



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the photochemical reaction of actinorhodopsin and its mediated phototrophy in the natural host [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中村, 模太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12724号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65550
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shintaro_Nakamura_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 中村 槇太郎

	主 査	教 授	出村 誠
審査担当者	副 査	教 授	姚 関
	副 査	講 師	菊川 峰志

学 位 論 文 題 名

Study on the photochemical reaction of actinorhodopsin and its mediated phototrophy in
the natural host

(アクチノロドプシンの光化学反応と宿主細胞における機能的発現に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

微生物型ロドプシンは、微生物の細胞膜に存在する 7 回膜貫通タンパク質の一種で、発色団としてレチナールを有している。これまでに最もよく研究されているものの例として、高度好塩性古細菌由来のバクテリオロドプシン（Bacteriorhodopsin, BR）が挙げられる。古細菌のような、ごく一部の限られた微生物がもっている膜タンパク質であると思われていたが、2000 年に海洋性微生物に対する網羅的な遺伝子解析が行われた結果、ロドプシン遺伝子が存在しているという報告がなされた。これらのロドプシンは、プロテオロドプシン（Proteorhodopsin, PR）と命名され、BR と同様にレチナールを発色団にもっている事、光を吸収して基底状態（Dark 状態）から様々な中間体へ構造を変化させ、再び Dark 状態へ戻る「フォトサイクル反応」が起こる事、その反応中に 1 つのプロトン細胞外へ放出するプロトンポンプとして機能する事が明らかとなった。また後年、プロトン放出することで形成されるプロトンの濃度勾配を利用して、ATP 合成に寄与している事や、あらゆる海洋性微生物が PR 遺伝子を有している事などが判明した。これは、海洋に生息する多くの微生物が、ロドプシンを利用して太陽からの光エネルギーを取り込んでいる事を意味しており、太陽から生態系へ取り込まれる光エネルギー量は、従来考えられていた量よりも遥かに多い事が明らかとなった。一方、淡水域に生息する微生物からもロドプシン遺伝子が発見された。2008 年に発見されたこのロドプシンは放線菌（Actinobacteria）由来であったことから、アクチノロドプシン（Actinorhodopsin, ActR）と命名された。ActR は世界各地の池や川に生息する放線菌から発見された。放線菌は淡水域に生息する全細菌の中でも 50 %以上を占めるグループ

プである事が知られているため、海洋性微生物の場合と同様に、大部分の淡水性微生物もロドプシンを利用して、太陽光をエネルギーとして取り込んでいる可能性がある。しかし、ロドプシン遺伝子の存在が認められた一方で、それを放線菌自身が機能的に発現している事を示す報告は無く、よって、放線菌がロドプシンを介して、光エネルギーを利用しているという証拠も存在しない。本研究では、ActR がエネルギー取り込みに関与している事の証明及びフォトサイクル反応中の分子機構の解明を目的とした。

第1章では、ActR が ATP 合成の光駆動に寄与している事を示した。研究対象として、タンザニアの池から採取された放線菌 *Candidatus Rhodoluna planktonica* MWH-Dar1 株を用いた。この放線菌株は液体培養が可能であり、かつ、degenerate PCR を用いた先行研究によって、ActR 遺伝子を持つことが明らかとなっていた (Sharma *et al.*, 2009, *ISME J.*)。3 サイクルの single colony isolation によって、純粋培養した後、ゲノム解析を実施した。その結果、MWH-Dar1 は、ロドプシン遺伝子として ActR のみを持つことが判った。以後、この ActR を RpActR (*Rhodoluna planktonica* ActR) と呼ぶことにした。また、レチナル合成酵素群の存在も明らかとなった。NSY 培地で培養された MWH-Dar1 に 535 nm の単色光を照射すると、外液の pH が減少した。また、光照射によって MWH-Dar1 の ATP レベルが 1.5 倍まで増加した。これらの現象は、プロトノフォアの CCCP やレチナル合成阻害剤のニコチンを添加すると認められなかったことから、RpActR は放線菌内でプロトンポンプとしてはたらき、ATP 合成の光駆動に寄与している事が明らかとなった。淡水性微生物がロドプシンを利用してエネルギーを取り込んでいる事を示した報告は、本研究が初めてである。

第2章では、RpActR の分子機構に注目した。本研究では RpActR の大腸菌発現系を構築し、534 nm に吸収極大をもつ精製 RpActR を充分量得ることができたため、これを利用して分子機構の解明を目指した。プロトンポンプ型ロドプシンは、シッフ塩基と複数のアミノ酸残基間で、多段階のプロトン移動反応を行い、フォトサイクルを一周する間に、正味1個のプロトンを細胞質側から外側へ輸送する。一連の反応の中で最も重要なのは、プロトン化シッフ塩基から、近傍に位置する Asp 残基 (アクセプター残基) へのプロトン移動反応である。この最初のプロトン移動は、後続のプロトン移動が起こるために必須である。よって、アクセプター残基の pKa は、プロトンポンプとして機能し得る pH の下限を表す。吸収スペクトルの pH 依存性から求めた RpActR の pKa は 5.8 であった。PR と BR の対応する値は、7.0 と 2.6 である。PR の存在する海洋環境は弱アルカリ性であるが、RpActR と BR は中性 pH 環境に存在する。よって、RpActR は、BR のように強い酸性 pH では働けないが、自身の生息環境で働くためには十分な pKa を持っていると考えられる。更に、フォトサイクル反応の解明を目指した。RpActR のフォトサイクルは、400 nm に吸収をもち、シッフ塩基からアクセプター残基へプロトンが受け渡された状態である M 中間体と、BR における O 中間体と同様に 620 nm に吸収をもつ P₆₂₀ 中間体、Dark 状態と近い吸収波長をもつ RpActR' 中間体の3つによって構成されている事を示した。RpActR のフォトサイクル反応のユニークな特徴は以下の3点である。(1) BR や PR の M 中間体よりも遥かに M 中間体の生成が速い。

M 中間体の生成は、上述した最初のプロトン移動反応「プロトン化シッフ塩基からアクセプター残基へのプロトン移動」に対応する。BR, PR, RpActR 間において、シッフ塩基やアクセプター残基周辺のアミノ酸残基に特徴的な違いはない。よって、RpActR では、シッフ塩基周辺残基の相対的な配置が BR や PR とは異なる、あるいは、レチナールの光異性化に伴う構造変化速度が、BR や PR に比べて著しく速いことが考えられる。(2) P₆₂₀ 中間体は、BR における O 中間体とは異なり、アルカリ pH において崩壊が遅くなり、蓄積される。他のロドプシン（センサリーロドプシン II）において、O 中間体の崩壊速度はアクセプター残基の pKa 値に依存する事が報告されている事から、RpActR における P₆₂₀ 中間体の蓄積は、アクセプター残基の pKa がフォトサイクル中に大きく変化している事が考えられた。(3) pH 7 以上の時、「プロトンが先に放出され、後から取り込まれる」サイクルと、「プロトンが先に取り込まれ、後から放出される」サイクルの 2 種類が混在して現れる。このことから、RpActR には異質性が存在すると考察した。前者のサイクルでは、アクセプター残基がプロトン化した後、未知の残基がプロトン放出基として働き出している。BR では、Glu194 と Glu204 の複合体が、このようなプロトン放出基として働き、結果としてアクセプター残基の pKa を上昇させる。この pKa の上昇は、プロトンがアクセプター残基からシッフ塩基へ逆流することを防ぐと考えられている。RpActR では、BR の Glu194, Glu204 は保存されていない。しかし、未知の残基からのプロトン放出は、BR と同様に、より強いポンプ活性の発現に寄与が示唆された。

以上より、本学論文では、アクチノロドプシンの宿主細胞における機能的発現に初めて成功するとともに、アクチノロドプシンでは既知のプロトンポンプ型ロドプシンには認められないフォトサイクルの特徴を解明したと結論され、放線菌が淡水環境下で生存するために不可欠な光応答性の新規の生理機能解明に対して貢献するところ大なる物がある。

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。