

学 位 論 文 題 名

Key Residues for Anion Binding and Photocycle of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin

(*Natronomonas pharaonis* 由来のハロロドプシンのアニオン結合と
フォトサイクルに重要な残基)

学位論文内容の要旨

高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜には、2種類の光駆動型イオンポンプ、バクテリオロドプシン (BR) とハロロドプシン (sHR) が存在する。これらは発色団をもつレチナールタンパク質であり可視部に吸収を持つ。BR はプロトン(H^+)ポンプであり、フォトサイクルの過程で、細胞質側から細胞外側へ H^+ を汲み出す。一方 HR は細胞外側から細胞質側へとクロライド(Cl^-)を取り込む Cl^- ポンプである。BR は発現量や安定性の面で他の膜タンパク質より優れており、立体構造解析、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR)、遺伝子工学的手法を用いた研究から、イオンポンプとして初めて輸送経路が決定された。一方 sHR に関しては、2000 年に 1.8 Å の分解能 (PDB コード, 1E12) で立体構造が決定されたものの、輸送機構については BR ほど理解が進んでいない。本研究では、相同性が 66% と高く、大腸菌での発現系が構築されていてより安定な *Natronomonas pharaonis* 由来 HR (pHR) を用い、輸送チャンネルに関わる残基を同定することを目的とし、基底状態におけるアニオン結合と光励起状態のフォトサイクル機能について研究した。以下に概要を述べる。

第 1 に、野生型の結合定数のアニオン依存性を調べた。脱塩した pHR タンパク質に塩 (NaCl, NaBr, NaNO₃, NaN₃) を滴定し、アニオン結合による波長シフトと見かけの解離定数について調べた。可視円二色性(CD) 測定では、分子間の規則的な配向相互作用による正と負のバイローブが現れ、pHR はオリゴマーを形成していると考えられた。可視吸収スペクトルでは、滴定とともに短波長側シフトした。脱塩後の波長は 599 nm であったが、200 mM NaCl 存在下では 578 nm に、最も短波長側にシフトしたのは、NaN₃ で 568 nm であった。見かけの解離定数は、 $Br^- < Cl^- < NO_3^- < N_3^-$ の順であった。sHR では、過去にアニオン結合サイトについて 2 つのモデルが提唱されている。第 1 は多原子アニオンと単原子アニオンの結合サイトが異なるモデル、第 2 はクロモフォア近傍の一つの結合サイトが 2 状態をとるモデルである。本研究では滴定による可視吸収変化のヒル係数がほぼ 1 であったので、pHR のアニオン結合サイトは一つであると結論できる。これは sHR の結晶構造の結論と一致した。

第 2 に、基底状態におけるアニオン結合の速度論と光励起状態のクロライド輸送過程を比較するために、ストップフローで脱塩 pHR と NaCl を高速混合し、それに伴う可視吸収変化を測定

した。得られた反応曲線は二成分となり、100 mM NaCl では暗所下の速度定数は 260 s^{-1} となった。pHR のフォトサイクルは、 $\text{pHR} \rightarrow \text{K} \leftrightarrow \text{L} \leftrightarrow \text{N} \leftrightarrow \text{O} \leftrightarrow \text{HR}' \rightarrow \text{pHR}$ という反応で進む。Cl⁻の放出が $\text{N} \rightarrow \text{O}$ 、Cl⁻の取込が $\text{O} \rightarrow \text{HR}'$ の間に起こる。 $\text{O} \rightarrow \text{HR}'$ 間の速度定数は 100 mM NaCl 存在下で 270 s^{-1} であり、本研究で得られた暗所下の Cl⁻結合速度とほぼ同じである。またその活性化エネルギー (35 kJ/mol) もフォトサイクル過程の細胞外側からの Cl⁻取込過程の報告値と一致したことから、 $\text{O} \rightarrow \text{HR}'$ の間の Cl⁻の取込は受動輸送であることがわかった。

第3に、Cl⁻ポンプのチャネル形成に key となる残基を特定するために、変異体を用いてフォトサイクル測定を行った。sHR の結晶構造から、基底状態におけるクロモフォア近傍の Cl⁻結合サイトが明らかとされた。Cl⁻結合サイトはレチナールシッフ塩基より細胞外側チャネル (取込み側)にある。Cl⁻の水和効果として直接相互作用しているのは、Thr-111 と Ser-115 であり、水分子を介して、Ser-73、Ser-76、Arg-108、Trp-112、Asp-238 が間接的に相互作用している (これらの配置は pHR では順に Thr-126、Ser-130、Ser-78、Ser-81、Arg-123、Trp-127、Asp-242 に相当する)。とくに直接相互作用している Thr-111 と Ser-115 は重要であり、また Cl⁻と電荷が反対の Arg-108 も重要であると考えられる。同様な Arg-Thr pair が、Cl⁻放出側チャネルにもあり Arg-200 (pHR では Lys215)と Thr-203 (Thr-218)の pair が Cl⁻放出チャネルに関わっていることが予想される。そこで、本研究では、pHR の Arg-123、Thr-126、Ser-130、Lys-215、Thr-218 に変異を導入した試料 (R123K, R123H, T126V, S130A, S130C, S130T, K215R, K215Q, T218V) を作製した。

全ての変異体は野生型と同程度にオブシンシフトを示し安定であった。Cl⁻滴定による可視 CD、吸収スペクトルおよびフラッシュフォトリス測定を行った。可視 CD スペクトルを用いた Cl⁻滴定実験からは、どの変異体も野生型同様のパイローブとなり、オリゴマーを形成していることがわかった。可視吸収スペクトルを用いた Cl⁻滴定実験からは、R123K と R123H を除いて、Cl⁻を添加するに連れて短波長シフトした。一方、R123K は長波長シフトし、これは sHR のシフト方向と同様であった。R123H の場合シフト変化は見られなかった。これらの細胞外側の変異体に対する Cl⁻親和性は、 $\text{T126V} > \text{R123K} > \text{S130}$ 変異体の順になり、pHR では Ser-130 の OH 基が Cl⁻結合安定化に最も重要であることが示された。

フラッシュフォトリス実験はパルスレーザ一光による pHR 励起とそれに伴う 10 μs ~120ms の可視吸収変化を観測し数値解析により中間体を同定した。まず細胞外側チャネルの変異体 (R123K, T126V, S130C, S130T, S130A)のフラッシュフォトリス測定では、最後の中間体 (pHR'(N))から基底状態に戻るまでの時間が長くなることから、これらの残基は細胞外からの Cl⁻取込みチャネルに重要なサイトであると言える。また S130C, S130T 変異体では、一方向のスキームで説明ができたが、S130A では $\text{L} \rightarrow \text{O}$ と $\text{L} \rightarrow \text{pHR}$ の分岐経路の存在が示唆された。Ser-130 の Ala 置換によって Cl⁻輸送に有効な水素結合がないため、励起状態から基底状態への経路で野生型ポンプ機能を示さない分岐フォトサイクルが出現したと予想された。一方、細胞質側チャネルの変異体 (K215R, K215Q, T218V)では、K215 変異は L2 中間体の蓄積や多成分化などがおこるものの、Cl⁻取込みと放出に伴う O 中間体がいずれも観測された。しかし T218V では O 中間体が観測されなかった。以上の結果は細胞質側の Cl⁻輸送チャネルでは電荷の効果より水和の効果 O 中間体形成に有効であり、Thr-218 が Cl⁻放出により重要なサイトであると結論できる。

学位論文審査の要旨

主 査 助 授 出 村 誠
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 教 授 田 中 勲
副 査 助 授 渡 邊 信 久

学 位 論 文 題 名

Key Residues for Anion Binding and Photocycle of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin

(*Natronomonas pharaonis* 由来のハロロドプシンのアニオン結合と
フォトサイクルに重要な残基)

生命科学の発展に膜タンパク質の構造生物学が重要な研究分野として位置づけられるようになってきた。高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜には、2種類の光駆動型イオンポンプ、バクテリオロドプシン (BR) とハロロドプシン (sHR) が存在する。これらは発色団をもつレチナールタンパク質であり可視部に吸収を持つ。sHR に関しては、2000 年に 1.8 Å の分解能で立体構造が決定されたものの、輸送機構については BR ほど解明が進んでいない。本研究では、sHR と相同性が 66% と高い *Natronomonas pharaonis* 由来 HR (pHR) を用い、クロライド輸送チャネルに関わる残基を同定することを目的とし、基底状態におけるアニオン結合と光励起状態のフォトサイクル機能について研究した。以下に本研究の概要を述べる。

第1に、pHR 膜タンパク質の大腸菌大量発現系の構築に成功した。この試料を用いて野生型の結合定数のアニオン依存性を調べた。見かけの解離定数は、 $\text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{NO}_3^- < \text{N}_3^-$ の順であった。sHR では、過去にアニオン結合サイトについて2つのモデルが提唱されているが、本研究では滴定による可視吸収変化のヒル係数がほぼ1であったので、pHR のアニオン結合サイトは一つであると結論できた。

第2に、基底状態におけるアニオン結合の速度論と光励起状態のクロライド輸送過程を比較するために、ストップフローで脱塩 pHR と NaCl を高速混合した。得られた反応曲線は二成分となり、100 mM NaCl では暗所下の速度定数は 260 s^{-1} となった。この値は pHR のフォトサイクルでの $\text{O} \rightarrow \text{HR}'$ 間の速度定数とほぼ同じであった。またその活性化エネルギーもフォトサイクル過程の細胞外側からの Cl^- 取込過程の報告値と一致したことから、 $\text{O} \rightarrow \text{HR}'$ の間の Cl^- の取込は受動輸送であることがわかった。

第3に、Cl⁻ポンプのチャネル形成に key となる残基を特定するために、変異体を用いてフォトサイクル測定を行った。sHR の結晶構造から、構造類似性の作業仮説をたてた。すなわち Cl⁻の水和効果としての Thr 残基、電荷の効果としても塩基性残基である。とくに sHR で Cl⁻と直接相互作用している Thr-111 と Ser-115 は重要であり、また Cl⁻と電荷が反対の Arg-108 も重要であると考えられる。同様な Arg-Thr pair が、Cl⁻放出側チャネルにもあり Arg-200 (pHR では Lys215)と Thr-203 (Thr-218)の pair が Cl⁻放出チャネルに関わっていることが予想される。そこで、本研究では、pHR の Arg-123、Thr-126、Ser-130、Lys-215、Thr-218 に変異を導入した試料 (R123K, R123H, T126V, S130A, S130C, S130T, K215R, K215Q, T218V) を作製した。

全ての変異体は野生型と同程度にオブシンシフトを示し、可視 CD スペクトルは、どの変異体も野生型同様のバイローブとなり、オリゴマーを形成していることがわかった。R123K と R123H を除いて、Cl⁻を添加するに連れて短波長シフトした。一方、R123K は長波長シフトし、これは sHR のシフト方向と同様であった。R123H の場合シフト変化は見られなかった。これらの細胞外側の変異体に対する Cl⁻親和性は、T126V > R123K > S130 変異体の順になり、pHR では Ser-130 の OH 基が Cl⁻結合安定化に最も重要であることが示された。

フラッシュフォトリシス実験では、まず細胞外側チャネルの変異体(R123K, T126V, S130C, S130T, S130A)のフラッシュフォトリシス測定では、最後の中間体 (pHR'(N)) から基底状態に戻るまでの時間が長くなることから、これらの残基は細胞外からの Cl⁻取込みチャネルに重要なサイトであると言える。一方、細胞質側チャネルの変異体 (K215R, K215Q, T218V)では、K215 変異は L2 中間体の蓄積や多成分化などがおこるものの、Cl⁻取込みと放出に伴う O 中間体がいずれも観測された。しかし T218V では O 中間体が観測されなかった。以上の結果は細胞質側の Cl⁻輸送チャネルでは電荷の効果より水和の効果が O 中間体形成に有効であり、Thr-218 が Cl⁻放出により重要なサイトであると結論できる。

これを要するに、著者は、新たな古細菌型レチナールタンパク質の光ポンプ機能およびチャネル構造に重要な残基領域を遺伝子工学の手法と種々の分光データの解析をもとに解明し、この成果は今後の膜たんぱく質の生命科学分野への貢献するところ大なるものがある。

よって、著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。