

学位論文題名

Function of the light-driven anion pump and mechanisms of absorption shift of halorhodopsin

(ハロロドプシンの光駆動アニオンポンプ機能と吸収波長制御機構の解明)

学位論文内容の要旨

高度好塩菌の細胞膜には、7本の膜貫通ヘリックス構造を持ち、発色団として Lys 残基とシッフ塩基結合したレチナールを有する 2 種の光駆動型イオンポンプタンパク質が存在する。光駆動型プロトンポンプ・バクテリオロドプシン(BR) は、機能・構造的に最も理解が進んでいる膜タンパク質の 1 つである。光による発色団レチナールの異性化がタンパク質の構造変化を誘起し、『フォトサイクル』と呼ばれる一連の吸収波長の異なる機能中間体を経て 1 つのプロトンを一方向に輸送する反応メカニズムが、中間体の結晶構造解析や各種分光実験から詳細に研究され理解されている。一方、光駆動型アニオンポンプ・ハロロドプシン (HR) は、*Halobacterium salinarum* 由来 HR (HsHR) と *Natronomonas pharaonis* 由来 HR (NpHR) がよく知られており、HsHR 基底状態のみ X 線結晶構造が明らかにされた。しかし HR フォトサイクル反応の詳細やイオン輸送の経路など未解明のままである。本研究は、NpHR のアニオン輸送メカニズム解明を目的として、野生型 (WT) および変異体を用いて、試料の構造安定性、アニオン結合・輸送能に重要なアミノ酸残基の同定、フォトサイクル反応のメカニズムを調べ、さらに吸収波長変化からの分子内水素結合ネットワークの新規な提案を行った。

第 1 に、大腸菌で大量発現が可能な NpHR-WT の構造安定性を調べた。NpHR-WT は大腸菌発現後に界面活性剤ドデシルマルトシドにより活性状態で安定に可溶化され、透明となった。吸収極大は NaCl 存在下、570 nm、脱塩状態で 600 nm に吸収を持ち、それぞれ紫色、青色を呈した。この発色団は NaCl 存在下において非常に安定で、数年は活性を有することができる。一方、アニオン非存在下 WT に界面活性剤オクチルグルコシド (OG) を添加すると、不可逆な退色現象が観察された。これより、NpHR の構造安定性にはアニオンが重要な要素であることがわかった。さらにストップドフロー吸収分光法により、多量体を形成している NpHR-WT は、OG 添加により単量体化し 450 nm に吸収を持つ構造中間体 (I₄₅₀) を経由して退色する反応であることを明らかにした。

第 2 に NpHR のアニオン取込み・輸送メカニズムを解明するために、アニオン取込み側チャネルに位置する塩基性アミノ酸 Arg123 の寄与を検討した。正電荷を除いた変異体 R123Q は、暗所下でアニオン結合に由来する吸収スペクトルのシフトを全く観測できなかった。また、オオサイト卵に発現させた NpHR-WT に光照射すると起きるクロライドイオン輸送に由来する光誘起膜電位の変化も、R123Q の場合は全く観察されなかった。正電荷を保持した R123K 変異体は、両実験とも WT より弱い活性の Cl 濃度依存性を示した。これらの結果は、123 番目の正電荷がアニオンの結合および輸送に必須であることを示唆する。さらに、Arg123 変異体の光中間体の寄与を理解するために Flash photolysis 実験を行った。532 nm のレーザー光により誘起された NpHR の吸収波長変化を 10 μ s ~ 220 ms の

スケールで観測した。R123K は、基底状態への光照射により 520 nm の吸収を持つ L 中間体、次に 610 nm の吸収を持つ O 中間体を形成し、基底状態へ戻る、WT 活性型のフォトサイクル反応を示した。一方、R123Q は L 中間体の形成が確認されず、WT 様のフォトサイクル経路を通らないことがわかった。アニオンポンプ機能を持つ古細菌ロドプシン (HsHR, BR-D85S, 酸性 BR) の結晶構造を参考に、アニオンの有無による Arg123 残基の側鎖構造の変化について考察した。その結果、Arg 側鎖は、アニオン存在下では分子内部シッフ塩基アニオン結合部位方向、非存在下で分子外側アニオン取込み口方向をそれぞれ向くことがわかった。以上の結果は、Arg123 側鎖がその正電荷で分子外部のアニオンを静電的に引き付けた後、構造変化により分子内部の結合部位へ運び入れ安定化させる、という非常に重要な役割を担っていることが示唆された。

NpHR のフォトサイクルとアニオン輸送の共役の詳細は未だ結論は得られていない。そこでフォトサイクル反応中の光中間体数、およびアニオン放出と取込みステップを解明するために種々の条件 (アニオン種・濃度、pH、温度、変異体) で Flash photolysis 実験を行った。その結果、NpHR は、 $\text{NpHR} \Rightarrow (h\nu) \Rightarrow \text{L}_1 \rightarrow \text{L}_2 \rightarrow \text{N} \rightleftharpoons \text{O} \rightarrow \text{NpHR}' \rightarrow \text{NpHR}$ というフォトサイクル経路を通ることを解明した。基底状態 NpHR でレチナール近傍細胞外側の結合部位に存在するアニオンは、 $\text{L}_2 \rightarrow \text{N}$ でレチナールシッフ塩基を越えて細胞内側に移動し、 $\text{N} \rightleftharpoons \text{O}$ で分子外部に放出され、 $\text{O} \rightarrow \text{NpHR}'$ で細胞外側から取り込まれると推定した。

さらに、NpHR の吸収波長を制御する構造因子を検討した。これまでの吸収波長制御研究では、波長シフトの主要因は発色団レチナールの電荷分布変化であり、発色団近傍残基に注目するのが定石であったが、我々はより遠距離に位置する残基まで注目した。HsHR, BR の結晶構造を基にすると、イオン輸送経路は水素結合ネットワークを形成している傾向があり、発色団レチナールから離れていても構造変化の情報は伝達すると考えられるからである。本実験では NpHR-WT がアニオン添加により中性で短波長シフトするが逆に酸性では長波長シフトすることを発見した。そこで NpHR 膜貫通領域の特に酸性アミノ酸残基のプロトン化状態に着目した。その吸収波長は、輸送可能なアニオン種・濃度、pH だけでなく変異体によっては結合不能な 2 価アニオンの影響も受けるなど、複雑に変化した。発色団よりアニオン取込み側の残基が吸収波長に大きな影響を及ぼす傾向があり、構造ネットワークが発達していることを示唆した。これらの結果を元に、NpHR の特にアニオン取込み側のネットワークモデルを提案し、アニオン輸送メカニズムとの関連性について議論した。

以上を総括すると、NpHR のアニオン輸送活性および吸収波長変化は、アニオン種や pH など種々の環境要因が影響することがわかった。また、光照射によりフォトサイクル反応を経由してアニオンをポンプするが、その際に O 中間体前後で Arg123 側鎖の配向が変化することを強く示唆することが考察できた。従って Arg123 側鎖は、細胞外側からシッフ塩基までのアニオン取込みチャネルのネットワーク構造の形成と崩壊に非常に重要な役割を果たしていると結論した。この NpHR の構造ネットワークモデルは、今後の機能・構造研究に有益な情報をもたらすことが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 出 村 誠 (大学院先端生命科学
研究院)

副 査 教 授 河 野 敬 一 (大学院理学院)

副 査 教 授 田 中 勲 (大学院先端生命科学
研究院)

副 査 教 授 相 沢 智 康 (大学院先端生命科学
研究院)

学 位 論 文 題 名

Function of the light-driven anion pump and mechanisms of absorption shift of halorhodopsin

(ハロロドプシンの光駆動アニオンポンプ機能と吸収波長制御機構の解明)

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。高度好塩菌の細胞膜には、7本の膜貫通ヘリックス構造を持ち、発色団として Lys 残基とシッフ塩基結合したレチナールを有する2種の光駆動型イオンポンプタンパク質が存在する。光駆動型プロトンポンプ・バクテリオロドプシン(BR)は、機能・構造的に最も理解が進んでいる膜タンパク質の1つである。光による発色団レチナールの異性化がタンパク質の構造変化を誘起し、『フォトサイクル』と呼ばれる一連の吸収波長の異なる機能中間体を経て1つのプロトンを一方向に輸送する反応メカニズムが、中間体の結晶構造解析や各種分光実験から詳細に研究され理解されている。一方、光駆動型アニオンポンプ・ハロロドプシン(HR)は、*Halobacterium salinarum* 由来 HR (HsHR) と *Natronomonas pharaonis* 由来 HR (NpHR) がよく知られており、HsHR 基底状態のみ X 線結晶構造が明らかにされた。しかし HR フォトサイクル反応の詳細やイオン輸送の経路など未解明のままである。本研究は、NpHR のアニオン輸送メカニズム解明を目的として、野生型(WT)および変異体を用いて、試料の構造安定性、アニオン結合・輸送能に重要なアミノ酸残基の同定、フォトサイクル反応のメカニズムを調べ、さらに吸収波長変化からの分子内水素結合ネットワークの新規な提案を行った。以下に成果の概要を述べる。

第1に、大腸菌で大量発現が可能な NpHR-WT の構造安定性を調べた。NpHR-WT は大腸菌発現後に界面活性剤ドデシルマルトシドにより活性状態で安定に可溶化され、透明となった。吸収極大は NaCl 存在下、578 nm、脱塩状態で 600 nm に吸収を持ち、それぞれ紫色、青色を呈した。この発色団は NaCl 存在下、非常に安定で数年は活性を有することができる。一方、アニオン非存在下 WT に界面活性剤オクチルグルコシド(OG)を添加すると、不可逆な退色現象が観察された。これより、NpHR の構造安定性にはアニオンが重要な要素であることがわかった。さらにストップフロー吸収分光法により、多量体を形成している NpHR-WT

は、OG 添加により単量体化し 450 nm に吸収を持つ構造中間体 (I₄₅₀) を経由して退色する反応であることを明らかにした。

第2に NpHR のアニオン取込み・輸送メカニズムを解明するために、アニオン取込み側チャネルに位置する塩基性アミノ酸 Arg123 の寄与を検討した。正電荷を除いた変異体 R123Q は、暗所下でアニオン結合に由来する吸収スペクトルのシフトを全く観測できなかった。また、オオサイトに発現させた NpHR-WT に光照射すると起きるクロライドイオン輸送に由来する光誘起膜電位の変化も、R123Q の場合は全く観察されなかった。正電荷を保持した R123K 変異体は、両実験とも WT より弱い活性の Cl 濃度依存性を示した。これらの結果は、123 番目の正電荷がアニオンの結合および輸送に必須であることを示唆する。さらに、Arg123 変異体の光中間体の寄与を理解するために Flash photolysis 実験を行った。532 nm のレーザー光により誘起された NpHR の吸収波長変化を 10 μ s ~ 220 ms のスケールで観測した。R123K は、基底状態への光照射により 520 nm の吸収を持つ L 中間体、次に 610 nm の吸収を持つ O 中間体を形成し、基底状態へ戻る、WT 活性型のフォトサイクル反応を示した。一方、R123Q は L 中間体の形成が確認されず、WT 様のフォトサイクル経路を通らないことがわかった。アニオンポンプ機能を持つ古細菌ロドプシン (HsHR, BR-D85S, 酸性 BR) の結晶構造を参考に、アニオンの有無による Arg123 残基の側鎖構造の変化について考察した。その結果、Arg 側鎖は、アニオン存在下では分子内部シッフ塩基アニオン結合部位方向、非存在下で分子外側アニオン取込み口方向をそれぞれ向くことがわかった。以上の結果は、Arg123 側鎖がその正電荷で分子外部のアニオンを静電的に引き付けた後、構造変化により分子内部の結合部位へ運び入れ安定化させる、という非常に重要な役割を担っていることが示唆された。

NpHR のフォトサイクルとアニオン輸送の共役の詳細は未だ結論は得られていない。そこでフォトサイクル反応中の光中間体数、およびアニオン放出と取込みステップを解明するために種々の条件 (アニオン種・濃度、pH、温度、変異体) で Flash photolysis 実験を行った。その結果、NpHR は、 $\text{NpHR} \Rightarrow (h\nu) \Rightarrow \text{L}_1 \rightarrow \text{L}_2 \rightarrow \text{N} \rightleftharpoons \text{O} \rightarrow \text{NpHR}' \rightarrow \text{NpHR}$ というフォトサイクル経路を通ることを解明した。

さらに、NpHR の吸収波長を制御する構造因子を検討した。これまでの吸収波長制御研究では、波長シフトの主要因は発色団レチナールの電荷分布変化であり、発色団近傍残基に注目するのが定石であったが、我々はより遠距離に位置する残基まで注目した。HsHR, BR の結晶構造を基にすると、イオン輸送経路は水素結合ネットワークを形成している傾向があり、発色団レチナールから離れていても構造変化の情報は伝達すると考えられるからである。本実験では NpHR-WT がアニオン添加により中性で短波長シフトするが逆に酸性では長波長シフトすることを発見した。これらの結果を元に、NpHR の特にアニオン取込み側のネットワークモデルを提案し、アニオン輸送メカニズムとの関連性について議論した。

以上を総括すると、NpHR のアニオン輸送活性および吸収波長変化は、アニオン種や pH など種々の環境要因が影響することがわかった。また、光照射によりフォトサイクル反応を経由してアニオンをポンプするが、その際に O 中間体前後で Arg123 側鎖の配向が変化することを強く示唆することが考察できた。従って Arg123 側鎖は、細胞外側からシッフ塩基までのアニオン取込みチャネルのネットワーク構造の形成と崩壊に非常に重要な役割を果たしている結論した。この NpHR の構造ネットワークモデルは、今後の機能・構造研究に有益な情報をもたらすことが期待される。

これを要するに、著者は、古細菌ロドプシンの波長制御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学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。