



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the role of Thr218 in the Light-Driven Anion Pump Halorhodopsin from Natronomonas pharaonis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	柴崎, 宏介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11400号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55702
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kousuke_Shibasaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 柴崎 宏介

学 位 論 文 題 名

Study on the role of Thr218 in the Light-Driven Anion Pump Halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*

（*Natronomonas pharaonis* の持つ光駆動アニオンポンプ:ハロロドプシンの 218 番目の
レオニン残基の役割に関する研究）

細胞膜を介した、様々なイオンの分布によって生じる電気化学エネルギー勾配は、様々な膜輸送に利用される。この膜を介したエネルギー勾配を作る輸送体で、最も研究が進んでいるものに、バクテリオロドプシン（BR）がある。BR は、高度好塩性古細菌の細胞膜に存在する、Archaeal rhodopsin の仲間、光エネルギーを受容して、プロトン（H⁺）を内側から外側に排出する膜タンパク質である。BR は分子内に発色団のレチナールを持つ。このレチナールが光エネルギーで異性化すると、フォトサイクルという一連の構造変化を誘発し、一個のプロトンを一方向に輸送し、元の状態に戻る反応である。フォトサイクル中の BR 中間体は、可視吸収スペクトル変化を伴い、リアルタイムで追跡可能なため、フォトサイクル中の様々な知見が得られる。

BR のプロトン輸送の中で、一番の問題は、「なぜ電気化学エネルギー勾配に逆らって、プロトンを一方向に輸送できるか」である。その問題を解くカギは、Archaeal rhodopsin ファミリーの構造類似性にある。Archaeal rhodopsin は、7 回の膜貫通 α ヘリックスが寄り添って、内側にイオンの通り道（チャンネル）を形成する。中心部には、運ぶイオンを保持して、イオンの輸送方向を決める、シッフ塩基（7 番目のヘリックスに保存されたリジン残基の側鎖とレチナールが結合したプロトン化したシッフ結合）を持つ。従って、Archaeal rhodopsin のチャンネルは、シッフ塩基によって、細胞外側、ないしは細胞内側に面している部分の二つに分けられる。そのうち、細胞外側のチャンネルは、親水性のアミノ酸残基や結合水が多く、チャンネル全体に水素結合ネットワークがはりめぐられているが、内側のチャンネルには、ほとんどが疎水性アミノ酸残基で、基底状態ではイオン透過が困難な構造になっている。このことから、内側のチャンネルをイオンが一方向に移動するのは、非常に難しい。これが、イオンの逆流を防いでいる反面、能動輸送する際の大きな障害となっていると考えられる。BR では、この障壁を、「細胞内側のヘリックスを開いて、細胞内側のチャンネルに、外部から水分子を流入させる時のみ、イオンを一方向に移動させる」ことで、解決していることが、過去に報告され、チャンネルへの水分子の流入は、BR の 32mL/mol の体

積増加として観測されている。

一方、Archaeal rhodopsin 構造ファミリーであり、BR と類似した構造を持つハロロドプシン (HR) のイオン輸送機構は未だ不明な点が多い。HR は、暗状態では、プロトン化したシッフ塩基付近の細胞外側にクロライドイオンを保持し、光エネルギーを受容すると、細胞質側にクロライドイオンを運んで、放出し、外側から、新しいアニオンを取り入れる。クロライドイオンは、プロトンと比べ、イオン半径が大きく水和能も異なるので、クロライド輸送には、プロトンとは異なる構造的制限や輸送機構が存在すると推察される。これまでに高度好塩好アルカリ古細菌である *Natronomonas pharaonis* のもつ HR (NpHR) では、親水的な細胞外側のサイトにクロライドイオンを保持するためには、特定の親水性残基とチャネル内の結合水が、イオンと水素結合ネットワークを形成することが必要であることがわかっている。しかし、NpHR の細胞内側へのイオン放出機構はまだ明らかではない。そこで、疎水的な細胞内側のチャネルの中で、数少ない親水性残基である 218 番目のトレオニンに着目し、その役割を解明することを目的とした。

トレオニン 218 番目の様々な変異体を作成し、フォトサイクル (イオン輸送中の構造変化) とイオン輸送活性を測定した。NpHR のフォトサイクルは、下記のようになる。NpHR $\rightarrow$ K $\rightarrow$ L₁ $\rightarrow$ L₂ $\rightarrow$ (N $\leftrightarrow$ O) $\rightarrow$ NpHR' (アルファベットは中間体の名前)。このフォトサイクルの中で、NpHR は、N 中間体から O 中間体に変化する過程 (N $\rightarrow$ O) で、NpHR はクロライドイオンを放出する。この過程は可逆反応なので、クロライドイオン放出の解離定数 ($K_{d,N\leftrightarrow O} = [O] \times [Cl^-] / [N]$) を求めることができる。本研究では、フォトサイクル中の構造中間体の吸収スペクトルと、 $K_{d,N\leftrightarrow O}$ 、およびクロライドイオンの放出に伴う体積変化 ($\Delta V_{N\leftrightarrow O} = V_{(O)} - V_{(N)}$) を算出した。これらの $K_{d,N\leftrightarrow O}$ および $\Delta V_{N\leftrightarrow O}$ について膜電位有無のイオン輸送活性への影響について変異体との関連性を調べ、下記の実験結果が得た。

- (i) $K_{d,N\leftrightarrow O}$ は野生型で最大になり、それより親水性でも疎水性でも低い値を取る。
- (ii) $\Delta V_{N\leftrightarrow O}$ も、野生型で最大になるが、バリン以外の他のアミノ酸では、有意な差が見られなかった。
- (iii) 膜電位非存在下の輸送活性は、野生型と変異体で、有意な差が見られなかった。
- (iv) 膜電位存在下の輸送活性は、 $K_{d,N\leftrightarrow O}$ が大きい変異体ほど高くなった。

以上から、NpHR の光駆動アニオンポンプが、膜電位勾配に逆らって、イオンを細胞内側に放出するためには、NpHR の構造変化に伴う水和だけでは不十分であり、218 番目のトレオニンが、特異的にクロライドイオン放出の解離定数を高く保つことによって、イオンの細胞内側への放出を可能にすることがわかった。

本研究の成果から、HR の光駆動クロライドイオン輸送には、細胞質側チャネルでは特定のアルコール性水酸基の配置とその水分子との相互作用が重要であり、BR 光駆動プロトン輸送との違いを明確にできた。本研究成果をもとに、HR の機能変換につなげる等、将来、HR 能動輸送機構の分子デザインにもつなげることを期待する。