

学 位 論 文 題 名

Studies on the oligomeric formation of archaeal rhodopsins and its effect on the light driven ion pump function

(古細菌ロドプシンの多量体形成とその光駆動イオンポンプ機能への効果)

学位論文内容の要旨

高度好塩古細菌の細胞膜中には、4種類のレチナール膜タンパク質が存在する。これらは7回膜貫通型ヘリックスからなり、7番目のヘリックス中央部の Lys 残基が発色団レチナールとシッフ塩基結合している。古細菌由来のレチナール膜タンパク質は真核生物が持つ視覚ロドプシンと同じ構造ファミリーであり、「古細菌ロドプシン」と呼ばれている。バクテリアロドプシン(bR)は三量体を単位とした二次元結晶構造を形成する古細菌ロドプシンの1種であり、レチナールが光子を吸収することにより‘光サイクル’という一連の構造変化を経て、細胞外へプロトンを能動輸送し、再び基底状態へと戻る。一方、bRと同様に多量体を形成するハロロドプシン(hR)も古細菌ロドプシンの1種であり、細胞内へのクロライドイオンポンプ機能を持つ。hR基底構造の中央部分にクロライド解離定数(Kd)が数mMの結合サイトがあり、クロライドで極大吸収が600nmから578nmへシフトする。現在まで、これら古細菌ロドプシンの光受容機能と構造研究が行われてきた。しかしながら、二次元結晶性多量体構造の役割やその形成メカニズムについてはほとんど知見が得られていない。そこで本研究では、古細菌ロドプシンの界面活性剤による可溶化を利用し、多量体、単量体形成と構造安定性、光イオンポンプ機能への効果を明らかにすることを目的とした。本研究では古細菌ロドプシンとして *Halobacterium salinarum* 由来の bR、*Natronomonas pharaonis* 由来の hR(phR)を用いた。bRは古細菌 R1M1 株より精製した紫膜を、phRは、多くの利点から大腸菌大量発現系で得られた試料を用いた。さらに phR 試料では、多量体基本単位数の特定、多量体崩壊の条件調査や多量体パッキング強度の定量化、そして多量体形成に必須なアミノ酸残基の同定を行った。

まず、界面活性剤 Triton X-100 により可溶化し、可視領域の CD スペクトル変化により単量体化を確認した bR について暗中/光照射下での熱安定性を調べたところ、光照射下において不可逆な退色現象(レチナールシッフ塩基結合の加水分解)が観測された。この結果は、bR 機能中間体の安定性保持または基底状態への復元に、多量体構造が寄与していることを示している。一方、界面活性剤ドデシルマルトシド(DM)により可溶化された塩存在下の phR は、強力なパッキング形成により多量体構造を保持していることがわかった。この多量体 phR は脱塩条件では 40℃で単量体化することを発見した。さらに 100mM・ヒドロキシルアミンを添加したところ、光照射下において多量体状態ではみられない著しい退色現象が観測された。以上の結果は、光活性化中間体は単量体化によってフレキシビリティが増加したことを示唆しており、多量体構造は、イオンポンプ機能に必要なタイトな3次構造保持に寄与していることを示している。加えて、単量体 phR における光活性化中間体の遷移をフラッシュフォトリシス測定により調べた結果、多量体 phR と比べて全体的な遷移速度の増加が観測された。この結果は視覚ロドプシンオリゴマーの報告と同様に、phR

の光中間体の寿命が多量体構造により制御されていることを示している。

phR の多量体単位数を特定するため、架橋剤グルタルアルデヒドによる *phR* 間の部位選択的な架橋処理を行った後、マスペクトルや SDS-PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の同定を行った。その結果、大腸菌の内膜に組み込まれた *phR* は三量体を形成しており、DM で可溶化しても三量体を保持できるパッキング力をもつことが明らかとなった。これは、古細菌特有の脂質成分が *phR* 三量体の境界脂質として必須でないことを示唆している。前述したように、このような三量体 *phR* はアニオン結合状態において可視 CD エキサイトンバンドを示す規則的な分子間パッキングを形成しており、界面活性剤存在下でも不可逆な熱退色が始まる 55℃付近までは熱崩壊しない。一方、脱塩条件下では 40℃付近でも容易に単量体化した。すなわち、光イオンポンプ機能が可能なアニオン結合状態では、効率的な光中間体形成のためタイトな三量体を形成するが、アニオン解離状態では三量体界面のパッキングが弱くなると推測される。40℃における三量体崩壊率のクロライドイオン濃度依存性から分子間解離定数 K_d 値を算出したところ、22mM となり、レチナール近傍のアニオン結合サイトの K_d よりも 1 オーダー高い値であった。また、レチナール近傍の結合サイトには結合しない硫酸イオンでも同様に三量体の分子間パッキングが増強されたことから、細胞外側領域の第 2 のアニオン結合サイトが三量体形成に協同的に働いていると結論した。脱塩条件下にある *phR* 三量体については、その熱崩壊率の温度依存性をゲルろ過クロマトグラフィーで検出することにより、57.8、35.3kcal/mol の二成分で三量体崩壊活性化エネルギーが求められた。一方で、*phR* 分子の熱退色から算出した活性化エネルギーは 40.8kcal/mol であり、熱崩壊の第二成分に近い値であった。

さらに三量体形成に寄与している分子間のアミノ酸残基特定の実験を行った。*Halobacterium salinarum* 由来の *hR* 結晶の三次構造をモデルとし、分子間インターフェイスを形成するアミノ酸残基を調べると、特徴的な 4 つの芳香族アミノ酸の分布が示された。そこでこれら芳香族アミノ酸の Ala 変異体を作成し、三量体形成能を調査した。その結果、4 番目のヘリックスの細胞質側領域に位置する Phe150 の Ala 変異体のみ、三量体形成能を失うことが明らかとなった。この *phR*-F150A 変異体は、野生型の単量体 *phR* と同様にヒドロキシルアミン存在下で退色現象を起こした。また三量体形成時と比べてのアニオン結合能の低下や、アニオン解離状態における吸収極大の変化(574nm)など、三量体崩壊が促進する三次構造への影響が観測された。以上の結果から、*phR* の強力な分子間パッキング形成には三量体内部側に位置する F150 の芳香環側鎖のスタッキングが深く関与し、古細菌ロドプシンの自発的な多量体形成メカニズムにこの芳香族アミノ酸の重要性が強く示唆された。

以上を総括すると、光駆動イオンポンプ機能の本質は古細菌ロドプシンの分子内部のアミノ酸残基がつくるイオンチャネルと光スイッチの三次構造変化であり、光励起状態の構造変化から基底状態の安定構造への可逆的な復元とイオンポンプが共役している。しかし、その効率は三量体構造（四次構造）によって調節されることが強く示唆された。これは光駆動イオンポンプにおける三量体が果たす役割についての新しい知見といえる。また三量体の構造要因として、現在までに報告されているような膜貫通領域における非特異的な疎水性相互作用、静電相互作用に加え、*phR* 分子内でのリガンド結合により調節されるような分子間インターフェイス形成や特定の芳香族アミノ酸による相互作用が寄与していることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

Studies on the oligomeric formation of archaeal rhodopsins and its effect on the light driven ion pump function

(古細菌ロドプシンの多量体形成とその光駆動イオンポンプ機能への効果)

ライフサイエンス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。膜タンパク質の機能解明において最も特徴的な構造因子は二次元結晶化である。イオンポンプの“ナノマシン”の活性にはこのような分子集積（四次構造）の検出とその機能解析が重要である。本研究では、古細菌ロドプシンの界面活性剤による可溶化を利用し、多量体、単量体形成と構造安定性、光イオンポンプ機能への効果を明らかにすることを目的とした。本研究では古細菌ハロロドプシンとして *Natronomonas pharaonis* 由来の hR(phR) を用いた。以下に成果の概要を述べる。

第1に界面活性剤の種類による bR の分子間パッキングによる多量体構造変化を観測した。この光活性化中間体は単量体化によってフレキシビリティが増加したことを示唆しており、多量体構造は、イオンポンプ機能に必要なタイトな3次構造保持に寄与していることを示している。加えて、単量体 phR における光活性化中間体の遷移をフラッシュフォトリシス測定により調べた結果、多量体 phR と比べて全体的な遷移速度が増加、phR の光中間体の寿命が多量体構造により制御されていることを示している。

第2に、大腸菌の内膜に組み込まれた phR は三量体を形成しており、DM で可溶化しても三量体を保持できるパッキング力をもつことが明らかとなった。これは、古細菌特有の脂質成分が phR 三量体の境界脂質として必須でないことを示唆している。一方、脱塩条件下では 40℃ 付近でも容易に単量体化した。すなわち、光イオンポンプ機能が可能なアニオン結合状態では、効率的な光中間体形成のためタイトな三量体を形成するが、アニオン解離状態では三量体界面のパッキングが弱くなると推測される。また、レチナール近傍の結合サイトには結合しない硫酸イオンでも同様に三量体の分子間パッキングが増強されたことから、細胞外側領域の第2のアニオン結合サイトが三量体形成に協同的に働いていると結論した。phR 三量体については、その熱崩壊率の温度依存性をゲルろ過クロマトグラフィーで検出することにより、57.8、35.3 kcal/mol の二成分で三量体崩壊活性化エネルギーが求められ、phR 分子の熱退色から算出した活性化エネルギーは熱崩壊の第二成分に近い値であった。

第3に、三量体形成に寄与している分子間のアミノ酸残基を決定した。66%配列相同性をもつ shR 結晶構造をモデルとし、分子界面を形成するアミノ酸残基を調べると、特徴的な4つの芳香族アミノ酸の分布が示された。これら芳香族アミノ酸の Ala 変異体を作成し、三量体形成能を調べた結果、4番目のヘリックスの細胞質側領域に位置する Phe150 の Ala 変異体のみ、三量体形成能を失うことが明らかとなった。この phR-F150A 変異体は、三量体形成時と比べてのアニオン結合能の低下や、アニオン解離状態における吸収極大の変化(574nm)など、三量体崩壊が促進する三次構造への影響が観測された。以上の結果から、phR の強力な分子間パッキング形成には三量体内部側に位置する F150 の芳香環側鎖のスタッキングが深く関与し、古細菌ロドプシンの自己組織的な多量体形成メカニズムにこの芳香族アミノ酸の重要性が強く関与すると結論した。

以上を総括すると、光駆動イオンポンプ機能の本質は古細菌ロドプシンの分子内部のアミノ酸残基がつくるイオンチャネルと光スイッチの三次構造変化であり、光励起状態の構造変化から基底状態の安定構造への可逆的な復元とイオンポンプが共役している。しかし、その効率は三量体構造（四次構造）によって調節されることが強く示唆された。これは光駆動イオンポンプにおける三量体が果たす役割についての新しい知見といえる。また三量体の構造要因として、現在までに報告されているような膜貫通領域における非特異的な疎水性相互作用、静電相互作用に加え、phR 分子内でのリガンド結合により調節されるような分子間インターフェイス形成や特定の芳香族アミノ酸による相互作用が寄与していることが明らかとなった。

これを要するに、著者は、古細菌ロドプシンの多量体形成とその光駆動イオンポンプ機能への効果について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タンパク質のライフサイエンス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。