

## 学位論文題名

## Studies on the Homo-Trimer Formation of Microbial Ion-Pumping Rhodopsins and Its Relationship to Their Photoreactive Functions

(微生物由来イオンポンプ型ロドプシンにおけるホモ三量体形成と光応答への影響に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

ロドプシンは、レチナールを補因子にもつ光受容膜タンパク質である。高等動物の網膜に存在するロドプシン (Type II ロドプシン) は、視覚の光センサーとして知られている。一方、微生物のもつロドプシン様タンパク質 (Type I ロドプシン, 微生物型ロドプシン) は、走性の光センサーだけではなく、光エネルギーを電気化学エネルギーに変換する光駆動イオンポンプとしての機能を持っている。微生物型ロドプシンの代表例として、高度好塩性古細菌の細胞膜から発見された4種類の分子、光駆動プロトンポンプ・バクテリオロドプシン (BR), 光駆動クロライドポンプ・ハロロドプシン (HR), 正の走光性センサー・センサリーロドプシン I (SRI), 負の走光性センサー・センサリーロドプシン II (SRII, フォボロドプシンとも呼ばれる) が挙げられる。近年では、古細菌以外の微生物からも同様のロドプシン分子が発見されている。これらの分子は、7回の膜貫通 $\alpha$ ヘリックスと、7番目のヘリックスに保存されたリジン残基とシッフ塩基結合する補因子レチナールから構成された、共通の立体構造を持つ。微生物型ロドプシンは、フォトサイクルと呼ばれる光反応機構をもつ。フォトサイクルとは、初期状態で光を受容した後、構造変化を伴って様々な光反応中間体を形成し、再び初期状態へ回復する経路を辿る光反応である。様々な分光学的解析や、光反応中間体の立体構造解析から、フォトサイクル中の特定の光反応中間体および、それらの形成過程が、イオン輸送や情報伝達を行うための重要な役割を担っていることが明らかになっている。

古細菌型ロドプシンにおける特徴として、多量体構造を形成することが挙げられる。その形態は機能型によって異なっている。走光性センサーのSRIおよびSRIIは、トランスデューサータンパク質と2:2の比率で会合し、ヘテロ4量体を形成する。これは、走光性の情報伝達にとって極めて重要な多量体構造であることが明らかになっている。また、多量体形成の相互作用部位も明らかになっている。一方、イオンポンプのBRお

よびHRは、ホモ三量体を形成する。しかし、三量体形成のメカニズムや機能的意義は明らかではなかった。さらに、BRは界面活性剤存在下では単量体に解離するのに対し、HRは三量体が保持されることが先行研究により明らかになった。このことから、BRとHRは、異なるメカニズムで三量体構造が安定化されていると推察される。

本研究 Part I では、高度好塩好アルカリ性古細菌 *Natronomonas pharaonis* HR (NpHR) を用いて、(i) 三量体形成の相互作用部位の特定と安定化のメカニズム、および (ii) 三量体形成の機能的意義、を明らかにすることを目的とした。我々は、変異体を用いた分光測定、クロマトグラフィーによる分子量分析、量子計算により、(i) NpHR 三量体の中心部分に3回軸対称に配置されたフェニルアラニン残基 (Phe150) が、三量体形成に寄与することを明らかにした。これに対応するアミノ酸は、BRには保存されておらず、3つの対称に配置された Phe150 が、NpHR の三量体構造をBRとは異なるメカニズムで安定化していることが考えられる。さらに、光反応中間体の速度論的解析を行ったところ、NpHR は三量体形成により、(ii)-1 初期光反応中間体の転移速度が遅くなる、(ii)-2 クロライドが放出されやすくなる、(ii)-3 初期状態へ効率的に回復する、ことが明らかになった。一連の解析から、単量体では、クロライドを輸送しない光反応経路を経由することが考えられた。このことから、我々は、NpHR の三量体構造は、光反応を最適な経路で、効率的にイオン輸送できるように制御するために必須であると結論した。

このような三量体と、その構造形成の詳細については、BR・HR 以外のロドプシンではほとんど知られていない。2003年、シアノバクテリア *Gloeobacter violaceus* のゲノムから、グロエオバクターロドプシン (GR) が発見された。先行研究より、GRはプロトンポンプであることが明らかになった。本研究 Part II において、我々は、GRが (iii) 界面活性剤可溶化系および生体膜上で三量体を形成すること、(iv) pH 依存的な単量体-三量体-多量体の構造転移を生じること、を発見した。特に、単量体-三量体の転移には、プロトン輸送反応に重要なアスパラギン酸 (プロトンアクセプター) のプロトン化状態が密接に関係していた。これは、フォトサイクル中にGRが四次構造の変化を伴って機能を果たすことを示唆している。GRを含む真正細菌由来のイオンポンプ型ロドプシンでは、プロトンアクセプターと相互作用するヒスチジンが保存されている。GRにおけるその役割を調べたところ、ヒスチジンは三量体形成に必須のアミノ酸であることが明らかになった。本研究で発見した、保存されたヒスチジンの三量体形成に対する役割と、四次構造変化を伴うプロトン輸送反応は、他の真正細菌由来イオンポンプ型ロドプシンについても共通の性質である可能性がある。古細菌だけでなく、真正細菌においても、イオンポンプ型ロドプシンのもつ三量体構造の機能的な重要性が示唆される。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	出村	誠
副査	准教授	相沢	智康
副査	特任教授	河野	敬一
副査	特任教授	田中	勲

学位論文題名

## Studies on the Homo-Trimer Formation of Microbial Ion-Pumping Rhodopsins and Its Relationship to Their Photoreactive Functions

(微生物由来イオンポンプ型ロドプシンにおけるホモ三量体形成と光応答への影響に関する研究)

博士學位論文審査等の結果について (報告)

ロドプシンは、レチナールを補因子にもつ光受容膜タンパク質である。高等動物の網膜に存在するロドプシン (Type II ロドプシン) は、視覚の光センサーとして知られている。一方、微生物のもつロドプシン様タンパク質 (Type I ロドプシン, 微生物型ロドプシン) は、走性の光センサーだけではなく、光エネルギーを電気化学エネルギーに変換する光駆動イオンポンプとしての機能を持っている。高度好塩性古細菌の細胞膜から発見された4種類のロドプシンの研究が先行してきた。近年では、古細菌以外の微生物からも同様のロドプシン分子が発見されている。これらの分子は、7回の膜貫通 $\alpha$ ヘリックスと、7番目のヘリックスに保存されたリジン残基とシッフ塩基結合する補因子レチナールから構成された、共通の立体構造を持つ。微生物型ロドプシンは、フォトサイクルと呼ばれる光反応機構をもち、初期状態で光を受容した後、構造変化を伴って様々な光反応中間体を形成し、再び初期状態へ回復する経路を辿る光反応である。様々な分光学的解析や、光反応中間体の立体構造解析から、フォトサイクル中の特定の光反応中間体および、それらの形成過程が、イオン輸送や情報伝達を行うための重要な役割を担っていることが明らかになっている。

古細菌型ロドプシンの特徴として多量体構造を形成することが挙げられる。古細菌イオンポンプのBRおよびHRは、ホモ三量体を形成する。しかし三量体形成のメカニズムや機能的意義は明らかではなかった。さらにBRは界面活性剤存在下では単量体に解離するのに対し、HRは三量体が保持されることが先行研究により明らかになった。このことからBRとHRは異なるメカニズムで三量体構造が安定化されていると推察される。

本研究 Part I では、高度好塩好アルカリ性古細菌 *Natronomonas pharaonis* HR (NpHR) を用いて、(i) 三量体形成の相互作用部位の特定と安定化のメカニズム、および (ii) 三量体形成の機能的意義、を明らかにすることを目的とした。変異体を用いた分光測定、クロマトグラフィーによる分子量分析、量子計算により、(i) NpHR 三量体の中心部分に3回軸対称に配置されたフェニルアラニン残基 (Phe150) が、三量体形成に寄与することを明らかにした。これに対応するアミノ酸は、BRには保存されておらず、3つの対称に配置された Phe150 が、NpHR の三量体構造をBRとは異なるメカニズムで安定化していることが考えられる。さらに、

光反応中間体の速度論的解析を行ったところ、NpHRは三量体形成により、(ii)-1 初期光反応中間体の転移速度が遅くなる、(ii)-2 クロライドが放出されやすくなる、(ii)-3 初期状態へ効率的に回復する、ことが明らかになった。一連の解析から、単量体では、クロライドを輸送しない光反応経路を経由することが考えられた。このことから、本研究ではNpHRの三量体構造は、光反応を最適な経路で、効率的にイオン輸送できるように制御するために必須であると結論した。

このような三量体と、その構造形成の詳細については、BR・HR以外のロドプシンではほとんど知られていない。2003年、シアノバクテリア *Gloeobacter violaceus* のゲノムから、グロエオバクターロドプシン (GR) が発見された。先行研究より、GRはプロトンポンプであることが明らかになった。本研究 Part IIにおいて、GRが (iii) 界面活性剤可溶化系および生体膜上で三量体を形成する、(iv) pH 依存的な単量体-三量体-多量体の構造転移を生じることを発見した。特に、単量体-三量体の転移には、プロトン輸送反応に重要なアスパラギン酸 (プロトンアクセプター) のプロトン化状態が密接に関係していた。これは、フォトサイクル中にGRが四次構造の変化を伴って機能を果たすことを示唆している。GRを含む真正細菌由来のイオンポンプ型ロドプシンでは、プロトンアクセプターと相互作用するヒスチジンが保存されている。GRにおけるその役割を調べたところ、ヒスチジンは三量体形成に必須のアミノ酸であることが明らかになった。本研究で発見した、保存されたヒスチジンの三量体形成に対する役割と、四次構造変化を伴うプロトン輸送反応は、他の真正細菌由来イオンポンプ型ロドプシンについても共通の性質である可能性がある。古細菌だけでなく、真正細菌においても、イオンポンプ型ロドプシンのもつ三量体構造の機能的な重要性が示唆される。

これを要するに、著者は、微生物ロドプシンにおけるホモ三量体形成と光反応への新知見を得たものであり、光生物学・生物物理学に対して多大な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。