



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_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(リフトマター科学) 氏 名 村 部 圭 祐

審査担当者

主査	教 授	出村 誠
副査	教 授	黒川 孝幸
副査	講 師	菊川 峰志

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)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

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、「基質の取込み反応と放出反応」は、特徴的な構造変化を伴う最重要な過程である。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。この膜輸送タンパク質の分子機構の素過程を解明するためには、過渡的に誘起される基質の放出と取込みが起こる中間体を同定し、解析する必要があるがこ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 $\mu\text{s}\sim\text{ms}$ オーダーで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、直接的に観測可能とする Na^+ 選択膜を使用した検出方法の開発に成功し、その技術によって NaR の Na^+ ポンプ機構の中間体仮説を解明することができた。

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化を起点として、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に成功した。

学位論文では二部構成とした。第一部では、 Na^+ 輸送反応のための Na^+ 選択膜の適用、 Na^+ 選択膜の調製とこれを用いた膜電位の検出、 Na^+ 選択膜の Na^+ 応答性能について報告した。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した。

本研究は、NaR が輸送 1 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。

これを要するに、著者は、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・放出反応の解析から新知見を得たものであり、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（ソフトマター科学）の学位を授与される資格あるものと認める。