特集:生化学に新たな視点を与える技術の開発とその応用

微生物型ロドプシンの信号伝達の解明に向けた 1分子観察法の開発

井 上 圭 一

センサリーロドプシン (SR) は真正細菌や古細菌などの走光性に関わる、光受容型膜タンパク質である。細胞内にはおよそ4,000 個の SR が存在し、そのわずか 1% が光によって活性化するだけで、細胞の遊泳をコントロールすることができるといわれている。この高感度な光センシング機能は、細菌が微弱な光に応答するために重要である。そしてこれを可能にするために、同じ膜中にあるトランスデューサータンパク質や細胞内に存在する Che タンパク質からなる、細胞内シグナル増幅機構が関わっていると考えられているが、その詳細は明らかになっていない。本研究で我々はフェルスターエネルギー移動(FRET)法を用いて、1分子の解離や結合を直接可視化することができる全反射 1分子蛍光顕微鏡を新たに構築し、SR の信号伝達機能の解明に向け、ロドプシンの観察に応用した。

1. 微生物型ロドプシンと細菌の走光性

微生物型ロドプシンは真正細菌や古細菌などの主に単細胞微生物のもつ光受容型の膜タンパク質である。すべての微生物型ロドプシンは7回の膜貫通へリックスからなる共通構造を持ち、さらに共通の発色団として all-trans 型のレチナールをその内部に結合する。そしてこのレチナールが光を吸収すると all-trans 型から 13-cis 型への異性化が起こり、それをきっかけとしてタンパク質の構造が大きく変化し、さまざまな機能が光によって発現する。そしてこのような微生物型ロドプシンの大部分は光駆動型の外向きプロトン(H^+)ポンプであり、高度好塩古細菌 Halobacterium salinarum の持つバクテリオロドプシン(PR)"のほか、海洋性細菌の持つプロテオロドプシンは高度好塩古細菌 など、一部の生物種にしかないと考えられてきたが、近年

名古屋工業大学大学院工学研究科未来材料創成工学専攻 (〒466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町 名古屋工 業大学1号館806A号室)

The development of single molecular method for the study on the signal transduction mechanism of microbial rhodopsins

Keiichi Inoue (Department of Frontier Materials, Nagoya Institute of Technology, Room 806A, 1st Building, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466–8555, Japan)

環境メタゲノム解析の発達などにより,真正細菌,古細菌 そして真核生物にわたる非常に広範な生物種から微生物型 ロドプシンが発見されており,今ではその数は5,000種類 以上に及ぶ.

その一方で H. salinarum などは BR 以外のロドプシンも持つことがわかっており、それには細胞の内側へ塩化物イオン (CI) をポンプするハロロドプシン (HR)^{4.5)}や細胞の走光性のセンサーとして機能するセンサリーロドプシン (SR) がある。このうち SR についてはセンサリーロドプシン I (SRII) の2種類が存在し、前者は緑色~赤色の比較的長波長の光に向かって遊泳する正の走光性のセンサーとして働くのに対し、SRII は青色光に対して細胞が回避行動をとる、負の走光性に関与することがわかっている⁶⁾. さらに長波長側の可視光で活性状態になった SRI は、紫外光に対して負の走光性を示すことも知られている (図1).

SRIとSRIIはそれぞれトランスデューサータンパク質 (Htr)と呼ばれる、巨大な細胞質領域を持った膜タンパク質と細胞膜中で結合し、SR二つ、Htr二つのヘテロ四量体型複合体を形成する。SRI、SRIIはそれぞれ別の種類のHtr(HtrIおよびHtrII)と結合し、光励起されたSRからのシグナルをタンパク質の構造変化を介してHtrが受け取り、さらにHtrは細胞質中で結合しているCheA/CheW複合体へとシグナルをリレーする(図1)。このときSRI/HtrIを可視光で活性化した場合は、正の走光性のためのシグナ

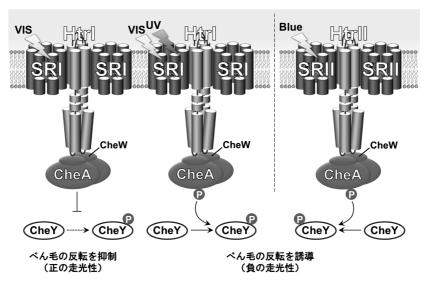


図1 SR/Htr および Che タンパク質群による、走光性のためのべん毛の回転制御

ル伝達が行われ、CheA は CheY のリン酸化を阻害することで、最終的にべん毛モーターの反転頻度を下げ、正の走光性を達成する。逆に活性型の SRI が紫外光を吸収する場合や、SRII が青色光を吸収した場合には、CheY のリン酸化を促進し、べん毛の反転頻度を上昇させ、負の走光性へとつながる。この Che タンパク質を介したべん毛モーターの回転制御は、大腸菌などでよく調べられている、走化性受容体による走化性制御のものと同一である。そしてリガンドの添加などが必要な走化性受容体と比べ、SR/Htr の系は光による容易な制御が可能であり、それを用いてシグナル伝達メカニズムを調べることで、微生物の走性全般に関連した重要な知見が得られると期待され、さまざまな研究が行われている。

これまで SRI, SRII ともに in vitro における光反応ダイ ナミクスは非常に広範な研究が行われてきたが、その一方 で細胞内における振動伝達過程についての研究はほとんど 行われていない. 過去の研究から H. salinarum の菌体中に は約4,000 個の SRI と 400 個の SRII が存在すると見積も られている⁷が、たとえば SRI のうち、わずか 1% という 非常に少数の分子が活性化されるだけで、細胞の遊泳パ ターンに変化が現れるといわれている. これは SRI 約 40 個分に相当するが、これほど少数ではべん毛の回転パター ンを変えるには不十分である. そこで一般的には受容器か らの信号は微弱な光シグナルを捉えるため、Che タンパク 質に伝達される段階でシグナルの増幅が行われると考えら れている。たとえば大腸菌の走化性受容器では一つの受容 体が36個のCheAキナーゼを活性化するという報告もあ る8. しかしこれは最も典型的な大腸菌の走化性受容器の 場合であり、HtrI が同様に信号増幅を行っているのかは明 らかになっていない。しかし少数の活性化分子がどのよう にして細胞の運動を制御するのかを理解するためには、信 号増幅機構の解明が鍵となる. そこで我々は分子の数を直 接カウントすることができる1分子観察法を用いて、光励 起された SR/Htr 複合体が何分子の CheY と相互作用し、 どれぐらいの効率で信号を増幅するのか、その解明を目指 して研究を行っている.

2. 走光性のシグナル伝達過程の1分子観察

SR/Htr/CheW/CheA 複合体から CheY に信号を伝達する 際には、必ず両者の間に分子の結合が起こることが必須で あり、1回の結合ごとに1分子の CheY が活性化されると 考えられる。すなわち SR/Htr を活性化した後。CheA が 何分子の CheY と結合し、活性化するのかをカウントする ことができれば、この過程での光シグナルの増幅率を求め ることができる. この二つの分子の結合と解離を観察する 代表的な手法に、蛍光励起エネルギー移動(FRET: Förester resonance energy transfer) 観察法がある. FRET 観察 法は二つの色素の間のフェルスター型共鳴エネルギー移動 (電子の交換を必要とするデクスター型のエネルギー移動 と異なり、二つの色素の間で分子衝突を必要としないエネ ルギー移動)を利用したもので、これはある蛍光色素 (Donor) を光励起した際に、もう一方の色素 (Acceptor) の吸収スペクトルと Donor の蛍光スペクトルの波長域が 十分に重なり、かつ二つの色素の分子間距離が数 nm 以下 にまで接近している際に生じる現象であり、このとき Donor 色素からその励起エネルギーが Acceptor 色素に移動 し、Acceptor からの発光が観察される.この励起エネル ギーの移動効率は色素間の距離の6乗に反比例するため, 二つの色素間の距離が小さくなるほど、FRET 効率が上昇 する (図2A). したがって, Donorと Aceptor それぞれの 蛍光強度から、二つの色素間で移動するエネルギーの割合 を求めることで、互いの色素間の距離情報を得ることがで きる.

この FRET を 1 分子 観察 に応用したものが、1 分子 FRET 観察法であり、蛍光顕微鏡を用いて Donor と Accep-

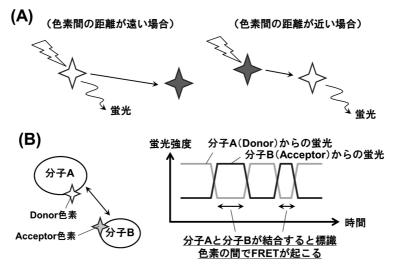


図2 FRETを用いた1分子観察

(A) FRET を用いることで、分子間の距離が求められる。(B) 二つのタンパク質をそれぞれ蛍光色素で標識し、その間の FRET を 1分子観察することで、タンパク質の結合・解離をリアルタイムで観察し、さらにその頻度や結合時間などを分子ごとの違いも含めて明らかにすることができる。

tor 色素それぞれの1分子蛍光と、それらの間のエネルギーの移動効率をみることによって、単一の分子の結合や解離をリアルタイムで観察することができる手法である。そしてFRETの起こる時間を計測することで、分子の結合に要する結合時間や、結合の頻度が求められる(図2B)、またタンパク質のような巨大分子では、さまざまな分子的な性質が均一なものにならず、分子ごとに差が生じることが一般的である。1分子測定ではこのような分子の個性ともいえる性質の差についても調べることができ、多数の分子を対象としたマクロな実験からは得られない、さまざまな知見を得ることができる。

本研究では一方の蛍光色素で標識した SR/Htr/CheW/CheA 複合体をガラス基板上に固定し、さらに溶液中に存在するもう一方の色素で標識された CheY との間の FRETを 1分子測定することで、互いの結合をリアルタイムで観察する。このときロドプシンを光励起した際に何分子のCheY が活性型の CheA と相互作用するかを計測すること

で、信号増幅率を決定することが可能であり、目的とする 信号増幅率の定量的な研究を行うことができる.

3. 分子観察法

蛍光1分子観察を行う上で、光受容タンパク質である、ロドプシン特有の問題として、通常の蛍光観察に用いる観察光では、ロドプシン自体が不必要に活性化されてしまうということがあげられる。我々の研究では SR の光活性化に伴って、どの程度 CheA と CheY の結合が変化するのかをみるため、常時観察光によって SR が活性化されることを避ける必要がある。そのために我々はロドプシンのもつ吸収(図3、~600 nm)より、十分に長波長側に吸収を持つ蛍光色素を用いることで、観察光によるロドプシンの光励起が回避できると考えた。その一方で Donor および Acceptor として用いる色素の間には、十分に FRET を起こすだけの Donor の蛍光スペクトルと Acceptor の吸収スペク

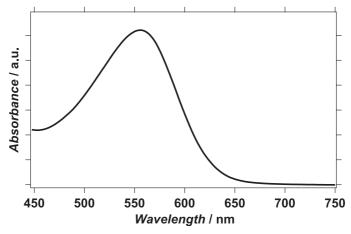


図3 SRIの可視吸収スペクトル

トルの重なりが必要とされる.このような条件を満たす蛍光色素の組み合わせは非常に限られているが、最も適していると考えられるのが、Thermoscientific 社製の色素である Dylight 650 と 680 の組み合わせである. それぞれロドプシンの吸収のない長波長の光で励起することが可能であり、なおかつ Dylight 650 の蛍光スペクトルと Dylight 680 の重なりも大きいことから、十分な FRET が起こると期待される.

SR/Htr/CheW/CheA 複合体の基板への固定には図4のようにビオチンとストレプトアビジンの結合を利用して行う。SRのN末端にはHisタグを導入することが可能であり、Ni-NTAを結合させたビオチンを介して、ガラス基板上のストレプトアビジンに結合させることができる。またストレプトアビジン自体もビオチンを結合させたPEGを介して基板に強固に固定することができる。これによってSR/Htr/CheW/CheA 複合体がガラスと直接相互作用することが可能であり、互いの間のシグナル伝達に伴うFRET効率の変化を観察することができる。

一方、観察系である顕微鏡の構築について、1分子観察では微弱な蛍光を捉えるため、なるべく背景光による影響を少なくすることが求められる。そのためによく用いられるのが全反射型の照明法である(図 5A)。これはガラスと水の屈折率の差を利用したものであり、対物レンズから観察のためのレーザー光を臨界角より浅い角度でガラスに入射させることで、ガラスと試料界面の間に全反射が起き、入射光はそこで反射される。しかし、その反射面におい

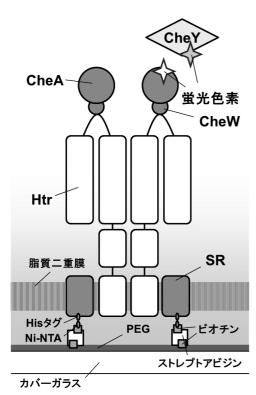


図4 全反射照明を用いた CheA から CheY への信号伝達過程 の1分子観察法

て、光の一部が試料側へしみ出す形で近接場光の一種である Evanescent 光が生じる. この Evanescent 光はガラス界 面からおよそ 100 nm 程度の領域までを照射することが可能であり、ガラス近傍の非常に狭い領域に存在する分子からの蛍光のみを選択的に観察することができ、溶液中の背景光を極力抑えた測定を行うことができる.

そのため本研究ではオリンパス社製の倒立型顕微鏡の背 面から 647 nm の半導体レーザー光を導入し、対物レンズ (×60,油浸)内で全反射させ、試料内に Evanescent 光を 生じさせることで、カバーガラス近傍の分子からの蛍光の みを観察することができる系を構築した(図5B,C).分 子からの蛍光は同じ対物レンズを用いて集光し、ダイクロ イックミラーを用いて励起光と分離した後に、観察用のカ メラへと導入した. 本研究では二つの蛍光色素の強度を同 時モニターすることで、その間の FRET 効率を求めるが、 そのために浜松ホトニクスより販売されている二つの受光 面を有する Dual 型の CCD カメラ (ORCA-D2) を用いた (図 5C). ORCA-D2 カメラは内部に一部の波長の光を反射 し、残りの光を透過する光学ブロックを内蔵しており、新 たに専用の光学ブロックを特注することで、Dylight 650 と 680 それぞれの蛍光を別々の受光面で観察することを可 能とした. なお ORCA-D2 の光学ブロックは容易に取り出 すことが可能であり、Dvlight 650 と 680 以外の蛍光色素 の組み合わせであっても、それに応じた光学ブロックを用 いることで、FRET 観察が可能である. 次節では実際に本 測定系を用いて行ったロドプシンの1分子観察の結果につ いて述べる.

4. ロドプシンの1分子観察

ロドプシンの1分子観察が前述の顕微鏡で可能であることを実証するため、まず我々は手順が複雑となる、図4のような化学的に分子を基板に結合させる形ではなく、ロドプシンを脂質二重膜中に再構成し、それを非特異的結合を用いてガラス表面に吸着させ、さらに全反射型の照明を行うことで、脂質二重膜中に含まれる分子からの蛍光観察を行う手法を用いた.

まず測定に用いるロドプシンとして、最終的な目標である SR は比較的安定度が低いため、より安定度が高く、試料調製が容易な blue-proteorhodopsin (BPR)⁹⁾を用いた。蛍光観察用の色素はタンパク質を標識する際に、マレイミド反応を用いてシステイン (Cys) 残基に結合させる必要がある。しかし BPR は表面に露出した Cys を持っていないため、そのままでは標識を行うことができない。そこで膜貫通へリックス間をつなぐループ部分に Cys を導入した変異体を新たに構築した。そしてロドプシンの発現は大腸菌 C41 (DE3) 株を用いて行い、n-dodecyl-β-D-maltoside (DDM)に可溶化後、C 末端に付加された His タグ配列を利用した、Ni-NTA アフィニティーカラムによる精製を行った。精製後の試料はタンパク質と脂質のモル比が 1:200

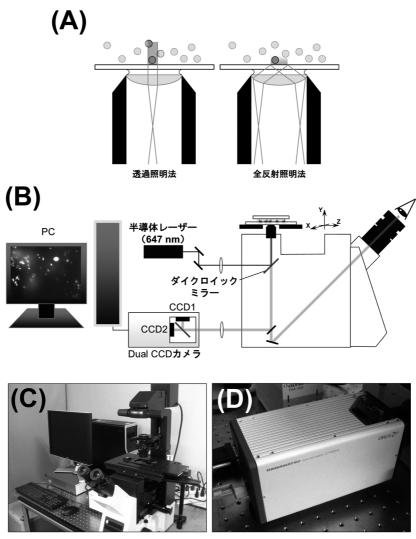


図5 本研究で用いている全反射型1分子蛍光顕微鏡
(A) 全反射照明法を用いることで、ガラス近傍に結合した分子からの蛍光を選択的に捉えることができる。(B) 本研究で用いた顕微鏡の概略図および(C) 顕微鏡本体、(D) Dual CCD カメラの装置写真。

~500程度になるように、脂質二重膜中に再構成した.この際の脂質には1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)を用いた.なお可溶化から再構成の過程においてはCysの酸化を防ぐため、すべてDDT存在下で調製を行った.そして二重膜への再構成後、試料を遠心することで、膜を沈殿させ、さらに上清を交換することで、溶媒からDDTを取り除いた.その後タンパク質のおよそ2倍のモル量になるように蛍光色素を加え、1時間程度マレイミド反応を進行させた後、再び遠心することでロドプシンに結合していない蛍光色素を取り除いた.

カバーガラス上への脂質二重膜の固定は、間に両面テープをはさみ込むことでわずかに隙間を作ったカバーガラスの間に、ロドプシンを含んだ脂質二重膜の懸濁液を毛管現象を利用して流し込み、自重でガラス表面上に吸着させることで行った。さらにガラス表面に結合しなかった余分な試料を、バッファーのみを流すことで洗い出したのちに、水の蒸発による試料の乾燥を防ぐため、スライドガラスの四方をマニキュアを用いて封じた。そのようにして作製し

た試料の蛍光像を観察したところ、脂質二重膜が数十μm以上の非常に大きな塊として存在していることがわかった。これは通常のピペッティングでは、それ以上の破砕が難しいためであり、新たに脂質二重膜を断片化することのできるミニエクストルーダーを用いて、スライドガラス添加前に試料の小片化処理を試みた。ミニエクストルーダーは二つの対向するシリンジの間にサブμm~μmサイズの径のポアが開いたメンブレンフィルターをはさんだ構造をしており、そのフィルターを通して溶液を行き来させることで、溶液中に含まれる脂質二重膜のサイズをメンブレンのポアと同程度の大きさまで小さくすることができる。このようにして処理した試料の蛍光像を観察したところ、確かに膜の小片化に成功し、数μm以下の小さなスポット上の輝点として蛍光が観察されるようになった(図 6A).

これらの輝点のうち強く光るものについては、レーザー 光を照射し続けると、蛍光色素のブリーチングによる強度 の減少が指数関数的なものとなり、ここからこのような強 い発光を持つ輝点は、多数の蛍光標識されたロドプシンが

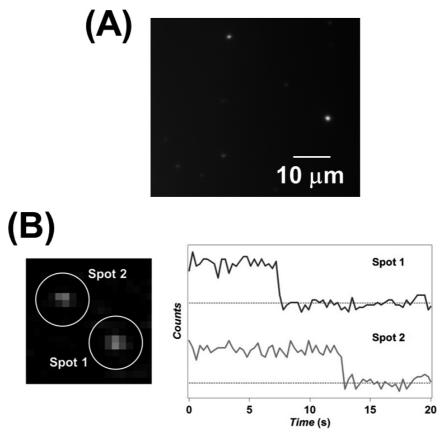


図6 ロドプシンの1分子蛍光像と、その強度の時間変化

密集したものからなることが示唆された。その一方で図 6 Bに示したような、非常に明るさが低く、顕微鏡の空間分解能に近い大きさの輝点については、指数関数型ではなく、ステップ型の消光を示した。またその消光のタイミングは隣り合う輝点どうしであっても異なっており、これら弱い輝点からの蛍光は、まさに1分子の蛍光ラベルされたロドプシン由来のものであると考えられる。

以上のことから、今回構築した我々の顕微鏡は十分にロドプシンの1分子観察に用いることができる感度を有することが実証された。図6に示した蛍光は単一の色素で標識されたロドプシン単体のものであるが、今後は蛍光標識した SR/Htr/CheW/CheA を膜に固定し、それと CheY との結合・解離過程を1分子 FRET 法で観察することで、そこから光信号の増幅過程について詳細な知見を得ることを目指す.

5. 今後の展望

近年メタゲノム解析の発達などにより、数千種類の微生物型ロドプシンの存在が明らかになっており、生物学におけるその重要性が非常に大きくなっている。その中にはカチオンチャネルや遺伝子発現制御、外向きナトリウムポンプなど 2000 年以前には予想もされていなかった機能を持つロドプシンも存在し10~130、一方でそれらを神経細胞などの光操作に用いた、オプトジェネティクス分野の発展な

どは、15)、微生物型ロドプシンを取りまく研究は多方面に大きな拡がりを見せている。そしてこれまで日本を含む各国の研究により、ロドプシンそのものの光反応ダイナミクスについては、レーザー分光などを用いることで、非常に詳細に明らかにされてきた。16)。その一方で細胞生物学的な観点から微生物型ロドプシンの関与する細胞内プロセスについて調べた研究例は非常に限られている。中でも SR/Htrが関与する Che タンパク質を介した細胞の走光性のための信号伝達過程については、ほとんど何も解明されておらず、光受容体であるロドプシンとべん毛モーターの回転がどのようにつながっているのか、発見から 30 年以上が経過した今なお、その詳細は不明である。

これに対し我々が今回新たに構築した全反射型1分子蛍光観察用顕微鏡は、通常の1分子蛍光顕微鏡よりも長波長の蛍光色素や励起レーザーを用いることで、不必要な分子の活性化に邪魔されずに、ガラス基板に固定されたロドプシン分子に対する1分子FRET観察を行うことができる。そして今後はSR/HtrからのシグナルがCheYに受け渡されるまでの間にどの程度の信号増幅が行われるのを、直接的に明らかにすることができると期待される。これはわずか数十分子の活性化によって、細胞の遊泳方向が決定されるという長年の疑問に答えをもたらすものであり、細胞内におけるロドプシンの役割について新たな観点から調べることを可能にするものである。

これまでロドプシンについて1分子観察を行った研究例

は非常に限られている¹⁷⁾. しかし1分子観察はモルオーダーの試料を対象とした実験では調べることができない、少数の分子の関連する生理現象や、それぞれのタンパク質分子のもつ構造揺らぎやさまざまな物理量の分布などを明らかにすることができる唯一の手法である。そして今後は我々の構築した顕微鏡を用いることで、SR/Htr/Che タンパク質の間の信号伝達過程だけでなく、ロドプシンが関わるさまざまな生命現象の研究に応用することで、光生物学における少数性というこれまでまったく調べられていなかった問題について、その詳細な解明を目指していく.

謝辞

本研究は名古屋工業大学大学院工学研究科・神取秀樹教授、名古屋大学大学院工学研究科・須藤雄気准教授との共同研究によるものであり、神取教授には研究を進める上での多くの助言と協力をいただき、また須藤准教授にはロドプシンの遺伝子操作など、主にタンパク質の構築において協力していただいたことに、厚く御礼申し上げます。また本研究は文部科学省・新学術領域研究「少数性生物学―個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求―」の助成を受けたものです。

文 献

- Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. (1971) Nat. New Biol., 233, 149–152
- 2) Béjà, O., Aravind, L., Koonin, E.V., Suzuki, M.T., Hadd, A., Nguyen, L.P., Jovanovich, S.B., Gates, C.M., Feldman, R.A., Spudich, J.L., Spudich, E.N., & DeLong, E.F. (2000) *Science*,

- 289, 1902-1906.
- Spudich, J.L. & Jung, K.-H. (2005) in Handbook of Photosensory Receptors (Briggs, W.R. & Spudich, J.L. eds.), pp. 1–23, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- 4) Matsuno-Yagi, A. & Mukohata, Y. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 78, 237–243.
- Schobert, B. & Lanyi, J.K. (1982) J. Biol. Chem., 257, 10306– 10313.
- 6) Spudich, J.L. (2006) Trends Microbiol., 14, 480-487.
- 7) Schegk, E.S. & Oesterhelt, D. (1988) EMBO J., 7, 2925–2933.
- Sourjik, V. & Berg, H.C. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 123–127.
- Béjà, O., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Leclerc, M., & DeLong, E.F. (2001) *Nature*. 411, 786–789.
- Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E., & Hegemann, P. (2002) Science, 296, 2395– 2398
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., & Bamberg, E. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 13940–13945.
- 12) Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., Kogure, K., & Kandori, H. (2013) Nat. Commun., 4, 1678.
- Jung, K.H., Trivedi, V.D., & Spudich, J.L. (2003) Mol. Microbiol., 47, 1513–1522.
- 14) Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005) Nat. Neurosci., 8, 1263–1268.
- Chow, B.Y., Han, X., Dobry, A.S., Qian, X., Chuong, A.S., Li, M., Henninger, M.A., Belfort, G. M., Lin, Y., Monahan, P.E., & Boyden, E.S. (2010) *Nature*, 463, 98–102.
- 16) Inoue, K., Tsukamoto, T., & Sudo, Y. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- 17) Bayraktar, H., Fields, A.P., Kralj, J.M., Spudich, J.L., Roth-schild, K.J., & Cohen, A.E. (2012) *Photochem. Photobiol.*, 88, 90–97.

著者寸描 ■

●井上 圭一(いのうえ けいいち)



名古屋工業大学大学院工学研究科未来材料創成工学専攻助教. 博士 (理学).

- ■略歴 1997 年徳島県に生る. 2002 年神戸大学理学部卒業. 07 年京都大学大学院博士後期課程修了・博士 (理学). 同年より東京工業大学資源化学研究所・特任助教. 2009 年より現職.
- ■研究テーマと抱負 物理化学, 光生物学, 生体分子分光学. 物理化学的および

生物物理学的手法を駆使して、ロドプシンを中心に、様々な光 受容タンパク質の機能メカニズムの解明を目指す.

- ■ホームページ http://www.ach.nitech.ac.jp/~physchem/kandori/index j.html
- ■趣味 読書,映画鑑賞,寺社参拝.