

氏 名 藤原 邦代

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1622 号

学位授与の日付 平成25年9月27日

学位授与の要件 物理科学研究科 構造分子科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 時間分解フーリエ変換赤外分光計測による光駆動型塩化物イオンポンプタンパク質ファラオニス・ハロドプシンのイオン輸送機構に関する研究

論文審査委員 主 査 教授 加藤 晃一
准教授 古谷 祐詞
教授 大島 康裕
准教授 西村 勝之
特任教授 宇理須 恒雄 名古屋大学
准教授 須藤 雄気 名古屋大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

第 1 章で、本研究の背景と研究目的を記述する。科学技術の進歩と共に、X 線結晶構造本論文は、光駆動型塩化物イオンポンプタンパク質であるファラオニス・ハロロドプシン (pHR) に対し、時間分解フーリエ変換赤外分光法を適用し、光励起のタンパク質の構造変化や水分子の水素結合変化などを解析し、イオン輸送の分子機構に関する研究結果をまとめたものである。

解析、NMR 分光法、電子顕微鏡解析などの様々な構造解析技術における空間分解能は飛躍的に向上し、様々なタンパク質の構造が原子レベルで明かされてきた。一例に、構造と機能の関連についての研究が最も進んでいる光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (BR)、および光駆動塩化物イオンポンプであるハロロドプシン (HR) を取り上げる。BR と HR は、共に *all-trans* 型のレチナールを発色団として結合し、570 nm 付近に吸収極大を示す。また、13-*cis* 型への光異性化により、光反応サイクルを開始する。HR では、K, L₁, L₂, N, O, HR' といった一連の中間体を形成し、元の HR に戻る。この間、タンパク質の構造を変化させ、塩化物イオンを細胞外側から細胞内側へと一方向に輸送する。本研究で対象としている pHR は、HR の一種であるが低塩濃度でも安定であり、塩化物イオン輸送の分子機構を詳細に調べるのに適したタンパク質である。本研究の目的は、時間分解フーリエ変換赤外分光計測により、pHR におけるタンパク質の構造変化およびタンパク質内部に存在する水分子の水素結合変化を明らかにし、タンパク質内部を塩化物イオンがどのようにして一方向に輸送されるのかを明らかにすることである。第 1 章には、本研究の研究手法であるフーリエ変換赤外分光計測の原理も記述している。

第 2 章では、本研究の手法を、pHR タンパク質の大量発現と精製操作、赤外分光計測用試料の調製、赤外分光計測、データ解析の過程に分けて説明している。pHR タンパク質は、大腸菌に pHR の遺伝子配列を含むプラスミドを導入し、大量発現させた後、超音波破碎し、菌体膜断片から界面活性剤により膜タンパク質を可溶化した。その後、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製した。精製した可溶化 pHR を卵黄由来フォスファチジルコリンと混合し、界面活性剤を取り除くことで脂質二重膜に再構成した。次に、赤外分光計測の条件に応じた緩衝液に懸濁した pHR 試料を、CaF₂ 基板上に滴下し、冷蔵庫にて一晩かけて乾燥させ、フィルム状試料を得た。次に、20 % のグリセロールを含む H₂O または H₂18O の液滴と共に封入し、試料を程よく水和した後、赤外分光装置に設置した。532 nm のナノ秒 Nd-YAG パルスレーザー光 (10 Hz 周期) で励起し、12.5 μs の時間分解能で赤外分光計測を行った。最後に、時系列スペクトルデータに対し、MATLAB による特異値分解とグローバルフィッティング解析を行い、光反応サイクル中に形成される中間体のスペクトルとその時定数を得た。

第 3 章では、時間分解赤外分光実験の結果をまとめている。pHR の野生型を用いた計測を詳述した後、各種変異型 pHR を用いた計測について記した。先に、野生型 pHR 試料を様々な硝酸イオン濃度で顕微赤外分光計測を行った。5 mM または 0.2 mM の NaNO₃ を含

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

むリン酸緩衝液(pH 7.0)で調製した pHR 試料では、NO₃⁻はフィルム状試料に周辺部を除き均一な分布であることを確認した。また、硝酸イオン濃度はフィルム状試料中では 150 倍程度に濃縮され、各々 750 mM と 30 mM の実行濃度になると推定した。Cl⁻を含むリン酸緩衝液で調製した試料の時間分解赤外分光計測より、750 mM では、N 中間体が蓄積し、30 mM では O 中間体が蓄積するというようにイオン濃度の調整で、フィルム状試料においても N, O 中間体の平衡状態を制御できることを示した。同時に、OH 伸縮振動領域(3800-3500 cm⁻¹)について、H₂O と H₂18O 条件下で解析し、水素結合を形成していない水の OH 基 (ダングリングボンド)に帰属される信号を帰属した。さらに、この水のダングリングボンドの信号の強度が、光反応サイクルの経過で N および O 中間体の形成に伴って上昇していることを明らかにした。

また、他の一価の陰イオン(Br⁻, NO₃⁻)を含む緩衝液で調製した pHR 試料でも同様の解析を行い、Br⁻では塩化物イオンとほとんど同じ光反応サイクルを示し、NO₃⁻ではそれが早まるという結果を得た。また、この時の水のダングリングボンドの信号がそれぞれの光反応サイクルにおける N, O 中間体の形成に追従して変化することを示した。

pHR の各種変異体を用いた解析では、塩化物イオン輸送に重要であることが報告されている細胞外側アミノ酸残基 (Arg123, Thr126, Glu234) と細胞内側アミノ酸残基 (Lys215, Thr218) に注目し、かさ高さ、極性、電荷状態などを変える別のアミノ酸残基 (Thr→Ser, Val, Arg→Lys, His, Gln, Lys→Arg, Gln など) に置き換わった pHR 変異タンパク質を用いた。その結果、水のダングリングボンドの信号は、細胞外側の残基の変異により大きな影響を受けることが示された。

以上の実験結果についての考察を次のように行った。野生型 pHR における濃度依存性およびイオン種依存性を調べた結果、N, O 中間体において塩化物イオンがタンパク質内部を輸送される際に、水分子の水素結合の状態が変化することが分かった。これは、中間体における塩化物イオンの位置に関する情報が間接的に得られることを示唆している。観察されたダングリングボンドを持つ水分子がどこに存在するのかについて、変異体を用いた解析結果から、細胞外側に存在するものと推定した。pHR タンパク質内を移動する陰イオンは、最初、レチナールシッフ塩基近傍に存在し、K, L₁, L₂ 中間体ではあまり変化せず、N および O 中間体で移動していることが示唆された。これまで N 中間体において、Cl⁻の位置はレチナールの吸収波長が L₂ とほとんど同様であることから、レチナール近傍に存在すると推定されてきたが、今回の結果から、元の場所とは異なる第 2 結合部位へと移動していることが示唆された。一方、O 中間体では、これまでの報告と同様に、塩化物イオンは既に外部に放出されているか、レチナールから離れた細胞質側の結合部位に移動しているものと考えられる。

第 4 章にて、本研究で得られた結果を列挙し、研究についての総括を行っている。

附録として、pHR の赤外分光計測実験のために行った条件検討や解析等の補足を記載している。また、バクテリオルベリン色素を含む天然型の pHR における時間分解赤外分光の結果についても記載している。天然型の pHR 試料でも水のダングリングボンドの信号が、似たような変化を示したことから、本研究で得られた水のダングリングボンドの信号変化が、pHR が実際に存在する古細菌の中でも生じうるものであることを示した。

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

提出論文では、膜タンパク質の一種であり、光駆動型塩化物イオンポンプとしてはたらくファラオニス・ハロロドプシン (*pHR*) のイオン輸送機構について、時間分解フーリエ変換赤外分光計測により研究した結果がまとめられている。特に、タンパク質内部に存在する水分子に着目することで、水分子の動的な振る舞いとイオン輸送機構との関連について研究がなされている。

細胞は、脂質二重膜で内と外を分かち、内側と外側のイオンの組成や濃度を調整することで、エネルギーや情報を生み出している。そのために様々なイオンポンプが重要な役割を果たしているが、その分子機構の詳細はよく分かっていない。本論文では、光エネルギーをレチナル分子で捉え、塩化物イオンを輸送する*pHR*を研究対象とし、試料調製方法を含めて計測条件を最適化することで、時間分解赤外分光計測から水分子のO-H伸縮振動の信号を捉えることに成功している。既に報告されているX線結晶構造の静的な原子レベルでの構造情報を元に、時間分解赤外分光から得られる動的な構造情報を組み合わせることで、*pHR*の光反応過程での水の動態や、イオンの輸送過程が議論されている。

第1章では、研究の背景と目的が述べられている。赤外分光法の基礎や対象となる膜タンパク質の一種であるバクテリオロドプシンやハロロドプシンの構造や光反応機構について記述されている。また、ハロロドプシンの分子機構研究のために、時間分解フーリエ変換赤外分光法を適用する目的が記述されている。第2章では、試料の調製方法や時間分解赤外分光計測法、データ解析について記述されている。第3章では、時間分解赤外分光計測の結果が記述されている。フィルム状試料において塩濃度が適切にコントロールされていることが、顕微赤外分光計測によって確かめられている。また、高塩濃度と低塩濃度で、光反応中間体の平衡状態を変化させることで、それぞれの中間体における赤外スペクトル変化が詳細に議論されている。特に、水素結合を形成していないフリーのO-H基（ダングリングボンド）を持つ水のO-H伸縮振動が 3600 cm^{-1} 程度に観測され、その変化がタンパク質内部でイオンが移動する時間領域に対応して大きく変化することが明確に示されている。このダングリングボンドのO-H伸縮振動を指標に、タンパク質の様々な箇所にある、塩化物イオン輸送に重要な役割を果たしているアミノ酸残基を変異させた変異体についても同様の解析がなされている。その結果、細胞内側領域にあるアミノ酸残基（Lys215, Thr218）よりも、細胞外側領域にあるアミノ酸残基（Arg123, Thr126, Glu234）への変異の影響が大きいことが示されている。このことから、観測された水のO-H伸縮振動の変化は細胞外側領域に存在する水分子に由来するものと結論づけられている。第4章では研究成果がまとめられ、総括がなされている。また、付録として、*pHR*の赤外分光計測実験のために行った条件検討やデータ解析等の補足が記されている。さらに、バクテリオルベリン色素を含む天然型の*pHR*試料に対する解析も行われ、水のO-H伸縮振動の変化が同様に観測されることを確認している。

以上のように、出願者は主体的に、フィルム状試料の作製条件、時間分解赤外分光計測の条件等を検討し、ハロロドプシンの塩濃度依存的な光誘起構造変化や水分子のO-H伸縮振動の時間変化の解析に成功している。さらに、水分子の動態から輸送される塩化物イオ

(Separate Form 3)

ンの光反応中間体での位置を新たに提案しており、イオンポンプの動作機構を動的に解析する方法論の提案としての意義も深い。また、本論文の一部は国際学術雑誌1報に報告されている。従って、本審査委員会は本論文が博士（理学）の授与に値すると全員一致で判断した。