



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis of the Substrate Uptake and Release Reactions of the Light-Driven Sodium-Pump Rhodopsin [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	村部, 圭祐
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(ソフトマター科学)
Dissertation Number	甲第14406号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82030
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Murabe_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 (ワトナ-解) 氏 名 村部 圭祐

学 位 論 文 題 名

Analysis of the Substrate Uptake and Release Reactions of the Light-Driven Sodium-Pump Rhodopsin

(光駆動ナトリウムポンプロドプシンによる基質の取込み・放出反応の解析)

膜タンパク質が行う膜輸送は、生体膜上で行われる重要な生命現象の一つである。膜輸送タンパク質は、構造の異なる複数の中間体を経由することで、輸送に必要な素反応を進行させ、膜輸送を実現している。これらの素反応の中でも、膜の片側での「基質の取込み反応」と、反対側での「基質の放出反応」は、特徴的な構造変化を伴う最重要な過程であると考えられている。これらの過程では、タンパク質内部が溶液に露出されるが、これに伴う基質のリークを抑えるために、露出は二つの溶液に対して、交互に行う必要があるためである。よって、膜輸送タンパク質の分子機構を解明していくためには、基質の放出と取込みが起こる中間体を同定し、解析していく必要があるが、これらの同定は非常に困難である。それは、中間体の形成と崩壊のタイミングとともに、基質の取込みと放出のタイミングも検出する手法が必要なためである。本研究では、光で駆動される Na^+ ポンプロドプシン (NaR) を試料として、直接的な観測によって、これらの中間体の同定を行った。

NaR が属する微生物型ロドプシンファミリーは、幅広く微生物に分布する光受容タンパク質ファミリーであり、発色団レチナールを内部に結合した 7 回膜貫通ヘリックスを基本構造としている。光を受容した微生物型ロドプシンは、*all-trans* から *13-cis* へのレチナールの光異性を起点として、いくつかの構造中間体を経由しながら光反応サイクルを回る中で、光駆動型イオンポンプ、光センサー、光開閉型イオンチャネル、更には、光で活性化される酵素などの多様な機能を果たす。これらの中でイオンポンプロドプシンは微生物界で最も広く分布している。NaR は、イオンポンプとしては、3 番目に見出されたロドプシンであり、他の H^+ ポンプ、 Cl^- ポンプとは異なり、光活性化された後に、基質である Na^+ を取込み、次いで放出して元に戻ると考えられている。吸収分光測定や結晶構造解析の結果から、 Na^+ の取込みと放出は、O 中間体の形成及び崩壊中に起こると予想されている。一方、QM/MM 研究では Na^+ の取込みは、O ではなく初期の中間体の形成中であるとされている。このように様々な研究報告があるが、いずれもが Na^+ 取込み・放出を間接的に調べた結果であり、これらが起こる中間体の確定には至っていない。本研究では、直接的な測定によって、これらの中間体を同定することを試みた。そのために、 Na^+ 選択膜を使用した。

本論文では、実験結果を以下の二部に分けて示した。

第一部では、 Na^+ 選択膜を使用した膜電位の検出と Na^+ 選択膜の Na^+ 応答性について報告した。

(1) Na^+ 輸送反応のための Na^+ 選択膜の適用 : H^+ ポンプロドプシンの場合、 H^+ の取込みと放出のタイミングは、従来 pH 指示薬であるピラニンを用いて検出されてきた。これはピラニンの H^+ 解離定数と H^+ ポンプによる H^+ 濃度の変化(約 $0.1 \sim 1 \mu\text{M}$)が近いことで、検出可能であったためである。 Na^+ の場合も指示薬は存在するが、その解離定数はピラニンよりも非常に高いため、NaR を高いレベルに濃縮し、高効率で光活性化できない限り、 Na^+ 濃度変化の検出は困難である。本研究では、指示薬の代わりに Na^+ イオノフォアを含む Na^+ 選択膜を使用した。

(2) Na^+ 選択膜の調製とこれを用いた膜電位の検出 : Na^+ 選択膜は、ポリ塩化ビニルを支持膜とし、 Na^+ イオノフォアと可塑剤としてそれぞれ Bis(12-crown-4)と NPOE を使用して調製

した。この膜を 2 つのテフロンチャンバー間に挿入し電気化学セルを構成した。膜で 2 つの溶液が分離されると、それぞれの溶液・膜界面で、 Na^+ 濃度に依存した相境界電位が発生する。膜電位は 2 つの相境界電位の和であり、ネルンストの式で記述できる。

(3) Na^+ 選択膜の Na^+ 応答性の確認：初めに Na^+ 選択膜の Na^+ 応答性を確認した。参照溶液の Na^+ 濃度を維持しつつ、サンプル溶液の Na^+ 濃度を変更し膜電位を測定したところ、広い Na^+ 濃度範囲で -50.0 mV/decade と良い応答性を示し、 Na^+ 選択膜が実際に Na^+ 濃度を感知していることを示した。

第二部では、 Na^+ 選択膜を用いた NaR による Na^+ の取込み・放出反応を直接検出した結果と、過渡吸収分光測定結果との比較による Na^+ 輸送に関連する中間体を特定した結果について報告する。

(1) 定常光を用いた Na^+ の取込み・放出反応の検出：NaR による Na^+ 濃度変化を検出するため、脂質再構成した NaR を膜の一方のみ堆積させ、膜近傍で大きな Na^+ 濃度変化を引き起こすようにした。 Na^+ 濃度変化に応じて NaR で覆われた側のみ相境界電位が変化し、膜電位変化が生じる。相境界電位の変化は急速に起こるため、光誘起的な Na^+ 濃度変化に追従出来る。光照射に際し、NaR で覆われた溶液側で正の電位変化が観測された。これは NaR が Na^+ の減少を誘発したことを示している。従って、NaR は、光活性化された後に初めて Na^+ を取込むことが実験的に確認された。また、活性を消失した NaR 変異体と H^+ ポンプロドプシンであるプロテオロドプシン (PR) を用いて同様の測定を行ったが、膜電位の変化は見られなかった。従って、 Na^+ 選択膜が検出する電位変化は、NaR によって引き起こされる Na^+ 濃度変化のみを反映していることが確認された。

(2) Na^+ の取込み・放出に関連する中間体：これらの中間体を特定するため、ナノ秒レーザーパルスを用いて 2 種の測定を行った。1 つ目は過渡吸収分光測定で、2 つ目は膜電位測定である。過渡吸収分光測定では、初期の K 中間体の崩壊とともに、短波長側に L 中間体と M 中間体の平衡状態が観測され、さらに、それらの崩壊とともに、長波長側に O 中間体が観測された。また、 Na^+ 濃度の増加によって、O 中間体の生成速度の加速と蓄積量の増大が見られた。膜電位測定においては、約 10-100 ミリ秒で大きな正のピークが見られた。O 中間体の蓄積も同じ時間領域で最大に達するため、O 中間体が Na^+ 輸送に関わることが示唆された。次にこれら 2 つの結果から O 中間体の蓄積と Na^+ 濃度変化の時間経過を比較した。その結果、 Na^+ 濃度変化に応じてピーク位置が徐々にシフトしたにもかかわらず、これら 2 つの検出結果はよく一致した。これらの結果から、 Na^+ が O 中間体の生成及び崩壊時に取込み・放出されることが、実験的に明らかとなった。

本研究は、NaR が 1 度の輸送サイクル中に起こす微小な Na^+ 濃度変化を直接検出し、 Na^+ が O 中間体の生成・崩壊時に取込み・放出されることを証明した初の報告である。微小な Na^+ 濃度変化は、 Na^+ 選択膜を採用することで初めて可能となったが、この膜測定を、種々のアミノ酸置換変異体に適用することで、それぞれのアミノ酸の役割を調べていくことも可能である。例えば、イオン取込み能力を保持するが、イオン輸送活性を欠いている変異体が見つかった場合、変異した残基はイオン取込み後のプロセスで重要な役割を果たしているはずである。更に、この膜は使用するイオノフォアを変更することにより、他のイオン輸送ロドプシンの機能解析にも適用可能なツールとなる。本研究の成果は、イオン輸送型ロドプシンの機能解析の更なる進展に貢献できると考えられる。