

学位論文題名

フォボロドプシンと共役蛋白質との
膜蛋白質間相互作用・光情報伝達機構

学位論文内容の要旨

本論文は、ファラオニスフォボロドプシン (ppR) と共役蛋白質 (pHtrII) の膜蛋白質相互作用を基底状態・中間状態において、生化学的、分光学的、物理化学的な方法を用い解析を行った結果をまとめたものである。

人をはじめとした様々な生物種においてゲノム解析が行われてきている現在において、ゲノム情報をもとに作られる種々の蛋白質がどのような機構のもと機能を発揮しているのかを解明することが、生物学の主目的となっており、今後もなっていくと考えられる。細胞膜に発現する膜蛋白質は、全ゲノムの約3割を占め、外界との情報や物質のやり取りを行うなど生命活動の維持に極めて重要な蛋白質群である。しかしながら実験材料としての取り扱いづらさから、可溶性蛋白質にくらべ、機能発現機構の理解が極めて遅れている。

古細菌の一種である *Natronobacterium pharaonis* には熱・酸・アルカリに強い7回膜貫通型蛋白質、ppRが存在し、2回膜貫通型蛋白質、pHtrIIと細胞膜中で複合体を形成している。筆者はこの高い安定性と光により機能発現の on-off を制御できるという特徴から、膜蛋白質間の情報伝達機構を分子レベルで解明できる数少ない系であると考え、ppR/pHtrII を介した情報伝達系に着目し研究を行った。膜中で複合体を形成する ppR/pHtrII 複合体に ppR の極大吸収波長である 500 nm 付近の光が照射されると、ppR の発色団レチナールが異性化を起こし、K、M、O と呼ばれる光中間体を経てもとにもどる「photocycle」という反応が起こる。M 中間体の寿命の変化に伴い、pHtrII の活性化の程度が変化することから M 中間体が活性型中間体の1つであると考えられている。この情報伝達機構を一連の流れ（ダイナミックス）として理解するためには、ppR/pHtrII 複合体の基底状態及び光中間体時における相互作用・構造変化を解析することが重要であると考えられる。

本研究では、初期不活性化状態を理解する上で「基底状態」、活性化へとつな

がる初期構造変化の解析として「K 中間体」、活性化機構の理解のために「M 中間体」、活性型から不活性型への構造変化過程の解析として「O 中間体」に関して ppR と pHtrII 間の相互作用及び構造変化の解析を行った。その結果、ppR/pHtrII 複合体の化学量論比（約 1）や解離定数（約 $0.1 \mu\text{M}$ ）を算出することに成功し、ppR の活性化に伴って構造変化を起こし、pHtrII との結合親和性が大きく低下（ $0.1 \mu\text{M} \rightarrow 15 \mu\text{M}$ ）することを明らかにした。この解離定数の変化は、おもに pHtrII^{G83-Q149} の ppR からの解離に由来することを示唆する結果を得た。

また相互作用・構造変化に重要なアミノ酸残基（Tyr199^{ppR}、Asp193^{ppR}、pHtrII^{G83-Q149}、Asn74^{pHtrII}、Thr204^{ppR} など）を同定することに成功した。これらの結果及びこれまで報告されている結果を踏まえ、1) ppR が活性化されると E-F ループ部分が構造変化を起こす。2) E-F ループと相互作用している pHtrII^{G83-Q149} が ppR から解離する。3) 下流のシグナリングドメインの相対配置の変化をもたらす。これら 1～3 の一連の流れにより光情報を伝達するという「linker switch model」を提唱した。

さらに pHtrII に水溶性 tag を付加することで、pHtrII を膜蛋白質のモデルとした新規無細胞膜蛋白質合成系の開発にも成功した。これらの研究成果から、ppR/pHtrII を介した光情報伝達系は、膜蛋白質を介した情報伝達機構の中で最も理解の進んでいる系の 1 つとなった。

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	宮内正二
副査	助教授	森岡弘志

学位論文題名

フォボロドプシンと共役蛋白質との 膜蛋白質間相互作用・光情報伝達機構

本論文は、ファラオニスフォボロドプシン (ppR) と共役蛋白質 (pHtrII) との細胞膜内での蛋白／蛋白間相互作用を、生化学的、分光学的、物理化学的な方法を用い解析を行ったものである。ppR はレチナールを発色団とする 7 本の膜内ヘリックスをもつ膜蛋白で、高度好塩菌の 1 種である *Natronobacterium pharaonis* の負の走光性のレセプターである。すなわち、ppR が吸収する光である緑から青色の光がこの細菌に当たると、その光から逃げる行動を起こす。光量子を吸収した ppR は励起され、種々の光化学中間体を経て、元の ppR に帰ってくるという光化学反応を示し、この光化学反応をフォトサイクルと呼んでいる。フォトサイクル中において、ppR の光化学中間体は元の ppR とは異なったコンフォメーションをとっている。どの光化学中間体におけるコンフォメーション変化であるかは不明であるが、何かのコンフォメーションの変化が ppR に膜内で隣接している pHtrII に何らかの機構によって「情報」が伝わり、pHtrII の細胞内ドメインに存在するリン酸化部位の活性を変え、「情報」がペン毛に伝わり、走光性の発現にいたる。なお、高度好塩菌の代表的な菌株は、*Halobacterium salinarum* であり、これにはフォボロドプシンと称せられる緑青色の光に対して示す負の走光性のレセプターが存在する。ppR は、*N. pharaonis* に存在するフォボロドプシンである。フォボロドプシンは安定性が低く、大腸菌での機能的大量発現系が確立されていない。一方、ppR は極めて安定で、かつ、遺伝子操作の容易な、大腸菌での機能的大量発現系が確立している。このため、標題はフォボロドプシンの研究であるが、実験材料に ppR を用いている。

申請者の研究は、基底状態（暗所）および種々の光化学中間体における ppR／pHtrII 結合の相互作用を種々の方法で検討したものであり、国際的に高く評価されている。ppR／pHtrII 間の相互作用という本論とはずれるが、無細胞系の

膜蛋白の発原形の新しい試みにも成功している。これは、申請者の研究において、必要な変異体が大腸菌で発現させて作成しようとする、蛋白質が取れないことがある。これは、大腸菌の菌体内で生成された蛋白質が分解するためであると推定し、蛋白質分解酵素の存在しない無細胞系で蛋白質発現を行えば、この問題を回避できると考えたことによる。

本論文は、第1章 序論、第2章 実験材料及び方法、第3章 結果・考察、第4章 総括 からなる学位論文である。70ページからなる和文の論文である。やや小さな文字で書かれているのでページ数は少ないが、中身の濃い学位論文であり、上記のように、国際的に高い評価を受けている。

第1章の序論では、光受容蛋白質、古細菌型レチナール蛋白質、トランスジューサ蛋白質等について解説を行った後、本研究の目的を述べている。第2章の実験材料及び方法では、生物試料、発現ベクター、分光学的測定、電気化学測定を述べ、相互作用を解析するに用いた方法である pull-down assay, 熱安定性測定、等温滴定型熱量計について、申請者が改良して点を含めて、詳しく説明している。第3章は結果・考察であり、得られた結論は以下に述べる通りである。

基底状態（暗所）での ppR/pHtrII 複合体の化学量論比（約1）や解離定数（約 $0.1 \mu\text{M}$ ）を算出する事に成功し、ppR の活性化に伴って構造変化を起こし、pHtrII との結合親和性が大きく低下（ $0.1 \mu\text{M} \rightarrow 15 \mu\text{M}$ ）することを明らかにしている。また、相互作用・構造変化に重要なアミノ酸残基（Tyr199^{ppR}, Asp193^{ppR}, pHtrII^{G83-Q149}, Asn74^{pHtrII}, Thr204^{ppR} 等）を同定することに成功している。さらに pHtrII に水溶性 tag を付加することで、pHtrII を膜蛋白質のモデルとした新規無細胞膜蛋白合成系の開発にも成功している。これらの研究成果から、ppR/pHtrII を介した光情報伝達系は、膜蛋白質を介した情報伝達機構の中で最も理解の進んでいる系の1つとなったと言えるであろう。

このように、申請者の学位論文は、ppR/pHtrII を介した光情報伝達系の理解に多大の貢献をしたものであり、薬学博士の称号を授与するに十分に値すると認めた。