

2015年5月22日

分子研研究会

「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」報告記

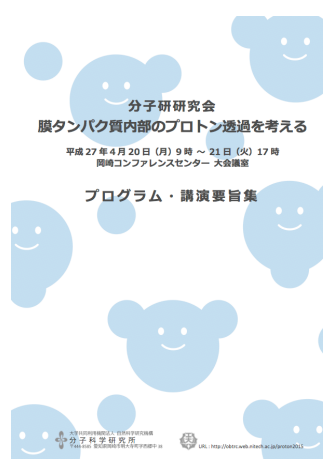
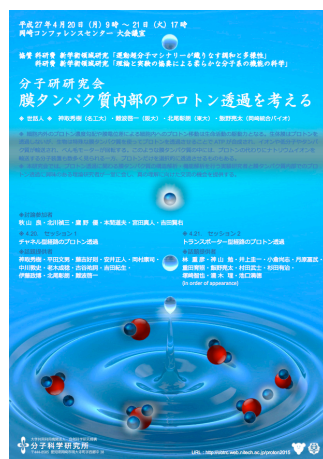
塚崎智也（奈良先端大）、寺原直矢（大阪大）、森本雄祐（理研）
写真提供：神取秀樹（名工大）

プロトン駆動のバクテリアべん毛モーターでは H_3O^+ でも e^- でもなく、 H^+ が実際に流れていると考えられていますか？もしそうだとすると、直接の証拠は何でしょう？「 Na^+ 駆動のものがあるから」は“直接”の証拠ではありません。べん毛研究の初期に議論されていたようですが私は知りません。

宮田

2014年10月16日、Facebook へのこの書き込みがすべての始まりでした。

この宮田先生の素朴な疑問が、プロトンを透過するタンパク質で最も研究が進んでいるバクテリオロドプシンの専門家である名工大の神取先生に火を付け、いろいろなところに飛び火している間に一度集まって議論した方が良いとの考えから、平成27年4月20～21日の2日間、114名ものプロトン研究者が岡崎コンファレンスセンターに集まって熱い議論が交わされました。筆者（塚崎）は、12月6日に世話人の一人である神取先生から発表の依頼を受け、プロトンということで SecDF の構造機能解析を話題として提供することにしました。なかなか学会でも同時に集結しないであろう研究者方々の参加を伺い、私もこのメンバーの中の一人として発表の機会をいただいたことは大変光栄でした。会議自体は、昨年分子研に研究室を開かれたばかりの飯野先生が分子研の研究会という形でオーガナイズしてくださり、新学術「運動マシナリー」と「柔らかな分子系」の協賛での開催となりました。ちなみに本研究会のポスターをどこかでご覧になられましたか？研究会の名前もそうですが、ポスターの美しさに引き込まれた方も多いと思います。筆者（寺原）もその一人ですぐに参加しようと決めました（注1）。要旨集もとてもキュート(>_<)/



本研究会のポスター（左）と要旨集表紙（右）

プロトンは様々な生命活動に利用されます。構造生物学の研究により、プロトンの透過機構が明らかになってきたと思えます。しかし、プロトンが実際にどのような形で輸送されるのかはまだ議論の余地があります。そこで本会議では、“膜タンパク質内部をプロトンが流れる”という表現で表される現象が起こる際、実際に流れているものは H^+ なのか H_3O^+ なのか？このとき Grotthuss 機構（注2）はどれだけ寄与しているのか？ OH^- は通すのか？というところが議論の中心となりました。この議論を実験、構造、理論の各分野の専門家が集まって行ったわけです。短い期間の呼びかけでこれだけの顔ぶれがよく揃ったものであるという感じでした（注3）。「プロトンの透過を考える」という会議でしたが、プロトンという枠を超えた幅広い分野の先生が参加され、思いがけない鋭い質問も多く、質疑応答が盛り上がりました。また、単なる成果発表ではなく「話題」という形で講演されたこと、十分にディスカッションの時間が設けられたことにより、議論を通して一つの発表内容を深く考えることができました。ポスター発表も 29 題あり、会場のホールの出入り口付近での発表でした。そのためポスターを目にする機会も多く、休憩時間帯にもポスターで活発な議論がなされていたのが印象的でありました。



驚いたのは、これだけ著名な忙しい先生方にお声がけをしたのですが、全員が討論参加を快諾してくださったことです。よい討論ができると確信しました。——神取秀樹

1 日目は神取先生を皮切りに、チャンネル型経路のプロトン透過についての議論がなされました。最近流行りの光遺伝学で使われるチャンネルロドプシンは、光刺激によってナトリウムチャンネルという理解が広まっているが、実際には $H^+/Na^+=1,000,000$ という比であり、ナトリウムも流せるプロトンチャンネルという表現のほうが正確らしいです。また、バクテリオロドプシンは、外向きプロトンポンプではなく、内向き OH^- ポンプであるという考えも完全には否定されていません。名大の藤吉先生は、バクテリオロドプシンの入り口表面は負に帯電することでプロトンをキャッチしやすくし、逆に出口は正に帯電することでプロトンをリリースしやすくする機構が備わっているプロトンポンプであることを構造の側面から指摘されました。さらに藤吉先生は、ご自身の水チャンネルの研究を取り上げられ、水チャンネルの内部の通り道には水分子の酸素と水素結合する複数のカルボニル基が存在し、水

分子が存在しやすい場所を提供していることを説明されました。さらに、通り道には NPA モチーフと呼ばれる水分子間の水素結合を断ち切るように水分子が配向される位置があり、この機構が水素結合のネットワークを通して透過するプロトンを塞ぎ止めていることをみごとに説明されました。蛋白研の中川先生は、電位依存性プロトンチャンネルでは、分子内部に疎水性環境を作ることで水分子の侵入を防ぎ、水素結合のネットワークを通して透過するプロトンのリークを防ぐ機構を説明されました。また、立命館大の平田先生は、インフルエンザウイルスが持つプロトンチャンネル (M2 チャンネル) の MD および 3D-RISM 計算を行い、チャンネル内部のプロトンの分布を調べた結果、ヒスチジン残基を介したプロトンのグロッタス機構の存在を示唆しました。これらのお話から、水素結合ネットワークを介して起こるグロッタス機構が基本的なプロトンの透過機構であると考えられますが、東大の北尾先生のお話からすると、べん毛モーターでは H_3O^+ が流れているようであり、グロッタス機構だけでは無いのかもしれませんが。

懇親会は、北川禎三先生と吉田賢右先生の挨拶で始まりました。北川先生は「分子研でこのようにタンパク質を扱う日が来るとは思っていなかった。数十年後の予測はなかなかつきませんでした。まだまだ未開の領域があります。」という内容を話されました。筆者(塚崎)は研究に携わってわずか十数年であります。当該分野である膜タンパク質の構造生物学がここまで発展してくるとは思ってもみなかったです。構造生物学では、ダイレクトディテクターの登場などによって電子顕微鏡での分解能が向上した解析やX線電子レーザーを用いた解析も数多く報告されるようになってきました。今後、未知なる測定方法が出てくると思うと胸が高鳴ります。吉田先生は「最近の傾向としてすぐに研究に価値(値段)をつけたがる傾向がありますが、本日は本当に基礎研究が好きな研究者が集まっています。基礎研究の重要性を訴えられ、重要かつ基本的な課題に取り組んでほしい。」という趣旨のお話をされました。筆者(塚崎)の個人的な意見ではありますが、大学の予算が年々厳しくなっているように感じます。新しく創造的な発見を行うためには、多少資金にゆとりがあるほうが良いのは間違いないと思います。しかし、現状では資金獲得のために、吉田先生の言われる「研究の価値」の高い研究をせざるを得ません。このような状況では本当の基礎研究は育ちにくく私自身は危機感をもっております。



宮田先生と神取先生@懇親会

美味しいお料理とお酒で、楽しいひとときを過ごしました。

2日目はトランスポーター型経路のプロトン透過についての議論がなされました。まずは京産大の吉田先生がトランスポーター全般に共通する基本的な考え方を「高低差のある運河」を例にお話されました。トランスポーターには入口と出口の2つのゲートが存在し、「基質入ります」→「入口閉じます」→「出口開きます」→「基質出ます」→「出口閉じます」→「入口開きます」の一連のゲートの開閉機構が基質によって制御されることを説明されました。このとき、タンパク質内部のアミノ酸の酸解離定数 (pK_a) がプロトン透過に重要であることをご指摘されました。生体分子内部のアミノ酸に関しては pK_a を実験的に求めることは難しく、MD 計算では電荷等のパラメータに依存することが多いなどの問題もあって、正確な pK_a の測定および計算手法が求められています。京大の林先生は計算科学の観点から、名大の神山先生は構造の面から、タンパク質内部の水分子の配置によるプロトン受容基の pK_a の変化がプロトン透過に重要であることお話しされ、 pK_a の重要性をご指摘されました。また、兵庫県立大の月原先生、小倉先生は、チトクロム酸化酵素において一連のプロトン透過現象がゲートやプロトンの通り道、プロトンプール、プロトンセンサーなどの部位がプロトンの情報（プロトンが今どこにいて何個いる？など）を共有し、連携してプロトン透過を行っていることを分光学的手法および構造学的知見から説明されました。プロトン受容基の pK_a で制御されるプロトンとそこから発せられるプロトン情報、その情報をもとに動くゲート。生物の作り出す運河もとても美しい！！



高低差のある運河。まさにトランスポーター！！（注4）

お昼ご飯はどうしたかって？筆者ら（寺原、森本）は岡崎市名物のまぜ麺（注5）を駅前まで食べに出かけました。食べ応えのある濃い目の味でありながら、後味はしつこくない。ただ「締めに雑炊どうぞ」という誘惑に負けた森本は、麺を食べたかお米を食べたか分からなくなっていた。

会議の最後に行われた総合討論では、本会議のまとめを共有しました。「基本的には Grothuss 機構によってプロトンは輸送されると考えられる。」
「プロトンの輸送には必須のカルボン酸が存在する。」
ということはどのタンパク質にも（今のところ）共通しています。ただ、一番の収穫は、

「膜タンパク質内部のイオン輸送が議論できる時代となった。」ということですよ。

そして、今後どのような研究や方向性が必要なのかというところに意見が多く出されました。やはり一番知りたいところは、プロトンはどこにいるのか？ということであり、精度よくプロトン化状態を把握したいというものです。現状で可能性が高そうな手法としては、中性子線、分光、 pK_a 計算といったところがありますが、飯野研の中村先生がポスター発表されていた中性子構造解析に大きな期待が寄せられていたように感じました。また、京産大の吉田先生が、「計算科学の向上が今こそ必要であり、実験科学の証明だけでなく、予言をして欲しい。」ということをおっしゃっていました。実験科学がバックグラウンドの吉田先生がこのように言われることは、計算科学をやっている先生方へは強い励みになったであろうと思います。名大の本間先生からは「進化的なことを考えた場合、海から生命が生まれたとすると、やはり Na^+ が先だろうか。どちらにしても実験的には Na^+ の方が扱いやすいので、是非 H^+ と並行し研究を行うことで、理解を深めていって欲しい。」という趣旨のコメントがされました。同じ機能を果たすタンパク質でも H^+ 駆動型と Na^+ 駆動型の2つが存在する場合も多く、進化的に H^+ 利用が先なのか Na^+ 利用が先なのか興味深い点があります。もし Na^+ と H^+ が単なるイオンの通りやすさの違いによってでてくるのであれば、 Na^+ の方が実験として扱いやすいので、 H^+ の透過の理解のために Na^+ を利用することも選択肢として良いと考えられます。ただし、 H^+ と Na^+ は誘電率等の物性も大きく異なるため、そのような単純な理解で良いのかについては、さらなる解析が必要です。最後に名工大の井上先生からは、今後は XFEL (注6) の進展に期待しているというコメントがされました。最近では GPCR の微結晶の構造解析に応用できているそうです。XFEL の利点は、溶液中でのダイナミクス的な構造を見ることができるところでもありますので、やはり今後の発展には多くの方が期待されているようでした。



総合討論の様子

私たち研究者は仮説をたて、実験で仮説を実証しようとしているが、実験においてすべてが分かることはありません。物理学の分野では理論先行型で、計算結果の一部を立証できればその計算すべてが等しいといえるという研究スタイルもあります。生物学において、理論的な予言はまだまだ難しいところではあるが、物理学の分野のように理論先行型で証明すべき現象の予言ができるように、生物学を導いていくことを期待します。これが理論ならびに計算科学への今後の期待です。

——あとがき——

(塚崎) この原稿の依頼時に、意見を自由に書いて下さいと言われましたので、本当に自由に記載致しました。日本でプロトンの透過に関して、このような規模の会を催すことができる層の厚さに驚きました。今回、世話人の先生方と会の運営をサポートして下さった学生のみなさん、本会は視野を広げる良いディスカッションと意見交換の貴重な場となりました。すばらしい機会をありがとうございました。

(寺原) どのようにイオンが流れ、その情報がどのように処理され、次のアクションに繋がるのか。これまでただ単に「イオンチャネルとして機能し、…」と浅はかな説明をしていたのがとても恥ずかしく思います。「何も分かっていない」じゃなくて「より深く考えていない」のかもしれないと今回の会議で痛感し、反省しました…。そして、イオンチャネルを含む膜タンパク質の面白さを改めて感じ、大変勉強になりました。機能、構造、そして理論が協力すれば、どんな難しい膜タンパク質でも乗り越えられる気がしました（少なくとも私は感じました）。このような貴重な研究会に巡り会えたことに大変嬉しく思い、神取先生をはじめとする世話人の先生方および学生のみなさん、そして宮田先生の最大にして最高の質問、ありがとうございました。

(森本) 結論として、膜タンパクをプロトンがどのように流れているのかは、結局まだよくわからないということです。しかし今回の会議で実験、理論の両サイドから現状の把握をできたことは非常に有意義であり、今後の課題も明確になったように思いました。逆に考えますと、プロトンを流す膜タンパク質というよく知られた存在で、これだけ多くのすごい先生方が研究されているのに、何がどう流れているかさえわかっていないということに、改めて研究のやりがいと面白さを感じました。今回の会は、イオンが流れるタンパク質を研究している人には、非常にためになる、楽しい会でした。お世辞とかではなく、今回の会を開くきっかけを作って頂いた宮田領域代表には深く感謝いたします。

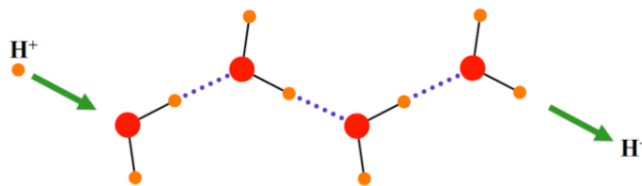
——注意しなくていい注釈（☆グロッタス機構はぜひ知っておいて下さい☆）——

（注1）筆者（寺原）はナトリウムイオンチャンネルを扱っていたので、世話人の一人である難波先生（筆者の研究室の教授）にナトリウムイオンでも良いかと聞くと、難波先生「プロトンじゃなくてもええよ。なんでもええよ。」

寺原「えっ、なんでもいいのですか…。」

聞かなければよかった…。でも、無事参加することができて良かった。

（注2）水中での1価の陽イオンの伝導度は、イオンサイズが小さくなると低くなるが、プロトンだけは何故か非常に大きい電導度をもつ。これを説明するのがグロッタス機構であり、水素結合を介してプロトンがリレー移動するというものである。



神取先生の要旨より

（注3）参加者はこちらを参照。<http://obtrc.web.nitech.ac.jp/proton2015>

（注4）筆者（寺原）が個人的に好きな富山県富山市にある富岩（ふがん）運河。上流一下流間の高低差2.5 mを2つのゲートで調節して通行する。昭和9年に作られた貴重な施設で、今でも実際に船に乗って体験することができる。

（注5）岡崎まぜめんとは？<http://okazaki-mazemen.jimdo.com/>
基本スープ無しですが、魚介豚骨ベースの八丁味噌スープも最高です！岡崎にいらしたときはぜひ☆ちなみに岡崎のコンファレスセンター付近には、食べる場所が多くないため、お弁当持参も選択肢のひとつ。

（注6）X線自由電子レーザーのこと。日本には播磨でSACLAが稼働中である。徐々にではあるが、生体試料への実際の応用結果が報告されてきている。

