

光受容タンパク質ファラオニスフォボロドプシンの光化学反応

学位論文内容の要旨

ファラオニスフォボロドプシン (ppR) は古細菌 *Natronobacterium pharaonis* の細胞膜に存在し、レチナールを発色団として内包する光受容タンパク質 (レチナールタンパク質) の一種である。ppR はこの細菌の光刺激に対する走性 (走光性) を司る光センサーとして機能している。古細菌のレチナールタンパク質には大きく分けて ppR の様に光情報伝達を行なうものと、光駆動型プロトンポンプとして広く知られているバクテリオロドプシン (bR) の様に光エネルギー変換を行なうものが存在するが、アミノ酸配列や立体構造の相同性が非常に高いこれらのタンパク質が全く異なる機能を持つことは、構造と機能の観点から大変興味深い事実である。また、すべての古細菌型レチナールタンパク質は光受容後、発色団の異性化に続き構造や吸収波長の異なる複数の光中間体を経て基底状態に戻るサイクリックな光化学反応 (フォトサイクル) を示し、この間に各機能を発現する。bR については、プロトン輸送機構や光中間体の立体構造などがこれまでに詳細に研究されてきた。一方、光センサーとして機能するレチナールタンパク質については、菌体での発現量や安定性などの問題から研究が比較的遅れており、古細菌型レチナールタンパク質の機能分化機構を理解するには至っていない。本研究では、大腸菌での発現が可能で比較的安定性の高い ppR を光センサーのモデルとして用い、機能発現時に示すフォトサイクルを、分光学的、または電気化学的な手法などにより詳細に解析した。そして、光センサーに特徴的な分子内現象、またはそれに関与するアミノ酸残基を特定し、古細菌型レチナールタンパク質の機能分化機構を推察することを目的とした。具体的に、光センサーはシグナル伝達に関与する中間体構造を維持するために遅いフォトサイクルを、光駆動型イオンポンプは単位時間当たりのイオン輸送効率向上のために速いフォトサイクルをそれぞれ示すが、両者のフォトサイクル速度の違いはどのような分子機構によって生み出されているのか？そして、光センサーの機能発現時の構造変化には、光駆動型イオンポンプと比較してどのような特徴があるのか？という観点から解析を進めた。

ppR と bR のアミノ酸配列を比較すると、bR のフォトサイクル中の分子内プロトン移動に重要なアミノ酸残基のいくつかは、ppR では保存されていない。そこで、これら分子内プロトン移動に重要なアミノ酸残基を ppR に導入した変異体を作製し、そのフォトサイクル速度に及ぼす影響を解析した。その結果、両者のフォトサイクル速度の違いは、MやOと呼ばれる光中間体崩壊過程での分子内プロトン移動速度の違いに由来することが明らかになった。そして、各光中間体の崩壊過程では、以下に示す分子機構により速度の違いが生み出されていると考えられる。まず、ppR の 86 番目の位置に、M崩壊過程で活性中心シッフ塩基へのプロトンドナーとなる bR の Asp96 に対応する様な酸性アミ

ノ酸残基が無いこと、さらに、そこからシッフ塩基までのプロトン移動経路となる水素結合ネットワークが bR の様に存在しないため、細胞質側領域のプロトン移動速度が非常に小さいことが、ppR の遅い M 崩壊の原因となっている。また、ppR の細胞外側表面付近の 182、183、そして 194 番目の位置に解離性または極性アミノ酸残基が無いことによって、Asp75 からその領域へのプロトン移動が bR より起こりにくく、O 崩壊速度の低下をきたす原因の一つとなっている。これらの結果は、光センサー ppR のフォトサイクルにおいても、光駆動型プロトンポンプ bR と同様の分子内プロトン移動が起きている可能性を示唆するものであった。そこで次に、ppR を膜に発現した大腸菌から反転膜ベシクルを調製し、光照射に伴う ppR のプロトン輸送能を検討した。その結果、ppR もフォトサイクル中に細胞質側から細胞外側へのプロトン輸送活性を示すことが明らかになった。さらに、SnO₂ 電極を用いたフォトサイクル中のプロトン授受機構の解析や、タンパク質中心部のシッフ塩基と、そこから細胞外側方向へ約 14 Å 離れて位置する Asp193 との相互作用解析から、シッフ塩基から細胞外側領域へは分子内相互作用ネットワークが存在し、bR と同様、このネットワークを介してフォトサイクル中に分子内環境変化が伝播することが示唆された。

また、ppR がフォトサイクルで示す構造変化について、以下の検討を行なった。まず、シッフ塩基と反応する水溶性試薬を用い、両者の反応性を解析した。その結果、基底状態と比較して M 中間体のシッフ塩基との反応性が著しく高かった。つまり、ppR の M 中間体では、タンパク質外部からタンパク質中心部のシッフ塩基まで水溶性試薬が到達可能な状態に構造変化しており、bR で知られているフォトサイクル中のヘリックス細胞質側の開きに対応した動きが、ppR でも存在する可能性が示唆された。また、フーリエ変換赤外分光法によって、光中間体の赤外吸収スペクトル解析を行なった。測定には F86D、E 変異体を用い、野生型スペクトルとの比較を行なったところ、ppR の細胞質側領域の特に 86 番目のアミノ酸残基周辺がフォトサイクル中に示す構造変化は、bR と類似していることが示唆された。

以上の研究から、フォトサイクル中の分子内プロトン移動は、古細菌型レチナールタンパク質に共通して備わった性質であることが明らかになった。また興味深いことに、機能が全く異なる古細菌型レチナールタンパク質においても、それぞれの機能を発現するために利用しているタンパク質構造変化は共通していることが示唆された。そしてこの構造変化の制御には、分子内プロトン移動速度が重要な役割を果たしていると考えられる。具体的に ppR では、本研究で着目した様な、細胞質側領域や細胞外側表面付近におけるアミノ酸残基の bR との違いが、光センサーに特徴的な遅いフォトサイクルを示す主要因であり、シグナル伝達に関与する光中間体構造の維持に貢献しているものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 茂 直 樹

副 査 教 授 稲 垣 冬 彦

副 査 助 教 授 森 岡 弘 志

副 査 助 教 授 三 宅 教 尚

学 位 論 文 題 名

光受容タンパク質ファラオニスフォボロドプシンの光化学反応

バクテリアのロドプシン（古細菌型レチナールタンパク質と称せられる）は大きく4種類が知られている。それらはバクテリオロドプシン（bR）、ハロロドプシン（hR）、センソリーロドプシン（sR）、およびフォボロドプシン（pR）である。これらは全て一次構造が明らかにされており、お互いに相同性が高い。また、立体構造もよく似ており、7本の膜貫通ヘリックス（A～G）から成り、Gヘリックスの膜の真中あたりに位置するリジン残基に、レチナールがシッフ塩基を介して結合している。しかしながら、これら4種のレチナールタンパク質は機能分化が起こっている。すなわち、bRは光駆動プロトンポンプ、hRは光駆動塩化物イオンポンプ、sRとpRは菌の光に対する行動（走光性）の光センサーである。bRの1残基を変異させると塩化物イオンポンプ、つまりhRになることが知られている。しかし、それ以外の「変換」は知られていない。残基置換による機能変換も興味ある実験であるが、申請者が着目したのは、これらタンパク質の光化学反応の類似性である。ここで光化学反応とは、レチナールタンパク質が光を吸収した時に示す反応で、光照射前（基底状態）とは構造や吸収波長が異なるいくつかの中間体を経由し、基底状態に戻るというものである。この間に、各タンパク質の機能が発揮される。申請者は、光化学反応の類似性から、光照射に伴ってタンパク質分子内でプロトンの移動があるのではないかと、そして、このプロトン移動がbRでは直接的に輸送され、hRでは塩化物イオン輸送に変換され（機構はよく分かっていない）、センサーでは構造変化に変換されているのではないかと、という発想から研究を進めている。つまり、少数のキープアミノ酸残基があり、この変異によって、光照射によるプロトン化シッフ塩基からプロトンが移動する反応を、巧みに使い分けているのではないかというアイデアの検証である。申請者は研究材料として、pRと同じ機能を持つが、より安定で、かつ大腸菌で大量発現が可能であるファラオニスフォボロドプシン（ppR）を選び、これまでによく分かっているbRの光化学反応との類似点、相違点を明らかにしようとした。

本学位論文は、3つのパートに分けることができる。まず、bRとppRの光化学反応を比較した時、生成する中間体は類似しているものの、その速度は大

大きく違い、ppR では bR の数百倍も遅い点に着目している。生理的には、bR は単位時間当たりの回転数を稼いで効率よくプロトンを輸送し、ppR はシグナル伝達活性型の間体を維持するという点で意味があるが、このような速度制御のキーアミノ酸残基を決めようと試みた。分子内プロトン移動速度が律速であるというアイデアから、bR にあつて、ppR には保存されていないタンパク質内部の極性、または酸性アミノ酸残基がそれであると予想し、ppR の変異体をいくつか作製した。これら変異体について、フラッシュフォトリシス法で光化学反応の速度解析を行った結果、予想したアミノ酸残基の違いが、光化学反応の速度制御に重要であることが明らかになった。

次に、ppR の光化学反応中に、分子内プロトン輸送が起きている直接的な証拠を得ようとした。このために、高感度に pH 変化を検出できる SnO_2 電極を用いて、光化学反応中にタンパクから出入りするプロトンの直接検出を行った。結果、ある条件では、bR と全く同様にプロトンを出し入れしていることが分かった。ある条件というのは塩化物イオン存在下であるが、非存在下では異なるプロトンの出入りを示すことが分かり、申請者はこの結果から実験を発展させて、ppR の特定部位へ塩化物イオンが結合する可能性も指摘した。

また、光化学反応中の構造変化について、中間体の赤外吸収スペクトル測定から検討を行っている。この解析から、ppR の特に細胞質側領域で起こる構造変化が、bR のそれと類似していることが分かり、光駆動プロトンポンプと光センサーは、ほぼ同じ構造変化から別々の機能を引き出しているという、非常に興味深い可能性が考えられた。一方で、bR が示すある特定の間体構造を ppR は示さず、それぞれの機能発現を最適化する仕組みの存在も同時に示唆された。

以上のように、本研究は光受容タンパク質の機能発現機構について様々な実験手法を駆使して詳細に検討したものであり、薬学博士の称号を授与するにふさわしいと判定した。