



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 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

審査担当者 主 査 教 授 出村 誠「生命科学院」
副 査 教 授 金城政孝「生命科学院」
副 査 講 師 菊川峰志「生命科学院」

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 番目のトレオニン残基の役割に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

バクテリオロドプシン (BR) は、高度好塩性古細菌の細胞膜に存在する、Archaeal rhodopsin で、光エネルギーを受容して、プロトンを内側から外側に排出する膜タンパク質である。BR の光駆動プロトン輸送系で最も興味深い観点は、「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 のチャネルは、レチナールが結合したシッフ塩基によって、細胞外側と細胞内側に面している部分の二つに分けられる。細胞外側のチャネルは、親水性のアミノ酸残基や結合水が多く、チャネル全体に水素結合ネットワークがはりめぐらされているが、内側のチャネルには、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。この基底状態のままではチャネル内をイオンが一方向に移動するのは非常に難しい。BR ではこの障壁を越えるため「細胞内側のヘリックスを開いて、細胞内側のチャネルに、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るハロロドプシン (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取り込み、細胞外側から、新しいクロライドを取り入れる。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

サイトについて、クロライドイオンと水素結合ネットワークを形成する結合部位がわかっている。しかし、NpHR の細胞内側へのイオン取込み機構はまだ明らかではない。そこで本研究では、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。

NpHR のフォトサイクルは、 $\text{NpHR} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{L1} \rightarrow \text{L2} \rightarrow (\text{N} \leftrightarrow \text{O}) \rightarrow \text{NpHR}'$ の中間体を示す。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 ($\text{N} \rightarrow \text{O}$) 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 ($K_{\text{d,N} \leftrightarrow \text{O}} = [\text{O}] \times [\text{Cl}^-] / [\text{N}]$) 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、 $K_{\text{d,N} \leftrightarrow \text{O}}$ 、およびクロライドイオンの放出に伴う体積変化 ($\Delta V_{\text{N} \rightarrow \text{O}} = V_{\text{O}} - V_{\text{N}}$) を算出した。これらの $K_{\text{d,N} \leftrightarrow \text{O}}$ および $\Delta V_{\text{N} \rightarrow \text{O}}$ 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) $K_{\text{d,N} \leftrightarrow \text{O}}$ 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) $\Delta V_{\text{N} \rightarrow \text{O}}$ が野生型で最大となるが、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、 $K_{\text{d,N} \leftrightarrow \text{O}}$ 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取込むためには、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。

これを要するに、著者は、NpHR の光駆動ポンプ機能について 218 番目のトレオニン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。