序論

多くの生物は、光をエネルギー源として利用する。塩湖や塩田などの過酷な条件下に生息する古細菌の高度好塩菌には、高等生物の視物質であるロドプシンと同様、レチナールを発色団として持つ7回膜貫通型の光受容タンパク質が存在し、エネルギー変換に寄与している。これらのタンパク質は、古細菌型ロドプシンと呼ばれて、古細菌だけに存在するものと考えられてきた。しかし、近年、真核生物や真正細菌の一部からも類似のレチナールタンパク質が発見され、自然界に広く存在することが明らかとなってきた。そして、レチナールタンパク質を用いたエネルギー変換は、一部の生物が持つ特殊な機能ではなく、多くの生物に備わっていることが示されはじめています。

レチナールタンパク質のなかでも、バクテリオロドプシン(bR)・ハロロドプシン(hR)・プロテオロドプシン(PR)は光駆動イオンポンプ機能(bR・PRの場合プロトン、hRの場合クロライド)を有する。これらのタンパク質このポンプ機能により膜電位を形成し、生物が生きるために必要なATPの合成に寄与していると考えられている。従って、そのイオン輸送メカニズムの解明は、自然条件下におけるエネルギー合成系を理解するうえで重要である。しかし、イオン輸送の詳細な性質については、いまだ不明なところが多い。その一つとして起電性が挙げられる。光駆動イオンポンプの機能はイオンを輸送することであり、イオンは電荷をもっていることから、光駆動イオンポンプは電流を流していると考えられる。つまり、これらタンパク質は生体内で光エネルギーを電気的エネルギー・起電力に変換している。このことから、これらタンパク質の持つ起電力は、イオン輸送における重要なパラメーターの一つであると言える。本研究は、これらタンパク質の持つ起電性の振る舞いを調べることでイオン輸送メカニズムについて知見を得ることを目的とした。

2.目的

本研究では、脂質膜に埋まった各種の光駆動イオンポンプをルミラーフィルムに吸着した実験系で、光照射による電流の応答を測定する方法を用いている。

2-1,バクテリオロドプシン(bR)

光強度・pH依存性を調べることで、bRの起電性がそれぞれに対しどのような振る舞いをするかを直接観察し、構築された等価回路モデル解析により各依存性の起因を知ることを目的とした。

2-2,ハロロドプシン(hR)

輸送するイオンの異なるハロロドプシンの光強度依存性を調べることで、bR解析時に用いた等価回路モデルが一般的なロドプシンに適応できるかを知ることを目的とした。

2-3,プロテオロドプシン(PR)

PRは近年発見されたレチナールタンパク質である。そのため、PRのプロトン輸送機構はbR・hRに比べ、明らかになっていない。最近の報告で、PRは低pH条件下でプロトン放出を行うことが報告された。これはプロトン受容器が2つあることを示唆している。PRにおけるプロトン受容器とされていたAsp97は、低pHでほぼ完全に非解離型の状態にあることから、プロトンの放出を示すシグナルは見られないと推測された。これはAsp97以外にもプロトン受容器が存在していることを示唆している。ここで、私たちは、2つ目のプロトン受容器の候補に挙げられたAsp227とAsp97に変異体を導入し、それらの輸送活性を調べることでプロトン受容器が2つあるかどうかを明らかにすることを目的とした。

3.測定方法

ルミラーフィルムとは非常に薄い絶縁体膜である。この絶縁体膜を二区画で構成されるテフロン製のチャンバーの間に挟み込む。私たちはこのルミラー入チャンバーをセルと呼んでいる。タンパク質は光の入る穴の開いている方のルミラーフィルム上に吸着させられ、測定される(Fig.1)。

私たちは、この測定系を用いることで、Fig.2のようなシグナルを得ることができる。

3-1.pH依存性

pH 依存性は、タンパク質が吸着している側のpHの変えることで調べられた。

3-2.光強度依存性

光強度依存性は減光フィルターを用いて光強度を制御し、調べられた。

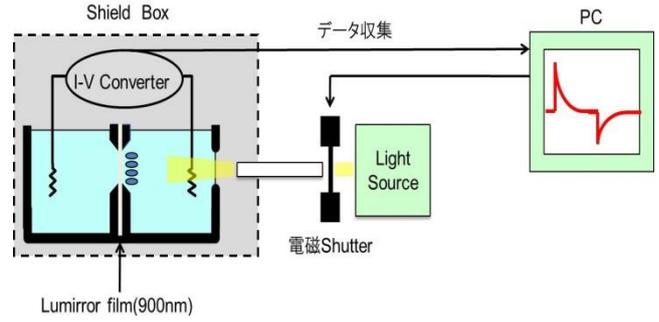


Fig.1 電気測定系

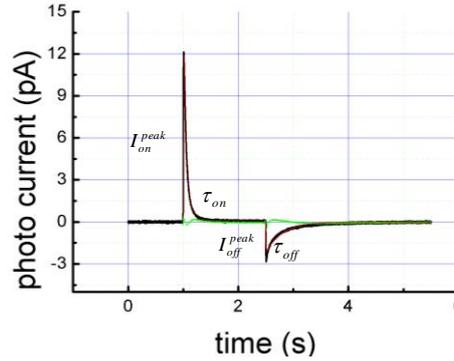


Fig.2 得られるシグナル(bR)

4.等価回路モデル

この電気測定系から、Fig.2 のようなシグナルが得られた。私たちは、Exponential Fitting により、光照射時と消光時のピーク値と時定数をそれぞれ得ることができる。光照射時の面積と消光時の面積は、それぞれルミラーフィルムに溜まった電荷量・放出された電荷量に相当する。これら面積がほぼ等しいことから、この測定系にはしっかりとした電荷の流れがあることがわかる。このことから、私たちは電気測定系のモデルとして電気回路を用いた。

この等価回路を解くことで、スイッチ on とスイッチ off のモデル解が得られた。

$$I_{on} = n \frac{E_{BR}}{R_{BR}} \frac{C_{LM}}{C_{LM} + C_M} \exp \left\{ -\frac{1}{C_{LM} + C_M} \left(\frac{n}{R_{BR}} + \frac{1}{R_M} \right) t \right\}$$

$$I_{off} = \frac{-nE_{BR}}{R_{BR} + nR_M} \frac{C_{LM}}{C_{LM} + C_M} \exp \left\{ -\frac{1}{R_M} \left(\frac{1}{C_{LM} + C_M} \right) t \right\}$$

私たちは、Fitting により光照射時と消光時のピーク値と時定数(計4つの値)を得ることができる。これらの値はモデル式において係数と時定数に相当する。

私たちは、これら4つのパラメーターを組み合わせることで結果を考察した。

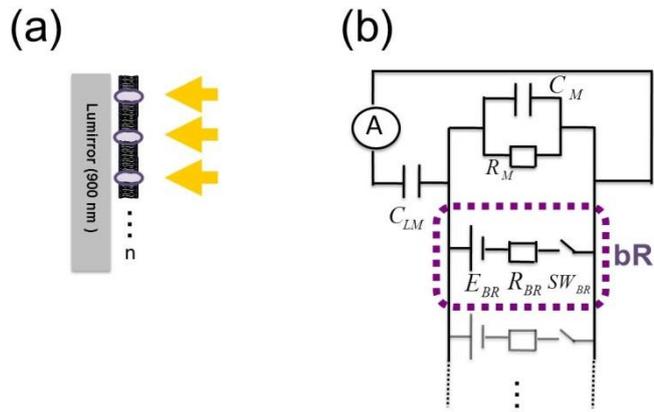
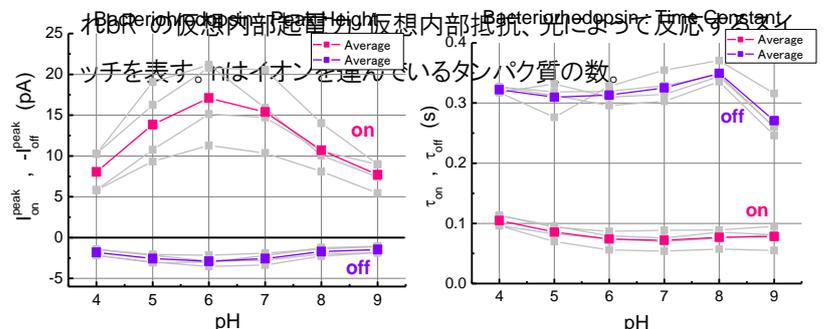


Fig.3 電気測定系の等価回路図

(a)ルミラーフィルムと脂質二重膜とタンパク質の位置

(b)等価回路モデル。C_{LM}はルミラーフィルムの静電容量。C_M・R_Mはそれぞれ脂質二重膜の静電容量と抵抗。E_{BR}・R_{BR}・SW_{BR}はそれぞれ



5.結果と考察

5-1. バクテリオロドプシン pH依存性

私たちは、Fig.4 のようなpH依存性の結果を得た。ここで、等価回路モデルの係数と時定数を以下のように組み合わせることにより、タンパク質のモデル化に用いた素子を含んだ式を得ることができた。

$$\frac{\tau_{off}}{\frac{1}{I_{off}^{peak}} - \frac{1}{I_{on}^{peak}}} = C_{LM} E_{BR}$$

Fig.5 はそれをプロットしたものである。

ここで、 $C_{LM} E_{BR}$ はピーク値と似た依存性を示している。このことは、pH依存性の起因が E_{BR} であることを示している。私たちは、起電力がpH6を最大とした山形の依存性を形成する原因がpHの取り込み放出のし易さにより生じている(pHが低いと取り込みにくく、pHが高いと放出しにくい)と考えている。

Fig.4 ピーク値(左)と時定数(右)のpH依存性

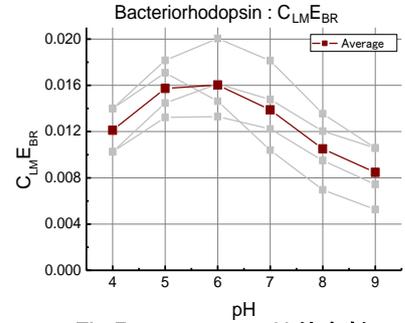


Fig.5 $C_{LM} E_{BR}$ のpH依存性

5-2. バクテリオロドプシン 光強度依存性

私たちは、Fig.6 のような光強度依存性の結果を得た。pH依存性同様、等価回路モデルの係数と時定数を組み合わせることにより、タンパク質のモデル化に用いた素子を含んだ式を得ることができた。

$$\frac{\tau_{off}}{\frac{1}{I_{off}^{peak}} - \frac{1}{I_{on}^{peak}}} = C_{LM} E_{BR}$$

$$\frac{I_{on}^{peak} - I_{off}^{peak}}{I_{off}^{peak}} = R_M \left(\frac{n}{R_{BR}} \right)$$

Fig.7 はそれをプロットしたものである。

ここで、 $C_{LM} E_{BR}$ は光強度に依存していない。これは起電力がピーク値の光強度依存性に関与していないことを示している。したがって、光強度依存性の起因は他にある。私たちは、それを $\left(\frac{n}{R_{BR}}\right)$ であると考えている。時定数(off)は光強度

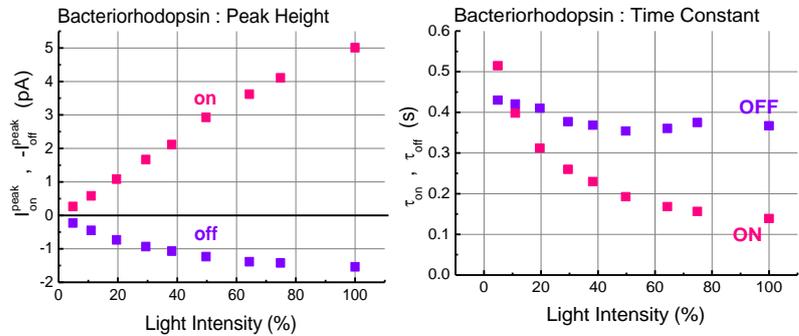


Fig.6 ピーク値(左)と時定数(右)の光強度依存性

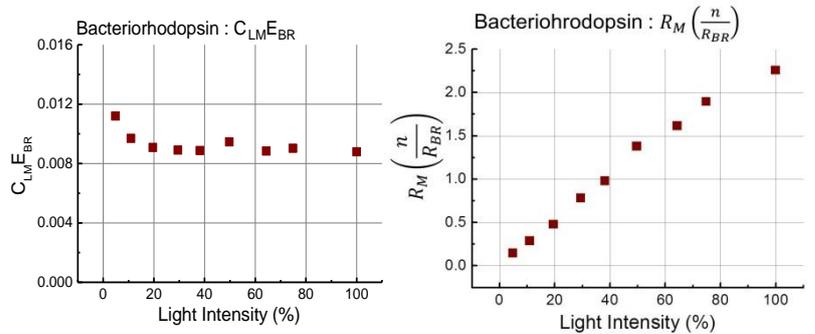
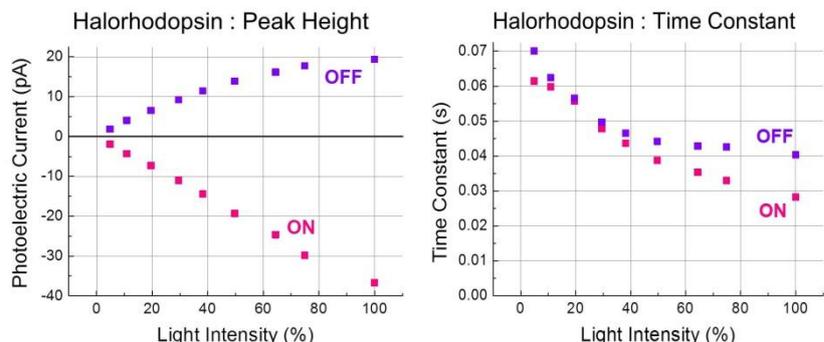


Fig.7 $C_{LM} E_{BR}$ (右)と $R_M \left(\frac{n}{R_{BR}}\right)$ (左)の光強度依存性

に依存していない(Fig.6)。このことは、モデル式から膜が光強度に依存していないことを示している。つまり、 $\frac{n}{R_{BR}}$ が光強度依存性を形成している。これは、光強度減少に伴い活性化されたタンパクが減少、またはタンパク質の内部抵抗が増大、またはその両方がこの依存性の起因であることを示唆している。

5-3. ハロロドプシン 光強度依存性

私たちは Fig.8 のような光強度依存性の結果を得た。ここで、私たちは等価回路モデルでの説明が難しい結果



を得ることになった。それは、時定数(off)の光強度に対する大きな依存性である。これは、等価回路モデルにおいて時定数が膜とルミラーのみで構成されているため、膜とルミラーが光強度に依存している結果を示している。

光強度の変化は、シグナル大きさを溜まるイオンの量に比例する。このことから、私たちは、この結果の生じる原因として、溜まったイオンが膜へ何かしらの影響を及ぼしているのだと推測し、光照射時間を変え溜まるイオン量を制御する実験を行った(Fig.9)。

私たちは、シグナルの面積を計算することで、チャージされたイオン量または放出されたイオン量を得ることができる。このことから、放出されたイオン量と時定数(off)の関係を調べた(Fig.10)。Fig.10はイオン量

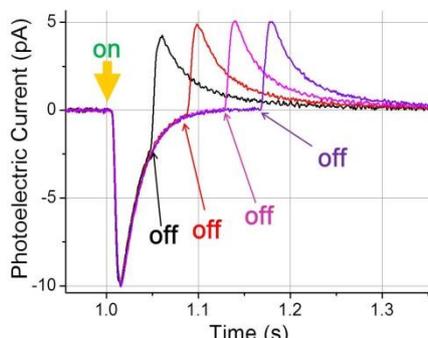


Fig.9 光照射時間を変えた測定

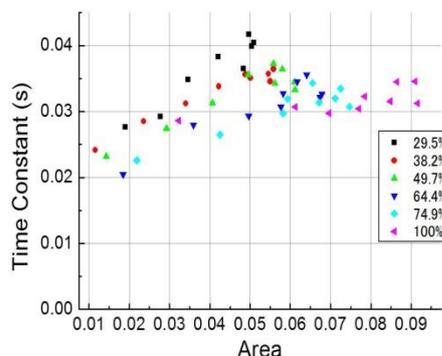


Fig.10 放出されたイオンと時定数の関係

が減少するとあるところで時定数が減少する結果を示した。これは、Fig.8(左)と矛盾を生じる結果であり、時定数(off)はイオン量ではなく光強度に依存していることを示している。これは、膜の色素など、タンパク質以外のものが光に反応していることを示唆している。

私たちは、今後の実験として、タンパクのみ反応する波長の光を照射し、膜の光強度に対する依存性を調べる計画を立てている。

5-4. ハロロドプシン クロライド濃度依存性・プロテオロドプシン pH依存性

今回、私たちは再現性の悪いデータしか得ることができなかった。要旨にはデータは載せず、修士論文の補足欄に載せる。今後の進展に期待したいと思う。

6. まとめと展望

私たちは、バクテリオロドプシンに対し等価回路モデルで得られたシグナルを解析した。結果、起電力と表現したパラメータは、光強度に対して一定であるがBufferのpHに対しては依存性を示し、中性付近でその最大値を持つことを示した。同じようにハロロドプシンでも等価回路モデルと照らし合わせてみたところ、膜が光強度に依存する結果を得ることとなった。この原因について調べてみたところ、推測していた依存性の原因であるイオン量ではなく、やはり光強度であった。これは、タンパクのほかに膜が光反応する物質を持っていることを示している。

今後の展望は、膜の光強度の依存調査、等価回路モデルを検討を行い、イオン輸送メカニズムについてさらなる知見を得ることである。