

学位論文題名

The photo-induced proton transfer of rhodopsin-like protein from marine bacteria, proteorhodopsin

(海洋細菌由来のロドプシン様タンパク質プロテオロドプシンの光誘起プロトン移動)

学位論文内容の要旨

高塩環境下に生息する古細菌の一部には、高等動物の網膜に存在する視物質ロドプシンと同様に、レチナールを発色団として持つ 7 回膜貫通型の光受容膜タンパク質が存在する。これらの細菌は、このタンパク質を光エネルギーや光情報変換に利用している。こうした微生物由来のロドプシン様タンパク質は、これまで古細菌に限定して存在するものと考えられており、古細菌型ロドプシンと呼ばれていた。しかしながら、近年の急速なゲノム科学の進展により、ロドプシン様タンパク質は、古細菌のみならず真正細菌や真核生物の一部からも見出されており、生物界に広く存在することが明らかとなってきている。特に、2000 年に入り、多くの海洋細菌から同種のタンパク質であるプロテオロドプシン (PR) をコードする遺伝子の存在が相次いで発見された。この発見は、海洋生態系において、従来より知られていたクロロフィル以外に、ロドプシン様タンパク質による光からのエネルギー獲得もまた重要な役割を持つということを示唆している。

ロドプシン様タンパク質で最も有名なものとして、バクテリオロドプシン (BR) が知られている。BR は、光を受けると、発色団であるレチナールの光異性化をトリガーとした光化学反応サイクル (フォトサイクル) を示す。また、この反応サイクルと共役して、プロトンが細胞内から細胞外へと運ばれ、それにより生じた細胞膜内外でのプロトンの電気化学ポテンシャル勾配は、ATP 合成や物質輸送の駆動力として利用される。一方、PR もまた BR 同様に光駆動プロトンポンプとして機能するということが明らかとなっている。しかしながら、その詳細なメカニズムについてはいまだ明らかとなっていない。そこで、本研究では、PR の分子機構の詳細について知るために、プロトン移動メカニズムに焦点を当てて、検討を行った。

BR や PR が H^+ 輸送をするためには、いくつかのアミノ酸残基間で一方方向の移動が起こる必要がある。それは関与するアミノ酸残基間の協調した pK_a の変化によって巧みに達成されている。従って、 H^+ 輸送に関与する残基の基底状態や各種中間体状態における pK_a を調べることは重要である。そのためには、様々な pH 条件下において H^+ 移動を測定できる系の構築が必要である。ロドプシン様タンパク質における光誘起 H^+ 移動を測る手段として、これまで pH 感受性の色素を用いた測定法が用いられてきた。しかしながら、この方法では、測定に使用する色素の pK_a 付近の pH 条件下でしか測定ができないという欠点がある。そのため、これまで BR の H^+ 輸送に重要な残基の pK_a の決定は、様々な分光学的手法を用いることによる間接的な方法で行われてきた。そこで、本研究では種々の pH で H^+ 移動を測定できる方法を開発し、 H^+ 移動を直接測定することにより関係するアミノ酸残基の pK_a を推定した。従来の方法は間接的な方法であったが、本研究のそれはより「直接的方法」といえる。本研究で

は SnO_2 を表面にコーティングしたガラス透明電極を用いた方法を採用した。この電極は、これまでの研究から高感度の pH 電極として機能することが明らかとなっている。よって、光照射による H^+ 吸収・放出による溶液中での pH 変化を電位変化として検出することが出来る。しかし、その電位変化が、pH 変化やその時間変化を正確に測定出来ているかどうかは不明であった。そこで、本研究では、野生型 PR、BR および様々な BR 変異体を用い、閃光照射によって生じる光誘起信号を測定し、pH 感受性色素を用いた結果と比較することで、本電極で pH 変化およびその時間変化が正確に測れているかどうかについて検討を行った。その結果、ある時間領域 (10 ミリ秒～数 100 ミリ秒) で正確な測定が出来ることが明らかとなった。次に、様々な知見が得られている野生型 BR を用い、広い pH 範囲で光誘起 pH 変化の測定を行った。観測された信号の大きさやその変化速度を pH に対してプロットすることで得られた pH プロファイルを解析し、BR の H^+ 輸送に関わるアミノ酸残基の基底状態および中間体時における pK_a の値を算出した。得られた値は過去に別の実験により求められた値とよく一致した。このように、光誘起 H^+ 移動から直接的に様々なアミノ酸残基の pK_a を算出する方法を確立することができた。

次に、この系を用いて、 H^+ 移動機構の詳細が未解明な PR についても同様な実験を行った。BR と同様に pH を変えながら光誘起 H^+ 吸収・放出を測定し、pH プロファイルをとると、それは BR とは大きく異なる結果を示した。PR の pH プロファイルは、pH 領域毎にいくつかの特徴的な挙動を示す領域 (領域 I、 $\text{pH} < 4$; II、 $4 < \text{pH} < 8.5$; III、 $8.5 < \text{pH} < 10.5$; IV、 $10.5 < \text{pH}$) に分けられる。そこで、それぞれの領域について、詳しく検討を行った。

領域 II では、光照射により、最初に H^+ のタンパク質内への吸収、続いて放出が起こった。ここで、海水の pH は、中性から弱アルカリ性であることから、PR が生理的に機能していると考えられる領域 II においては、 H^+ 輸送活性を持つかどうかについても検討した。 H^+ 輸送を測る方法として、誘電体薄膜を用いた光誘起電荷移動の測定、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた測定の 2 つを用いた。これらの実験の pH プロファイルは、 SnO_2 電極による結果とよく一致した。また、これら 3 つの実験の pH プロファイルから求められた pK_a 値は、吸収スペクトルから求められたレチナールシッフ塩基 (SB) のカウンターイオン (Asp97) の pK_a 値とよく一致したことから、この領域の H^+ 移動・輸送を決定づけるのは、Asp97 残基の基底状態におけるプロトン化状態であるということが明らかとなった。

領域 I および III～IV では、光照射により、領域 II とは逆に、最初に速い H^+ の放出、続いて吸収が観測された。特に、領域 III では、pH が上昇するにつれ、 H^+ 吸収と放出の順番が逆転した。解析の結果、この逆転現象は、 $\text{pK}_a \sim 9.8$ を持つて起こることが明らかとなった。これは、アルカリ性になることで機能し始める何らかのプロトン放出残基の存在を示唆するものである。pH がさらに上昇すると (領域 IV)、PR の活性中心である SB が基底状態で解離し始めるため、 H^+ 移動能は徐々に低下していった。一方、領域 I での速い H^+ 放出は、SB の第 2 のカウンターイオンである Asp227 残基の変異により大きく影響を受けた。従って、領域 I での速い H^+ 放出は、おそらく Asp227 からの一過性の H^+ 解離であると考えられる。

以上、本研究で得られた結果を総括すると次のようになる。1) ロドプシン類をはじめとする光受容タンパク質の光誘起プロトン移動を、広い pH 条件下でその大きさおよび時間変化を測定し、それから、プロトン移動に関わる様々な残基の pK_a を直接的に算出する手法を確立した。2) PR の光誘起プロトン移動の pH 依存性を示し、またプロトン移動に重要なアミノ酸残基の pK_a 値を決定した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 出 村 誠
副 査 教 授 田 中 勲
副 査 教 授 金 城 政 孝

学 位 論 文 題 名

The photo-induced proton transfer of rhodopsin-like protein from marine bacteria, proteorhodopsin

(海洋細菌由来のロドプシン様タンパク質プロテオロドプシンの
光誘起プロトン移動)

高塩環境下に生息する古細菌の一部には、高等生物の網膜に存在する視物質ロドプシンと同様に、レチナールを発色団として持つ 7 回膜貫通型の光受容膜タンパク質が存在する。ある種の細菌は、これを光エネルギーや光情報変換に利用することで、過酷な環境下での生存を可能にしている。こうした微生物由来のロドプシン様タンパク質は、これまで古細菌に限定して存在するものと考えられており、古細菌型ロドプシンと呼ばれていた。しかしながら、近年の急速なゲノム科学の進展により、ロドプシン様タンパク質は、古細菌のみならず真正細菌や真核生物の一部から見出されており、生物界に広く存在することが明らかとなってきた。特に、2000 年に入り、多くの海洋細菌から同種のタンパク質であるプロテオロドプシン (PR) が相次いで発見された。この発見は、海洋生態系のクロロフィル以外のロドプシンを用いた光合成経路がエネルギー供給ルートとして重要な役割を持つということを示唆している。古細菌由来のロドプシンでバクテリオロドプシン (BR) が知られている。BR は、光を受けると、レチナールの光異性をトリガーとした特有の光化学反応サイクル (フォトサイクル) が引き起こされる。この反応サイクルの過程で、プロトンが細胞内から細胞外へと運ばれ、それにより生じた細胞膜内外でのプロトンの濃度勾配は、最終的に ATP 合成の駆動力として利用される。一方、PR もまた BR 同様に光駆動型のプロトンポンプとして機能するということがこれまでの研究から明らかとなっている。しかしながら、そのプロトンポンプ機能に関わるアミノ酸残基とその解離平衡や生理的な役割についてはいまだ明らかとなっていない。そこで、本研究では、PR のプロトンポンプ機構の解明を目的とし、プロトン移動メカニズムに焦点を当てて、検討を行った。

BR や PR がプロトンを輸送するためには、いくつかのアミノ酸残基間でプロトン移動が起こる必要があり、それらの残基間でのプロトン移動は、フォトサイクル時における各種アミ

ノ酸残基の pKa の変化により、巧みに制御されている。本研究では、より直接的な方法でプロトン移動を測定し、各種残基の正確な pKa の値を定量的に求める手法の確立を目指した。実験方法としては、SnO₂ を表面にコーティングしたガラス透明電極を検証するために、野生型 PR や BR、様々な BR 変異体を用い、試料への閃光照射時に生じる光誘起信号の変化を測定し、pH 感受性色素を用いた測定の結果と比較することで、特定の時間領域（10 ミリ秒～数 100 ミリ秒）で正確な測定が可能であることが明らかとなった。また広い pH 範囲で光誘起 pH 変化を測定・解析した結果、BR のプロトン輸送に関わるアミノ酸残基の基底状態および中間体時における pKa 値が過去の実験結果とよく一致したことより、SnO₂ 電極法が PR のプロトン輸送測定に応用可能であることを証明できた。

次に、この系を用いて、プロトン移動機構の詳細が未解明な PR についても同様な実験を行った。BR と同様に pH を変えながら、光誘起プロトン吸収・放出を測定し、pH プロファイルをとると、BR とは大きく異なる結果を示した。PR の pH プロファイルは、pH 領域毎にいくつかの特徴的な挙動を示す領域（領域 I : pH < 4、II : 4 < pH < 8.5、III : 8.5 < pH < 10.5、IV : 10.5 < pH と定義する）に分けられる。そこで、それぞれの領域について、詳しく検討を行った。領域 II では、光照射により、最初にプロトンのタンパク質内への吸収、続いて放出が起こった。ここで、海水の pH は、中性から弱アルカリ性であることから、PR が生理的に機能していると考えられる領域 II においては、プロトン輸送活性を持つかどうかについて、ルミラー膜を用いた光誘起電荷移動の測定、オーサイトを用いた測定の 2 つの実験を行った。これらの結果は SnO₂ 電極による実験結果とよく一致した。最終的にこの領域のプロトン移動・輸送を決定づけるのは、Asp97 残基の基底状態におけるプロトン化状態であると結論した。

以上より本研究では、1) ロドプシン類をはじめとする光受容タンパク質の光誘起プロトン移動を広い pH 条件下で測定し、プロトン移動に関わる様々な残基の pKa を算出するための定量的な手法を確立した、2) PR の光誘起プロトン移動の pH 依存性を示し、またプロトン移動に重要なアミノ酸残基の pKa 値を直接的な方法により決定した。

これを要するに、著者は、海洋細菌由来のロドプシン様タンパク質プロテオロドプシン(PR)について新しい電気化学的手法でプロトン輸送機構の新知見を得たものであり、光生物学と生物物理学に対して高く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（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。