



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional analysis of a novel cyanobacterial rhodopsin [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	長谷見, 崇俊
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12725号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65558
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takatoshi_Hasemi_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 長谷見 崇俊

主 査 教 授 出村 誠
審査担当者 副 査 教 授 金城 政孝
副 査 講 師 菊川 峰志

学 位 論 文 題 名

Functional analysis of a novel cyanobacterial rhodopsin
(シアノバクテリアに由来する新規ロドプシンの機能解析)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

生物は光を情報やエネルギーとして利用するために、光受容タンパク質を用いる。微生物型ロドプシンは幅広い微生物に分布している光受容タンパク質であり、発色団 Retinal を内部に結合した 7 回膜貫通型タンパク質である。微生物型ロドプシンは *all-trans* retinal から *13-cis* retinal への光異性化を起点として、いくつかの構造中間体を經由しながら光反応サイクルを回る。この過程を経ることで、光駆動型イオンポンプ、走光性センサー、光開閉型イオンチャネルなど特定の機能を発現する。イオンポンプ型ロドプシンは外向きプロトン(H^+)ポンプ、外向きナトリウムイオン(Na^+)ポンプ、内向きクロライドイオン(Cl^-)ポンプの 3 種類に大別される。微生物型ロドプシンは 1970-80 年代にかけて高度好塩性古細菌から発見された。その後、遺伝子解析技術の発展により 1999 年以降に藻類、真菌類、海洋性真正細菌など様々な生物種のゲノム上から見つかり、近年、多様な微生物がイオンポンプ型ロドプシンをもつことが明らかとなってきた。本学位論文では、シアノバクテリアに由来する新規ロドプシンの探索とその機能解析を目的とし、新規の光駆動型イオンポンプの Cl^- 輸送ポンプ機能の変換、及びフォトサイクルを詳細に解析した。

第一章では、シアノバクテリアに由来する新規 Cl^- ポンプの発見と H^+ ポンプへの機能変換についてまとめた。(1) 新規ロドプシン群の発見：本研究で新たに探索したロドプシンの遺伝子は、シアノバクテリアのゲノム上のみから発見され、既知の微生物型ロドプシンと異なる分類群を形成していた。既知のイオンポンプ型ロドプシンと一次構造を比較した結果、 Cl^- ポンプの Cl^- 結合に重要なスレオニンとセリンが保存する一方で、 H^+ ポンプの H^+ ドナーや H^+ 放出基にあたる残基も保存していた。すなわち、これらのロドプシン群は Cl^- ポンプと H^+ ポンプ両方に特徴的な残基

を有することがわかった。(2) Cl^- ポンプのキャラクタリゼーション：*Mastigocladopsis repens* 由来の新規分類群に属するロドプシン(以下 MrHR)の大腸菌発現系を構築し、機能解析を行った。大腸菌を用いた光照射イオン輸送活性測定の結果、MrHR は内向き Cl^- ポンプ活性を示したことから、新規ロドプシン群が Cl^- ポンプとして機能することを特定した。Flash photolysis 測定の結果、 Cl^- 結合時の MrHR は高度好塩性古細菌由来の Cl^- ポンプ型ロドプシンである HR に似た光中間体を生成する光反応サイクルを回ることがわかった。一方で既知の Cl^- ポンプのフォトサイクルの収束が 0.1 秒以内であるのに対して、MrHR のフォトサイクルは収束に 10 秒かかる。MrHR は既知の Cl^- ポンプと比べてフォトサイクルが遅いため、その輸送効率は低いと考えられた。(3) H^+ ポンプへの機能変換：イオンポンプ型ロドプシンのアミノ酸置換による機能変換実験は、イオン輸送機構を知るうえで有益な情報を提供する。これまでに H^+ ポンプから Cl^- ポンプへ変換の成功例はあるものの、 Cl^- ポンプから H^+ ポンプへの機能変換は達成されていない。前述の通り、MrHR は既知の Cl^- ポンプとは異なり、 H^+ ポンプに重要な残基を保存している。よって、MrHR の 74 番目のスレオニン(T)をアスパラギン酸(D)に置換して H^+ アクセプターを導入した T74D 変異体を作製し、機能解析を行った。光照射イオン輸送活性測定の結果、T74D 変異体は外向きの能動的な H^+ ポンプ活性を示した。Flash photolysis 測定により光反応中に retinal Schiff 塩基の H^+ が H^+ アクセプターに移動する過程と、 H^+ ドナーによる Schiff 塩基の再プロトン化の過程を観測できた。したがって、導入した H^+ アクセプターと MrHR に保存されていた H^+ ドナーが正常に機能していることが確かめられた。MrHR はわずか一個のアミノ酸置換によって、 H^+ ポンプとして機能する。また、保存されていた H^+ ドナーは野生型の Cl^- 輸送活性に影響を与えない一方で、 H^+ ポンプ変異体では H^+ ドナーとして機能する。したがって、MrHR は H^+ ポンプから進化した Cl^- ポンプであるがそのアミノ酸残基や構造は Cl^- 輸送に最適化されていないと考えられる。

第二章では、MrHR とその変異体の光反応を測定し、MrHR の Cl^- 輸送サイクルを解析した。

(1) MrHR の Cl^- 輸送時のフォトサイクル：MrHR は暗状態で I^- (ヨウ素イオン)を結合するが I^- を輸送できない。これは I^- 結合型の MrHR は光反応中にタンパク質内部でアニオンの移動が起こらないためである。よって、 Cl^- 存在下と I^- 存在下のフォトサイクルを比較することで、タンパク質内部でアニオンの移動が起こる光反応過程の特定を試みた。その結果、L 中間体の崩壊に伴って Cl^- がタンパク質内部にて細胞外側から細胞質側へ移動することが示唆された。(2) Cl^- の結合・輸送に関わる残基の特定：アミノ酸置換体を用いて、 Cl^- の結合や輸送に重要なアミノ酸残基を特定した。 Cl^- 添加時の吸収スペクトルの変化から、MrHR の Cl^- 結合には R71, T74, S78, E182 が重要な残基であるとわかった。これらに相当する残基は高度好塩性古細菌由来の Cl^- ポンプ NpHR でも Cl^- 結合に重要である。興味深いことに野生型 MrHR の D200 が基底状態で H^+ 化していることが示唆された。D200 に相当する残基は多くの微生物型ロドプシンで保存され、暗状態・光反応時ともに脱 H^+ 化していると考えられている。また、D200N 変異体は Cl^- 輸送活性を示さなかった。したがって、D200 が光反応中に脱 H^+ 化することが Cl^- 輸送に必須であることが示唆された。(3) MrHR の光誘起 H^+ 放出反応：MrHR の光反応と光誘起 H^+ 移動反応のタイミ

ングを比較した結果、L 中間体の崩壊に伴ってタンパク質外部への H^+ 放出が生じていることが明らかになった。この信号は I^- 存在下では見られないことから、 Cl^- 輸送に重要な H^+ 放出であると推定される。MrHR 変異体に同様の測定を行った結果、D200N 変異体のみ、この H^+ 放出信号が見られなかった。したがって、L 中間体崩壊時に D200 の脱 H^+ 化が起こることが、タンパク質内部での Cl^- の移動に必須であることが示唆された。第二章の結果から、本研究で新規に発見した MrHR は既知の Cl^- ポンプとは異なる輸送プロセスを持つと結論できる。また、第一章と第二章の結果から、 H^+ ポンプ型ロドプシンから進化した Cl^- ポンプ型ロドプシンが、その Cl^- ポンプ機能を最適化する過程において、D200 に相当する残基を暗状態・光反応時ともに脱 H^+ 化した状態で維持する機構を獲得することが示唆された。

以上より、本学位論文は、シアノバクテリアに由来する Cl^- ポンプ型ロドプシンに関する世界初の研究成果であり、特にアミノ酸置換による Cl^- ポンプの H^+ ポンプへの機能変換の初の成功例と結論され、微生物型ロドプシンの研究分野においてイオン輸送機構分子レベルの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。