

Title	Resonance Raman Studies on Structure of Novel Rhodopsins
Author(s)	大友, 章裕
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73516
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (大友 章裕)

論文題名

Resonance Raman Studies on Structure of Novel Rhodopsins
 (共鳴ラマン分光法による新規ロドプシンの構造化学研究)

論文内容の要旨

The aim of this thesis is to reveal the relationship between function and structure of photoreceptor protein, rhodopsin. Rhodopsins possess a retinal molecule as a chromophore in common inside a protein moiety. The retinal chromophore is covalently bound to the lysine residue forming Schiff base. The photoisomerization of the retinal chromophore induces the global conformational change of protein, which generates diverse functions such as ion transport, photosensor, vision, body-color change, and more. It is important to achieve a comprehensive understanding of how rhodopsins generate various functions despite sharing a similar structural motif. To achieve this goal, firstly, I focused on the light-driven sodium ion pump, KR2. KR2 is a good model to investigate the functional and structural relationship in rhodopsin. Because KR2 works as a sodium ion pump in the presence of sodium ion but as a proton pump in the presence of larger monovalent cation, such as potassium ion. In addition, since KR2 is a first discovered protein, which functions as a sodium ion pump, the understanding of the sodium ion transport mechanism in KR2 is an overriding issue. Next, I focused on the newly discovered heliorhodopsins (HeRs), which are paid attention since they have a low homology among other rhodopsins and their function are unknown. I used resonance Raman spectroscopy in order to reveal the structure both of the retinal chromophore and the protein moiety of KR2 and HeRs and to elucidate the relationship between the function and structure.

In Chapter 1, the basic structural and functional properties of rhodopsins, which are classified into three types, and principles of Raman spectroscopy are explained. There, I describe the diverse functions of rhodopsins and the reason why I selected KR2 and HeRs as target proteins. The materials and methods are described in Chapter 2. In Chapter 3, I give detailed descriptions of the investigation of the ion binding effects on the retinal chromophore of KR2. I found that not only sodium ion but also potassium ion binds to KR2. The sodium ion binding alters the structure around the retinal chromophore, which increases the distance between the protonated Schiff base and its counter-ion. Since the ion binding site located far from the retinal chromophore, this ion binding effect suggested that the allosteric communication between the Schiff base and ion binding site. In Chapter 4, the protein structural changes during sodium ion transport in KR2 is investigated. Although the structural changes of the retinal chromophore have been studied so far, there are few investigations about them of protein moiety. I succeeded to observe the structural changes of KR2 using time-resolved ultraviolet resonance Raman spectroscopy for the first time. The time-resolved spectra indicated that some tryptophan and tyrosine residues show structural changes during sodium ion transport. By using the KR2 mutants, I proposed that a helix movement is essential for sodium ion transport. In Chapter 5, I investigated the chromophore structure of HeRs from two distinct species. I revealed that the chromophore has a distinctive geometry and forms a strong hydrogen bond with not water molecule but amino acid residue. On the basis of these spectroscopic features, we concluded that HeRs work as a photosensor. I demonstrated that resonance Raman spectroscopy is useful not only for the elucidation of the ion transport mechanism of rhodopsin but also for the study of rhodopsin of unknown function, through this thesis.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 友 章 裕)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 水谷 泰久
	副 査	教授 塚原 聡
	副 査	教授 船橋 靖博

論文審査の結果の要旨

微生物型ロドプシンは高度好塩菌から発見され、当初は特殊な生物が持つタンパク質という認識がなされていたが、2000年以降海洋真正細菌などからも発見され、自然界に広く分布することがわかってきた。大友章裕君は博士後期課程において、新規ロドプシンの中から、初めて発見されたナトリウムイオン (Na^+) ポンプ KR2 および従来のロドプシンとはアミノ酸相同性をもたない点で注目されているヘリオロドプシン (HeR) について研究を行い、以下に述べる業績を挙げた。

(1) KR2 のイオン輸送機構の解明

光駆動型イオンポンプ (以下、イオンポンプ) は、細胞膜を介したイオンの能動輸送を行う膜タンパク質である。レチナル発色団の光異性化に誘起されたタンパク質構造変化によってイオンが輸送される。これまでに、プロトン (H^+) や塩化物イオン (Cl^-) などを輸送する多種のイオンポンプが発見されている。イオンポンプ機構の謎は、これらが共通の立体構造、共通の発色団を持ち、共通の光化学反応をトリガーとしているにも関わらず、輸送するイオンはタンパク質ごとに異なる点である。 Na^+ ポンプの発見は輸送イオンの種類を増やし、この謎をさらに深めた。輸送イオンの多様性は、わずかな構造の違いによってイオンが認識・選択されていることを示唆するが、その機構を明らかにした研究例はない。

大友君は、KR2 が溶媒中のイオン種に依存して輸送機能を転換する性質に着目した。KR2 は Na^+ 存在下では Na^+ ポンプとして、 Na^+ より大きな K^+ 存在下では H^+ ポンプとして機能する。そのため、1種類のタンパク質を用いて2種類のイオン輸送機構が比較でき、イオン選択機構に重要な知見を得られると考えた。そこで、KR2 が輸送イオンを切り替える機構の解明およびイオン輸送に関与する構造ダイナミクスの解明に取り組んだ。

前者については、KR2 が持つ Na^+ 結合部位での Na^+ の有無によって、発色団とポリペプチド鎖との水素結合強度が異なることを明らかにした。興味深いのは、発色団の水素結合部位と Na^+ 結合部位とが 24 Å も離れている点である。タンパク質表面にある Na^+ 結合部位へのイオン結合が、タンパク質内部にある発色団までヘリックスの構造変化を介して伝わり、 Na^+ ポンプ機能と H^+ ポンプ機能を切り替えている機構を新たに提案した。

後者については、 Na^+ ポンプ条件と H^+ ポンプ条件とで、ミリ秒付近でみられる反応中間体のタンパク質構造を明らかにした。この反応中間体は、その生成、減衰に伴って Na^+ の取込と放出が起きるため、KR2 の機能発現には重要な中間体である。変異体を用いた実験から中間体において構造変化を示したアミノ酸残基を同定し、そこから Na^+ の取込と放出に伴うヘリックスの構造変化を推定した。

(2) HeR の発色団構造の特異性の発見

HeR は 2018 年に発見されたロドプシンである。HeR はレチナル発色団を有しており、タンパク質構造も従来の微生物型ロドプシンと類似であると考えられている。一方、アミノ酸相同性は極めて低く、微生物型ロドプシンとは異なる新たなカテゴリーに属すると考えられている。その機能も未知であり、HeR と微生物型ロドプシンとの比較研究が求められている。そこで大友君は、共鳴ラマン分光法を用いて、HeR の発色団構造を調べ、微生物型ロドプシンの発色団構造と比較した。同位体標識した HeR の発色団のスペクトルから、発色団が周囲のアミノ酸残基と強い水素結合を形成していること、発色団の特異的な幾何構造を明らかにした。さらに、水素結合の類似した特徴から HeR の生理的機能が光センサーであることが強く示唆された。

本論文の研究成果は、振動分光法の特徴を活かし、機能に重要なタンパク質の構造および構造変化を明らかにしたものであり、タンパク質の物理化学研究として意義深い。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。