

# *Halobacterium salinarum* 由来のフォボロドプシン pR の 安定性および光化学反応の検討

## 学位論文内容の要旨

### はじめに

高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜には、4種類のレチナールタンパク質が存在する。バクテリオロドプシン (bR) とハロロドプシン (hR) はイオンポンプとして、センソリーロドプシン (sR) とフォボロドプシン (pR) は光センサーとして、それぞれ機能している。これらのレチナールタンパク質は光を受容すると、吸収波長の異なるいくつかの光化学中間体を経て、元の状態に戻る光化学反応 (フォトサイクル) を示し、この間に機能を発現する。また、これらのレチナールタンパク質は、アミノ酸の一次配列の相同性が高く、立体構造も類似すると考えられているが、その機能は異なるものであり、タンパク質の構造と機能発現の相関という点から非常に興味深い。

pR は当研究室の Takahashi らによって発見され、負の走光性に関与することからフォボロドプシンと命名された。しかしながら、pR は実験材料としての取り扱いが難しく、その研究は遅れていた。今回我々は、pR の研究が進展しない理由の一つであった不安定性について、これを克服する方法を見出すことを目的に検討を行った。そして、完全ではないものの、比較的安定に pR を取り扱うことを可能としたことから、pR のフォトサイクルに関する新たな知見を得ることを目的に検討を行った。

### pR の安定性の検討

これまで pR の安定性については、2 M NaCl 以上のイオン強度では安定だが、1 M NaCl 以下のイオン強度では急激に不安定になると報告されていた。しかしながら、我々は pR は光で不安定になるという印象を受けていた。

まず、暗中所ける安定性を検討したところ、4 M NaCl 存在下ではその安定性は高く、pR の失活はほとんど認められなかった。また暗中所ける pR の安定性には塩濃度依存性が認められたものの、0.4 M や 1 M NaCl という低塩濃度下においても比較的安定であった。次に、pR の安定性について pH の影響を検討したところ、暗所では広い pH 条件 ( $5 \leq \text{pH} \leq 8$ ) において安定であった。一方、光照射下においては、pH6 以下では比較的安定であったものの、pH7 以上では非常に不安定であることが示された。この光照射下における不安定性には、光照射によって生成する光化学中間体が関与していることが予想される。

また、サンプルはできる限り高塩濃度 (4 M NaCl) の酸性 (pH 5) 溶液中、暗所にて保存することや、各種実験において光を照射する瞬間以外は暗所で行うことにより、比較的安定に pR を取り扱うことが可能であることが示された。

### ヒドロキシルアミンによる pR の退色反応

ヒドロキシルアミンは、活性中心であるレチナールシッフ塩基と反応し、レチナールタンパク質

の退色を引き起こす。この退色反応が起こるためには、水溶性であるヒドロキシルアミンがタンパク質中心部のシッフ塩基まで到達しなければならず、シッフ塩基周辺の環境が反応性に大きく影響する。

暗中共び光照射下における退色反応について検討したところ、暗中共では pR の退色がほとんど起こらなかったが、光照射下においては pR の退色が非常に速く進んだ。このことから、ヒドロキシルアミンは pR の光化学中間体と主に反応することが示唆された。次に、様々な pH において検討を行ったところ、pH が低下するにつれて、光照射下における退色反応速度も低下した。pR のフォトサイクルにおいて、pH が低下するにつれて M 光化学中間体の崩壊速度は増大し、その存在時間が短くなることから、ヒドロキシルアミンは M 光化学中間体と反応することが示唆された。さらにアザイドを用いて M 光化学中間体の崩壊速度を様々な pH に変化させ、ヒドロキシルアミンとの退色反応を検討したところ、ヒドロキシルアミンによる退色反応速度定数と M 光化学中間体の存在時間は比例関係にあることが明らかになった。

以上の結果から、ヒドロキシルアミンは pR の M 光化学中間体と反応することが示された。pR の M 光化学中間体は、水溶性試薬であるヒドロキシルアミンが到達可能なほどに、タンパク質内部の環境が親水的になっていると考えられ、膜タンパク質である pR にとっては不安定な環境と考えられる。pH が高いほどこの不安定な M 光化学中間体が長寿命で存在するために、pH が高いほど光照射下における pR の不安定性が増すものと考えられる。

### 光化学中間体の速度論的解析

次に pR のフォトサイクルについて、レーザーフラッシュフォトリス法を用い、検討を行った。ここで、 $\text{pH} \leq 6.0$  においては M 光化学中間体の崩壊過程は 1 成分で表されるのに対し、 $\text{pH} \geq 6.5$  においてはその崩壊過程は 2 成分であったことから、酸性 pH ( $\text{pH} \leq 6.0$ ) と中性からアルカリ性 pH ( $\text{pH} \geq 6.5$ ) にわけて議論を行った。

酸性 pH における測定データを解析したところ、O 光化学中間体から pR に戻る間に新規光化学中間体が存在することが示唆され、我々はこの新規光化学中間体を pR' 光化学中間体と命名した。また、M 光化学中間体の崩壊速度定数は、 $4.5 \leq \text{pH} \leq 6.0$  においては pH に依存せずほぼ一定である一方、 $3.0 \leq \text{pH} \leq 4.5$  においては外液 pH が低下するにつれ崩壊速度定数は増加した。M 光化学中間体の崩壊過程は、脱プロトン化シッフ塩基の再プロトン化過程と考えられていることから、 $3.0 \leq \text{pH} \leq 4.5$  においては外液からプロトンが取り込まれ、シッフ塩基の再プロトン化が起こり、 $4.5 \leq \text{pH} \leq 6.0$  においてはタンパク質内にプロトンドナー残基が存在し、これを介してシッフ塩基の再プロトン化が起こるものと示唆される。

中性からアルカリ性 pH における測定データについて解析を行ったところ、 $\text{pK}_a$  約 7.5 のプロトンドナーであるアミノ酸残基 X が存在し、このアミノ酸残基 X の解離・非解離により 2 つの反応サイクルが存在することが示唆された。2 つの反応サイクルのうち、一方の M 光化学中間体の崩壊速度定数は外液 pH によらずほぼ一定であるのに対し、もう一方の M 光化学中間体の崩壊速度定数は pH が上昇するにつれ減少する傾向にあった。M 光化学中間体の崩壊過程において、残基 X が非解離の状態では、残基 X がプロトンドナーとして働き、残基 X が解離している状態では、外液からプロトンを取り込んでいるものと考えられる。残基 X の同定は今後の検討課題である。

### まとめ

- (1) pR は暗中共では 0.4 M NaCl という低塩濃度下においても比較的安定であった。また、暗中共では広い pH 条件 ( $5 \leq \text{pH} \leq 8$ ) において安定であったが、光照射下においては pH 7 以上で非常に不安定であった。
- (2) pR の M 光化学中間体において、レチナールシッフ塩基周辺の環境が親水的になっていることが示された。光照射下における不安定性は、この M 光化学中間体時にタンパク質内部の親

水性が増すことに起因することが示唆された。

- (3) pR のフォトサイクル中に、pR' 光化学中間体が存在することを明らかにした。また、pKa 約 7.5 のプロトドナー残基 X が存在し、この残基 X の解離・非解離によって、pR の反応サイクルが異なることを示唆した。

# 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	准教授	三宅教尚
副査	講師	野田展生

学位論文題名

## *Halobacterium salinarum* 由来のフォボロドプシン pR の 安定性および光化学反応の検討

生物にとって光はエネルギー源でもあり、また、情報源でもある。生物が光を利用するために、生物には光を受け取るレセプターが備わっている。地球上の生物は、それぞれ種によって決められた種々のタイプのレセプターを持っているが、高度好塩菌には、高等動物の網膜に存在するロドプシンと類似のタンパク質が細胞膜に発現している。これは、レチナール（ビタミン A のアルデヒド型）を補欠分子とする膜タンパク質である。代表的な高度好塩菌である *Halobacterium salinarum* には、4 種のレチナールタンパク質が存在することが明らかにされている。それらは、1) 光プロトンポンプであるバクテリオロドプシン、2) 光 Cl<sup>-</sup>ポンプであるハロロドプシン、3) 走光性のレセプターであるセンソリロドプシン、および 4) 走光性のレセプターであるフォボロドプシン (pR と略す；またはセンソリーロドプシン II と呼ばれる) である。このうち、pR の研究はあまりなされていなかった。理由は、菌体の発現量が少ないこと、および界面活性剤に対して不安定であることである。近年、pR の大腸菌での発現系が開発され (2005 年)、いくらかの研究の進展があったが、不安定性のために十分な研究はなされていない。申請者は pR の研究に果敢に挑戦し、pR を比較的安定にする方法を開発し、pR の光化学反応を研究し、また、光照射による pR のプロトン移動について申請者の研究室で開発した方法を駆使して、明らかにしている。

本学位論文は、和文で書かれ 81 ページからなり、4 章から構成されている。第 1 章は序論であり、レチナールタンパク質を概観し、発見されてから 23 年にもなるのに、pR の研究が進展しなかった理由を述べ

ている。第2章は実験材料および実験方法が述べられている。上記のように、種々の実験に耐えるようにするには、どのような状態にすればよいかについて議論されている。結論は、リン脂質で再構成をすることであり、再構成までは写真現像の際に使われる赤色の電球（安全光）のもとでタンパク質精製を行うことであった。ところが、このような再構成膜では高濃度の電解質溶液中では凝縮してしまい、分光学的測定ができない。そこで、申請者は、高塩濃度化でも凝縮しない方法を考案している。申請者の方法でも、pH8以上でのアルカリ条件での測定はできなかったが、先行研究よりは格段の進歩である。第3章は結果および考察である。ヒドロキシルアミンとの反応から、ある中間体でタンパク質内部まで親水性になることを明らかにし、このため、精製を暗中（現実には安全光下）で行わなければならないことを考察している。光化学反応として、 $pR \rightarrow M \rightarrow O \rightarrow pR' \rightarrow pR$  のサイクリックな反応（フォトサイクルと呼ばれている）であることを明らかにしている。ここで、M、OおよびpR'は申請者が命名した光化学中間体である。詳細な研究から、 $pK_a=7.5$ のアミノ酸残基（同定はしていない）の解離・非解離によってホトサイクルの速度が変化することを明らかにしている。また、Mの崩壊時にプロトンを外液から取り込み、Oの崩壊の時にプロトンを同じ方向から放出することを明らかにしている。第4章は、総括に当てており、将来の研究の展望が述べられている。

このように、申請者は困難が予想されていたpRの研究に果敢挑戦し、大きな貢献をなし、そして、将来のpR研究発展の基礎を作ったと言えよう。このような研究業績に対し、博士（薬学）の学位を授与するに十分であると判断した。