

学位論文題名

光駆動クロライドイオンポンプ、ハロロドプシンの
輸送分子機構に関する研究

学位論文内容の要旨

古細菌に属する高度好塩好アルカリ菌 *Natronomonas pharaonis* にはレチナールを発色団とする膜タンパク質、ハロロドプシン (*pHR*) が存在する。*pHR* は光駆動により Cl^- を細胞の外から内へ輸送するクロライドポンプであり、 Cl^- 輸送によって電気化学ポテンシャル勾配を形成し、光より得られたエネルギーを ATP 合成に役立てている。*pHR* を光により活性化させると複数の光化学中間体を経て元に戻るフォトサイクルと呼ばれる光分解反応が起こり、1回のフォトサイクルで1個の Cl^- が輸送される。パルス光を与えてからの Cl^- の輸送に伴った光化学中間体の生成および崩壊は、各中間体の可視吸収の時間変化として捉えることができ、この方法は他の膜輸送タンパク質にはない研究上の利点の一つである。

pHR による Cl^- 輸送は次の3つの主要過程から成り立っていると考えられている。①EC (extracellular) 側から CP (cytoplasmic) 側への Cl^- の移動、②CP 側結合サイトからの Cl^- の放出③レチナールのプロトン化された Schiff base (PSB) 近傍への Cl^- の結合。このような3つの過程は全ての膜輸送タンパク質に含まれる重要な輸送過程であり、これらの性質を理解することが輸送担体の輸送分子機構を知ることであると考えられる。そこで、本研究では膜輸送タンパク質の輸送分子機構を研究するためのモデルタンパク質の1つとして *pHR* を位置づけ、 Cl^- 輸送活性およびそれに伴った光化学中間体を様々な物理化学的手法により測定し、*pHR* の輸送分子機構の解明を試みた。

これまでは、直接的に Cl^- 輸送を測定し機能解析した報告はなく、精密な輸送活性測定系が望まれていた。*pHR* による Cl^- 輸送はマイナス1価の Cl^- を細胞内へ輸送する起電性輸送であり、 Cl^- の輸送速度が膜電流として観測される。そこで、*pHR* のアフリカツメガエル卵母細胞発現系を構築し、二電極膜電位固定法を用いて光照射による *pHR* の Cl^- 輸送を膜電流として精度良く検出できる実験系を確立した。この実験系はこれまでに報告がなく、筆者らが世界で初めて成功した実験系である。この実験系の最大の特長は、任意の膜電位に固定することができ、その一定条件下で、 Cl^- の輸送に伴う電流を測定することができることである。この実験方法を応用し、*pHR* 1分子当たりの輸送能力と単位時間当たりに輸送できるイオンの数を別々に見積もることができることを明らかにした。また、アフリカツメガエル卵母細胞発現系への *pHR* の発現量が異なっても輸送能力を的確に見積もることができた。さらに、レーザーフラッシュフォトリシス法を用いた光化学反応の解析結果と Cl^- 輸送に伴う光誘導電流の速度論的解析結果を統合的に考察し、 Cl^- の結合、解離過程を含む新たな輸送モデルを構築した。その結果、 Cl^- の結合過程が全輸送過程において律速段階であ

ること、また、この結合過程が膜電位依存的であることを明らかにした。

次に *pHR* と非常に相同性が高い (identity, 66%; homology, 97%) *Halobacterium salinarum* 由来の *HR* (*sHR*) の X 線結晶構造に基づき、*Cl*⁻ 輸送に重要と予想されるアミノ酸残基の変異体を作製し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系での輸送活性およびレーザーフラッシュフォトリシス法を用いた光化学反応における光化学中間体を測定した。

まず、Ser130 の変異体における活性の低下から、Ser130 の水酸基およびその位置が *Cl*⁻ 輸送に重要であることが示唆された。3 次元構造によると、Ser130 は EC 結合サイトの上に位置し、レチナールと協調して、EC 側と CP 側を隔てる役割をしていると予想される。そこで、この役割を解明するために S130T 変異体 *pHR* において解析したところ、光照射によって誘導される電流値と固定した膜電位の関係は直線関係を示したが、 V_R 値 (reversal potential) は -100mV となり、かかる膜電位の違いにより、光誘導電流の符号が変化した。つまり、S130T 変異体 *pHR* では *Cl*⁻ が双方向に輸送されるチャネル様の挙動を示した。一方で、同じく輸送活性の低下が認められた R123K 変異体 *pHR* では逆向きの電流は観測されなかった。これらの結果から、S130T 変異体 *pHR* に認められた逆向きの電流は活性の低下によるものではなく、Ser130 を変異することにより *pHR* が輸送の方向性を失ったために生じたものと推察された。さらに、光化学中間体の挙動をフラッシュフォトリシス法にて解析したところ、全ての輸送過程において複数の光化学中間体が混在し、細胞外と細胞内の *Cl*⁻ の速い平衡 (EC および CP 側結合サイトを *Cl*⁻ が行き来している状態) が観察された。Ser130 が特徴的な位置に存在することも考慮すると、Ser130 の水酸基は *Cl*⁻ の CP 側から EC 側への逆流を防ぐ分子弁および一方向の輸送に重要なラチェットの役割を果たしていると考えられた。

さらに、レチナール近傍に存在する唯一の酸性残基である Asp252 の変異体における活性の低下から、Asp252 が輸送に必須であることが示された。Asp252 の輸送における役割を解明するために、D252N 変異体 *pHR* を精製し、フラッシュフォトリシス法にて解析した。その結果、光励起後の初期段階の光化学中間体でフォトサイクルが終了し、元の状態に戻ることが明らかとなった。よって、D252N 変異体 *pHR* は初期段階以降の輸送に重要な光化学中間体への移行 (*Cl*⁻ の EC 側結合サイトから CP 側結合サイトへの移行) ができない変異体であることが示された。また、azide 添加における PSB からの脱プロトン指標として PSB の pK_a の変化を検討したところ、D252N 変異体 *pHR* は光励起後の初期段階において PSB の pK_a が十分に低下しない変異体であることも明らかとなった。

光励起後の初期段階における PSB の pK_a の変化を明らかにするために、レーザーフラッシュフォトリシス法および SnO_2 ガラス透明電極法を用いて光照射に伴う PSB の pK_a の変化を野生型 *pHR* において測定した。いずれの方法においても PSB の pK_a は光励起によって低下していることが観察された。これらの知見より、光励起後、レチナールの異性化に始まるフォトサイクルの初期段階において、光エネルギーは PSB の pK_a の低下へと変換され、さらに、*Cl*⁻ 輸送の駆動力へと変換されるメカニズムが考えられる。さらに、この PSB の pK_a が十分に低下するためには、Asp252 と PSB の相互作用が必要不可欠であることが示された。これまでに pK_a の変化がプロトン輸送の駆動力に変換されるというメカニズムは提唱されているが、別のイオンにおいて、特に、*Cl*⁻ 輸送に関しては本研究が初めての例である。しかしながら、PSB の pK_a の低下を *Cl*⁻ 輸送の駆動力へと変換するメカニズムの詳細は解明できておらず、その変換機構の解明には PSB 周辺のアミノ酸残基に関する更なる検討が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 宮 内 正 二
副 査 教 授 加 茂 直 樹
副 査 教 授 井 関 健
副 査 准教授 菅 原 満

学 位 論 文 題 名

光駆動クロライドイオンポンプ、ハロロドプシンの 輸送分子機構に関する研究

古細菌に属する高度好塩好アルカリ菌 *Natronomonas pharaonis* にはレチナールを発色団とする膜タンパク質、ハロロドプシン(pHR)が存在する。pHR は光駆動により Cl⁻を細胞の外から内へ輸送するクロライドポンプである。pHR を光により励起すると複数の光化学中間体を経て元に戻るフォトサイクルと呼ばれる光分解反応が起こり、1回のフォトサイクルで1個の Cl⁻が輸送される。パルス光を与えてからの Cl⁻の輸送に伴った光化学中間体の生成および崩壊は、各中間体の可視吸収の時間変化として捉えることができ、この方法は他の膜輸送タンパク質にはない研究上の利点の一つである。

pHR による Cl⁻輸送は次の 3 つの主要過程から成り立っていると考えられている。①EC (extracellular) 側から CP (cytoplasmic) 側への Cl⁻の移動、②CP 側結合サイトからの Cl⁻の放出③レチナールのプロトン化された Schiff base (PSB) 近傍への Cl⁻の結合。このような 3 つの過程は全ての膜輸送タンパク質に含まれる重要な輸送過程であり、これらの性質を理解することが輸送担体の輸送分子機構を知ることであると考えられる。関氏の研究では膜輸送タンパク質の輸送分子機構を研究するためのモデルタンパク質の 1 つとして pHR を位置づけ、Cl⁻輸送活性およびそれに伴った光化学中間体を様々な物理化学的手法により測定し、pHR の輸送分子機構の解明を行った。

関氏の研究の内容は、大きく二つからなる。

(1) pHR のアフリカツメガエル卵母細胞発現系を構築し、二電極膜電位固定法を用いて光照射による pHR の Cl⁻輸送を膜電流として精度良く検出できる実験系を確立した。 この実験系はこれまでに報告がなく、関氏らが世界で初めて成功した実験系である。この実験系の最大の特長は、任意の膜電位に固定することができ、その一定条件下で、Cl⁻の輸送に伴う電流を測定することができることである。この実験方法を応用し、pHR 1分子当たりの輸送能力と単位時間当たりに輸送できるイオンの数を別々に見積もることができることを明らかにした。また、アフリカツメガエル卵母細胞発現系において pHR の発現量が異

なったとしても輸送能力を的確に見積もることを実証した。さらに、レーザーフラッシュフォトリシス法を用いた光化学反応の解析結果とCl⁻輸送に伴う光誘導電流の速度論的解析結果を統合的に考察し、Cl⁻の結合、解離過程を含む新たな輸送モデルを構築した。その結果、Cl⁻の結合過程が全輸送過程において律速段階であること、また、この結合過程が膜電位依存的事であることを明らかにした。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的手法およびレーザーフラッシュフォトリシス法により、重要なアミノ酸残基の同定を行った。 先ず、クロライドの一方方向の輸送に重要な役割を果たしているアミノ酸残基Ser130を同定した。Ser130はEC結合サイトの上に位置し、レチナールと協調して、EC側とCP側を隔てる役割を担っており、このSer130の水酸基はCl⁻のCP側からEC側への逆流を防ぐ分子弁および一方方向の輸送に重要なラチェットの役割を果たしていると推察された。更に、レチナール近傍に存在する唯一の酸性残基であるAsp252が輸送に必須であることを明らかにした。Asp252の輸送における役割を解明するために、D252N変異体pHRを用いて、光化学中間体の検討を行った。これより、D252N変異体pHRは光励起後の初期段階においてPSBのpK_aが十分に低下しない変異体であることが明らかになった。光励起後の初期段階におけるPSBのpK_aの低下が輸送に必須であることが明らかになった。これらの知見より、光励起後、レチナールの異性化に始まるフォトサイクルの初期段階において、光エネルギーはPSBのpK_aの低下へと変換され、さらに、Cl⁻輸送の駆動力へと変換されるメカニズムが考えられた。このPSBのpK_aが十分に低下するためには、Asp252とPSBの相互作用が必要不可欠であることが示された。これまでにpK_aの変化がプロトン輸送の駆動力に変換されるというメカニズムは提唱されているが、Cl⁻輸送に関しては本研究が初めての例である。PSBのpK_aの低下をCl⁻輸送の駆動力へと変換するメカニズムの詳細は解明できていないが、これら得られた知見は、これからの研究へと繋がるものである。

副査の加茂教授、井関教授、菅原准教授の3先生方に、論文審査を行って頂いた。どの先生方からも、内容的には学位論文に充分値する内容であるというコメントを頂いた。一部の先生から、誤字、不明瞭な点のご指摘を頂いたが、すべて訂正し、ご了解頂いた。特に、審査会を設けることはしなかった。

この博士論文に関する一部の内容は、既に原著論文1報として発表されている。また、現在、投稿直前のものが1報、投稿作成準備段階が1報ある。十分に博士論文に値する内容である。

審査委員会は、関頭照氏の提出論文を学位論文に値すると評定した。