

## 光のエネルギーを用いてセシウムイオンを一方向に運ぶタンパク質の創成



神取 秀樹

Kandori Hideki

(名古屋工業大学大学院工学研究科, オプトバイオテクノロジー研究センター)

### 1 はじめに

筆者は光に応答するタンパク質のメカニズムを研究する生物物理学者・分子科学者であり、放射性セシウム回収のような実用研究とは無縁である。しかしながら、筆者らが創成した光駆動セシウムイオンポンプ<sup>1)</sup>は世界で初めてセシウムイオンを一方向に動かすことのできる技術であり、吸着のような「受動的な回収」ではなく、「能動的な回収」に向けた新たな原理の開発として注目された。

本稿では、光でセシウムイオンを一方向に輸送するシステム開発について紹介する。セシウムイオンの一方向輸送に至る道には、3つの障壁とそれを乗り越えるブレークスルーが存在した。水素イオンの一方向輸送(1971年)<sup>2)</sup>、ナトリウムイオンの一方向輸送(2013年)<sup>3)</sup>、そしてセシウムイオンの一方向輸送(2016年)<sup>1)</sup>である(図1)。最初のブレイ

クスルーはドイツ人研究者によってもたらされた一方、2つ目と3つ目については幸い、筆者らのグループがもたらすことができた。ちなみに1つ目と2つ目については自然界に存在するポンプ(エネルギーを使って一方向に輸送するので「ポンプ」と呼ばれる)を発見したというものであり、3つ目のセシウムイオンポンプだけが自然界に存在しないものを創成したことになる。次章ではまず、イオンなど荷電粒子を一方向に輸送するシステムがどのように研究されているかという現状と、水素イオンの一方向輸送を実現する光駆動ポンプの発見について解説し、その上でセシウムイオンの一方向輸送につながった研究を紹介する。

### 2 荷電粒子の一方向輸送と光駆動水素イオンポンプの発見

荷電粒子を常に一方向に輸送する場合、系のエントロピーを減少させることになるため、これはエネルギーを必要とする現象である。水溶液中で自由拡散するイオンを一方向に輸送するナノマシンを人工的にデザインすることはきわめて困難であるが、我々の体内では必要なものを細胞に取り込み、不要なものを細胞から汲み出すしくみが常時、働いている。これらは分子ポンプと呼ばれる細胞膜に埋め込まれた膜タンパク質であり、ATP(アデノシン3リン酸)の加水分解エネルギーなどを使ってイオンを

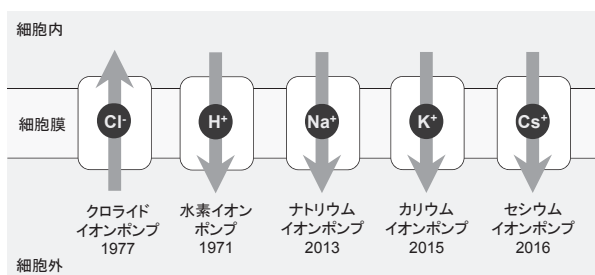


図1 光駆動イオンポンプ

光駆動イオンポンプをそれが発見・創成された年とともに示した

一方向に輸送する。例えば、バクテリアからヒトまで細胞内には  $K^+$  が多く  $Na^+$  は少ない。このような濃度分布が実現するのも、分子ポンプが  $K^+$  を取込み  $Na^+$  を汲み出すためである。

このように巧みな制御を行う細胞であるが、分子ポンプの働きを細胞以外の系で活かそうとすると、ATP などエネルギー源の供給が問題となるため、実用的ではない。この点、光エネルギーで駆動する荷電粒子の輸送であれば、エネルギー供給は理想的である。そこで次に、光による荷電粒子の一方向輸送を考えてみると、まず誰もが思いつのが植物の光合成であろう。光合成反応中心と呼ばれるタンパク質複合体は、クロロフィルが光を吸収すると、一方向に電子を輸送する結果、光エネルギー変換を実現する<sup>4)</sup>。100%の効率で起こる一方向の電子移動は太陽電池の目標となっているわけであるが、タンパク質の中を電子が一方向に輸送される理由は、酸化還元電位に従ってタンパク質という反応場の中を電子が移動するためである。タンパク質場は導電体ではないが、電子の受け渡しを担う部位を内部に配置し、ドナーからアクセプターへの電子移動を高い効率で行うことで、光合成の一方向電子輸送が達成される。

では電子以外の荷電粒子はどうであろう。荷電粒子として電子の次に軽い水素イオンでも電子より1,800倍以上も重いという事実は重要である。すなわち、電子の移動に際してタンパク質はほとんど形を変えないが、疎水的なタンパク質内部で  $H^+$  を一方向に輸送するためには、折り畳まれたタンパク質の内部に  $H^+$  を通す経路をつくる必要がある。水素イオンは裸の状態 ( $H^+$ ) で存在するわけではなく、水溶液中でオキソニウムイオン ( $H_3O^+$ ) として存在し、水分子の水素結合ネットワークがあればそこを玉突き的に運ばれる (Grotthuss 機構)。このとき経路が貫通しては、一方向輸送は起こらず  $H^+$  が逆流してしまうため、一方向輸送のためにはタンパク質が構造変化して過渡的な経路をつくる必要がある。更に光のエネルギーをどのように  $H^+$  の輸送に繋げるか、という問題もある。光合成反応中心の場合、光誘起電子移動が玉突き的な電子の一方向輸送の原動力となった。では光誘起水素イオン移動が起これば、 $H^+$  の一方向輸送が実現するのであろうか。

1971年、高度好塩菌という古細菌から光エネルギーを使って  $H^+$  を一方向に輸送するタンパク質が発見された (図1)<sup>2)</sup>。これがバクテリオロドプシン (bacteriorhodopsin; BR) である。ロドプシン (rhodopsin) は我々の網膜に存在する視物質であるが、BR は我々の視物質とよく似たしくみを使って、光を情報ではなくエネルギーへと変換する<sup>4)</sup>。BR は  $\alpha$  ヘリックスが7回膜を貫通する構造を持っており、中心部に光を吸収するレチナル分子が存在する (図2)<sup>5)</sup>。BR の構造を見ると、細胞外側領域には水分子を多く含む水素結合ネットワークが張り巡らされる一方、細胞内側領域に経路は存在せず、 $H^+$  の逆流を防ぐしくみが示唆される。内部に存在する全トランス型レチナルシッフ塩基 (RSB) はプロトン化して正電荷を持っており、これを安定化するため85番目のアスパラギン酸 (Asp85) がRSBと電荷対を形成する (図2b)。光を吸収すると  $10^{-13}$  秒の時間領域で異性化反応が起こり、13シス型が生成することで、イオン対の安定状態が崩れる結果、RSB から Asp85 に  $H^+$  が移動する。ただし光異性化は  $10^{-13}$  秒の超高速反応であるが、最初の  $H^+$  移動は  $10^{-5}$  秒と8桁の時間を要して構造変化が起こる<sup>4),5)</sup>。ポンプの一方向性に関係して重要なことは、RSB が Asp85 に渡した後、反対側から  $H^+$  を受け取ることであり、図2aに示すような玉突き的な  $H^+$  の移動が起こる。時間的・空間的な階層性を持って  $H^+$

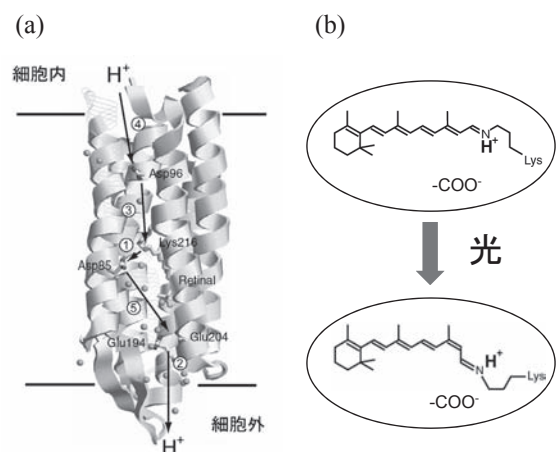


図2 光駆動水素イオンポンプの構造と光反応

(a) 光駆動水素イオン (プロトン) ポンプであるバクテリオロドプシンの構造中に  $H^+$  移動の経路と順番を示した。5回の  $H^+$  移動により1回の光反応で1個の  $H^+$  が一方向に輸送される  
(b) 光を吸収するレチナル分子はプロトン化により正電荷を持ち、負電荷を持った85番目のアスパラギン酸 (Asp85) により安定化される。レチナルが光を吸収すると、全トランス型から13シス型に異性化することで  $H^+$  の一方向輸送が開始する

移動の連鎖が起こる結果、細胞外側の  $H^+$  濃度が高くても一方向性の輸送が達成され、 $10^{-1}$  秒の時間領域で元の状態に戻るまでに 1 個の  $H^+$  を細胞外に輸送することになる。

### 3 光駆動ナトリウムイオンポンプの発見

自然は水素イオンポンプ以外にも光をエネルギーへと変換する装置を創り出してきた。BR の発見から 6 年後の 1977 年、内向きクロライドイオンポンプであるハロドロプシン (HR) の存在が明らかになった (図 1)。HR は  $Cl^-$  以外にも  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $NO_3^-$  をポンプできるので一価のアニオンポンプとすることができる<sup>5)</sup>。HR の場合、BR の Asp85 が中性化されたアミノ酸を持ち、このため RSB の近傍に  $Cl^-$  が結合する (図 3a)。光を吸収すると BR と同様に異性化反応が起こる一方、RSB から  $H^+$  は解離せず、その代わりに  $Cl^-$  自身が図 3a で上向きに移動する。外向き水素イオンポンプと内向きクロライドイオンポンプという全く異なるロドプシンの機能が、図 3a の  $X^-$  だけで説明できる。実際に両者のアミノ酸は 25% しか一致しないが、筆者らが 20 年前に BR の Asp85 を中性化したところこの変異体は  $Cl^-$  をポンプした<sup>6)</sup> ことから、両者には共通なメカニズムが存在するものと考えられる。

ロドプシンは  $Cl^-$  やより重い  $I^-$  をポンプできるように、ポンプできる陽イオンは永らく  $H^+$  だけであった。なぜ  $H^+$  以外の陽イオンポンプが存在しないのかについて疑問に思われるかもしれないが、光吸収を担うレチナールが正電荷を持つため  $Na^+$  などはレチナール近傍に結合できず、結合できなければ光のエネルギーを使って輸送できないと考えられてきた。筆者は講演などで  $Na^+$  ポンプが存在しない理由を RSB 部位の静電相互作用により明快に説明していたのであるが、BR の発見から 40 年以上経過してから海洋細菌に光駆動ナトリウムイオンポンプの存在がわかった (図 1)<sup>3)</sup>。筆者らはそれまでアミノ酸の変異により天然に存在しない  $Na^+$  ポンプを創成しようと考え、失敗していたのであるが、自然は海の中にすでに創り上げていたのである。

ではどうやって光駆動ナトリウムイオンポンプは機能するのだろうか。外向き  $Na^+$  ポンプは BR の Asp85 の位置が中性化されている一方、少しずれた

位置にアスパラギン酸 (Asp116) が存在し、RSB と電荷対を形成する。最初の論文で  $Na^+$  結合部位を見つけたが、予想通り、正電荷を持ったレチナールの近傍にはなく、出口側部位に存在していた<sup>3)</sup>。ところが驚いたことに結合部位を変異で欠損させても  $Na^+$  ポンプ機能は保たれていた。輸送にエネルギーを必要とするポンプはイオンを内部に結合している状態でエネルギー入力と共役して輸送する例がほとんどであり、効率的なエネルギー変換のためには必須であろう。しかしながら、 $H^+$  や  $Cl^-$  を輸送するロドプシンと異なり、 $Na^+$  を結合していなくてもポンプできるのだ。この事実から筆者らは、 $Na^+$  を細胞内から取込む過程は拡散により支配される受動的なものと解釈している (図 3b)。 $Na^+$  が取込まれると RSB 近傍に過渡的に結合するが<sup>7)</sup>、 $Na^+$  と  $H^+$  が競合するモデルで取込みがよく説明できることは受動的な輸送過程を支持している<sup>8)</sup>。 $H^+$  ポンプから進化の中で競合して  $Na^+$  をポンプする装置をつくり、それが  $400mM Na^+$ , pH8 という海の中で 7 桁多い  $Na^+$  をポンプするようになった可能性がある。

光駆動ナトリウムイオンポンプは  $Li^+$  も一方向に輸送できるが、 $K^+$  や  $Cs^+$  中では  $H^+$  を輸送する<sup>3)</sup>。既述の通り、細胞内には  $K^+$  が多いため、 $Na^+$  だけをポンプして  $K^+$  の濃度勾配を変えないという事実は理に適っている。一方、 $Na^+$  の方が  $K^+$  よりも水和力が強いので、水和イオンサイズは  $Na^+$  の方が大きいことに注意が必要である。この事実は、 $Na^+$  の

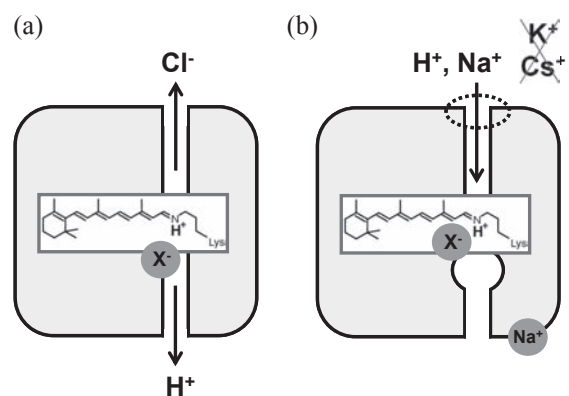


図 3 光駆動イオンポンプのメカニズム

(a) 光駆動水素イオンポンプとクロライドイオンポンプの概念図。レチナール近傍の負電荷 ( $X^-$ ) は前者でアスパラギン酸、後者で  $Cl^-$  である (b) 光駆動ナトリウムイオンポンプの概念図。 $Na^+$  はレチナール近傍に結合せず、光反応の過程で細胞内から取込まれ、レチナール近傍に過渡的に結合する。イオン選択性を決定する部分は取込み口に存在する (点線の丸印)

一方向輸送において必ず脱水和が起ることを示唆している。ではタンパク質内部で水分子を引き剥がし、直径 1.9Å の Na<sup>+</sup> を通して 2.8Å の K<sup>+</sup> を通さない選別部位はどこにあるのだろうか。筆者らは東京大学・濡木研究室と共同で X 線結晶構造解析を行ったところ、イオン取込み部位に狭くなっている部分を見出したため、この部位に変異を導入した結果、K<sup>+</sup> をポンプするタンパク質が見つかった。

#### 4 カリウムイオン、そしてセシウムイオンの輸送へ

光駆動カリウムイオンポンプの創成は *Nature* 誌の Article 掲載に大きな貢献をしてくれた<sup>9)</sup>。すなわち、酸性と中性の 2 種類の X 線結晶構造解析により、H<sup>+</sup> を受け取った Asp116 (図 3b の X<sup>-</sup>) が向きを変えることで Na<sup>+</sup> の取込みを実現するモデルを *Nature* 誌に投稿した際に、光遺伝学 (optogenetics) 応用に関連したさらなる成果が求められたのである。光遺伝学とはロドプシンを脳神経などに発現することで細胞や個体レベルの「光操作」を行う新しい技術である<sup>10)</sup>。細胞内濃度が高い K<sup>+</sup> を一方向に輸送するタンパク質の創成は光遺伝学からも大きな期待をされており、イオン取込み口の狭くなっている部分の構造を改変することで光駆動カリウムイオンポンプの創成を実現することができた (図 1)<sup>9)</sup>。

光駆動カリウムイオンポンプの創成は大きなインパクトを与えたのであるが、K<sup>+</sup> より大きな Rb<sup>+</sup>、Cs<sup>+</sup> の一方向輸送は生命科学者に全く関心を持たれなかった。これらのイオンは脳機能に関係ないからであるが、筆者らは福島原発で使えるかもしれない、という思いを持ちながら研究を継続した。イオン取込み口の狭くなっている部分を構成する 2 つのアミノ酸はアスパラギンとグリシンであり、これをプロリンとトリプトファンに変異させることでカリウムイオンポンプを実現したわけであるが<sup>9)</sup>、アミノ酸は 20 種類あるので 400 通りの組み合わせがありうる。網羅的に研究を進める中、ロイシンとフェニルアラニンの組み合わせによる変異体で、Rb<sup>+</sup> と Cs<sup>+</sup> の一方向輸送を達成することができた (図 1)<sup>1)</sup>。イオンサイズを見分けるメカニズムはよくわかっていないが、2 つのアミノ酸の体積の和とポンプ効率に正の相関があることから、大きなイオンを通すた

めには大きなアミノ酸を導入することで局所構造を壊すことが重要であると考えている。

#### 5 今後の展望

4 年前の光駆動ナトリウムイオンポンプの発見<sup>3)</sup> という 2 つ目のブレークスルーがきっかけとなり、光のエネルギーを用いて Cs<sup>+</sup> を一方向に輸送するタンパク質を創成することができた<sup>1)</sup>。このタンパク質は細胞内から細胞外へと一方向輸送するポンプであるが、膜タンパク質を膜小胞に反転させる技術は確立しているので、反転小胞を用いることで光のエネルギーを用いて放射性セシウムを回収することが原理的に可能となる (図 4)。吸着による回収とは全く発想の異なる新しい原理であるが、実用化に向けては様々な課題がある。例えば、筆者らが創成したタンパク質は、セシウム中で Cs<sup>+</sup> を一方向に輸送するが、Cs<sup>+</sup> に対する選択性を達成したわけではない。実際にこの変異体は Na<sup>+</sup> をより高い効率でポンプするため、イオンが混在する環境では、Na<sup>+</sup> の方を回収してしまうことになる。Cs<sup>+</sup> の選択性は取込み口に存在する部位の改変だけでは難しく、RSB 近傍などの構造を Cs<sup>+</sup> に向けて最適化することが必要となるだろう。真に使える技術にするためにはさらなる努力が必要であるが、光とタンパク質を使った全く新しい発想のセシウム回収原理を深く理解す

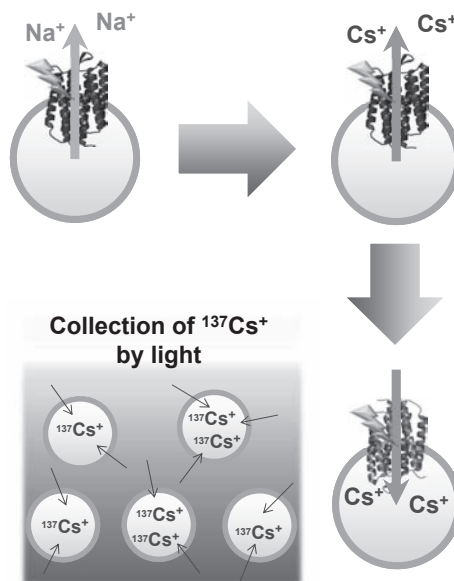


図 4 光駆動セシウムイオンポンプの創成と放射性セシウムの能動的回収への道

るため、筆者らは今後も、生物物理学・分子科学の立場から研究を続けたいと考えている。

本研究は当研究室の井上圭一准教授と今野雅恵博士により達成された。特にイオン選択性を決定する部位が取込み口にあるという予想は筆者の思いもよらなかったものであり、その慧眼とCs<sup>+</sup>ポンプ開発までの努力に深く感謝したい。また加藤善隆博士をはじめとする研究室メンバー、東京大学の濡木理教授、加藤英明博士をはじめとする共同研究者の先生方に深く感謝いたします。

## 参考文献

---

- 1) Konno, M., *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.*, **7**, 51-55 (2016)
- 2) Oesterhelt, D., *et al.*, *Nat. New Biol.*, **233**, 149-152 (1971)
- 3) Inoue, K., *et al.*, *Nat. Commun.*, **4**, 1678 (2013)
- 4) 神取秀樹, *生物物理*, **55**, 291-298 (2015)
- 5) Ernst, O., *et al.*, *Chem. Rev.*, **114**, 126-163 (2014)
- 6) Sasaki, J., *et al.*, *Science*, **269**, 73-75 (1995)
- 7) Inoue, K., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 11536-11539 (2015)
- 8) Kato, Y., *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.*, **6**, 5111-5115 (2015)
- 9) Kato, H. E., *et al.*, *Nature*, **521**, 48-53 (2015)
- 10) 神取秀樹, 他, オプトジェネティクスー光工学と遺伝学による行動抑制技術の最前線, エヌ・ティー・エス (2013)