



| | |
|--------------|---|
| Title | Elucidation of Structural Factors that Determine the Direction of Transport in Proton-Pumping Rhodopsins |
| Author(s) | 潤井, 泰斗 |
| Citation | 大阪大学, 2024, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/98722 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (潤 井 泰 斗)

論文題名

Elucidation of Structural Factors that Determine the Direction of Transport in Proton-Pumping Rhodopsins
(プロトンポンプロドプシンにおける輸送方向を決定する構造因子の解明)

論文内容の要旨

プロトンポンプロドプシンは、7本の膜貫通ヘリックスで構成される、光受容タンパク質である。光受容部位として、シッフ塩基を介してタンパク質内部のリシン残基と結合した全トランス形のレチナールを持つ。これまでに、外向きプロトンポンプと内向きプロトンポンプが発見されている。これらのタンパク質の全体構造と膜への配向が同じであるにもかかわらず、それぞれ反対方向にプロトンを輸送する。このことは、似たタンパク質構造であっても、異なる方向にプロトンを輸送する合理的なメカニズムの存在を示唆している。博士論文では、内向きプロトンポンプであるシゾロドプシン (SzR) の、光反応から始まる構造変化を時間分解共鳴ラマン測定で明らかにした。得られた構造変化を、外向きプロトンポンプのものと比較することで、プロトンの輸送方向を決定する構造因子を解明した。またこれらの知見は、一方向にイオンを輸送する膜貫通型トランスポーターの設計に大いに役立つものと期待される。

SzRsの未反応状態の発色団構造の解明：補欠分子の特性は、タンパク質中の隣接するアミノ酸残基との相互作用によって拡大される。ロドプシンにおけるレチナール発色団は光を吸収して異性化することで、光サイクルの間にタンパク質の機能的に重要な構造変化を引き起こす。したがって、発色団とタンパク質の相互作用が、ロドプシンの発色団の分子構造と電子状態を、どのように制御しているのかを理解することは極めて重要である。シゾロドプシンは、アスガルド古細菌やそのほかの微生物から、ゲノム解析によって新しく見つかったロドプシンのサブファミリーである。ここでは、発色団の捻れと吸収極大波長に対するレチナールシッフ塩基とそのカウンターイオン間の水素結合の影響を報告する。得られたスペクトルの特徴の相関から、強い水素結合がポリエン鎖の捻れを小さくすることが明らかになった。これは、ポリエン鎖の捻れが発色団とその周囲のアミノ酸残基のタイトな原子間接触によって引き起こされることを示唆している。さらに、水素結合の強さが、シゾロドプシンのレチナール発色団のカラーチューニングに影響を与える主要な要因であることが明らかになった。本研究で得られた知見は、発色団とタンパク質の相互作用を制御することで、発色団の分子構造や電子状態を操作するうえで重要なものである。

SzR4のK中間体とL中間体の発色団構造の解明：内向きと外向きプロトンポンプロドプシンの反応初期中間体の発色団構造を時間分解共鳴ラマン分光法を用いて明らかにした。最も重要なのは、L中間体の水素結合強度が未反応状態のものよりも強いことが、両方のプロトンポンプで明らかになったことである。L中間体における発色団構造が両方のポンプで似ていたことは、レチナール発色団の構造によってシッフ塩基からのプロトンの放出方向が決まるのではなく、シッフ塩基の細胞外側に位置する負電荷の数によって決まることを示している。この結果は、プロトンの受容方向が発色団のコンフィグレーションによって決まるという考えとは異なるものである。

SzRsのM中間体の発色団構造の解明：シゾロドプシンのM中間体の発色団構造を時間分解共鳴ラマン分光法を明らかにした。M中間体は発色団のシッフ塩基が脱プロトン化した中間体である。シゾロドプシンの光サイクルにおいて、レチナール発色団におけるシス-トランスの熱異性化が、シッフ塩基の再プロトン化の前に起こることが明らかになった。注目すべき点として、この再プロトン化前の再異性化は、他のプロトンポンプロドプシンでは観測されていないが、7種類のシゾロドプシンにおいて共通して観測されたことである。このことから再プロトン化前のシス-トランスの再異性化がシゾロドプシンファミリーに共通する特徴であることが明らかになった。また、再プロトン化前の再異性化によって、シッフ塩基の孤立電子対の向きを細胞外側に向け、細胞外側からプロトンを受け取ることで、内向きプロトン輸送を促進することを提案した。シゾロドプシンによる内向きプロトン輸送の基礎となるメカニズムは、単純かつ合理的であることが分かった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 （ 潤 井 泰 斗 ） | | |
|-----------------|-----|----------|
| | (職) | 氏 名 |
| 論文審査担当者 | 主 査 | 教授 水谷 泰久 |
| | 副 査 | 教授 中澤 康浩 |
| | 副 査 | 教授 久保 孝史 |

論文審査の結果の要旨

細胞内のイオン濃度は、さまざまなイオン輸送タンパク質やイオンチャネルタンパク質によって制御されている。特に、膜を隔てたプロトン濃度差は ATP 産生に必須であり、プロトン輸送タンパク質は生命活動においてきわめて重要な役割を果たしている。本論文では、輸送方向が反転した光駆動プロトン輸送タンパク質、シゾロドプシンについての研究成果をまとめている。シゾロドプシンは 2020 年に発見されたレチナールタンパク質ファミリーである。これらの多くはプロトン輸送活性を持つが、その輸送方向が従来の光駆動プロトン輸送タンパク質とは逆であることから注目を集めている。潤井泰斗氏は、輸送方向の異なる光駆動プロトン輸送タンパク質を比較することによって、それらのプロトン輸送機構および輸送方向を決定する構造因子を解明した。

本論文は 6 章から構成されている。第 1 章は、イオン輸送および光駆動イオン輸送タンパク質の解説をし、本論文にまとめた研究の目的について述べている。第 2 章は、本研究で用いた実験方法について述べている。特に、研究室オリジナルの装置である、時間分解共鳴ラマン分光装置およびデータ解析法について、詳しく解説している。

第 3 章では、シゾロドプシンの発色団構造の特異性を明らかにした成果について述べている。潤井氏は、7 種類のシゾロドプシンについて、発色団由来の共鳴ラマンスペクトルを定量的に比較し、発色団 π 共役系の捻れとシッフ塩基の水素結合強度とに負の相関があることを明らかにした。これは、捻れが水素結合とは異なる原因によって生じていることを示しており、発色団周辺の原子間接触が捻れの原因であることを示唆した。さらに、捻れの大きさと再異性化の速度定数には正の相関があることを明らかにした。タイトな原子間接触が再異性化を促進している可能性が提案された。

第 4 章では、プロトン放出の前駆体である反応中間体についての研究成果を述べている。輸送方向が異なる 2 種類のプロトン輸送ロドプシンの発色団構造を比較したところ、いずれもプロトン放出前駆体においてシッフ塩基の水素結合が強くなること、その相手の一部は水分子であることがわかった。発色団の水素結合には輸送方向による違いはなく、水素結合ネットワークに含まれるアミノ酸残基の負電荷の数が輸送方向を決定していることが明らかになった。

第 5 章では、プロトン受容の前駆体である反応中間体についての研究成果を述べている。輸送方向が異なる 2 種類のプロトン輸送ロドプシンの発色団構造を比較したところ、プロトン受容前駆体においてシッフ塩基の非共有結合の向きが異なっていること、そして向きの違いは再異性化と再プロトン化の順序が逆転していることに依ることが明らかになった。さらに重要なことに、向きの違いはプロトン輸送方向の違いを明快に説明した。

第 6 章では、第 3 章から第 5 章までの知見をまとめ、本研究で解明されたプロトン輸送機構および輸送方向を決定する構造因子について総合的な考察を述べている。

本論文の研究成果は、振動分光法の特色を活かし、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。