

## 内モンゴル塩湖から単離されたHalorubrum sp. ejinoorの持つロドプシン類タンパク質の研究

著者	潮 洛蒙
学位名	博士（工学）
学位の種類	課程博士
報告番号	甲第386号
研究科・専攻	創成機能工学専攻
学位授与年月日	2016-03-23
URL	<a href="http://doi.org/10.15118/00008931">http://doi.org/10.15118/00008931</a>

チヨウロモン

氏 名 潮洛蒙

学位論文題目 内モンゴル塩湖から単離された *Halorubrum* sp. ejinoor の持つロドプシン類タンパク質の研究

論文審査委員 主査 教授 岩佐達郎  
教授 佐々木 眞  
准教授 澤田 研

### 論文内容の要旨

細菌ロドプシン類はレチナールを発色団として持ち、光を受容すると、まず発色団が構造変化を起こし、次いでタンパク質の構造変化を誘発する。細菌ロドプシン類は世界各地から見つかっている。中国内モンゴル自治区には多くの塩湖が存在するが、それらの塩湖から細菌ロドプシン類が検出されたという報告はなかった。本研究では中国の内モンゴルにある塩湖（エジノル）から持つ細菌ロドプシンタンパク質遺伝子を持つ好塩菌を単離して調べた。

中国内モンゴル・エジノル塩湖の湖水をフィルター濾過して細菌を集め、好塩菌を寒天培地に広げ、そのコロニーを分離した。単離されたコロニーからゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を増幅した。増幅された 16S rRNA 遺伝子配列を決定したところ、その配列は *Halorubrum chaoviator* のものと最も相同性が高かったため、単離した好塩菌を *Halorubrum* sp. ejinoor (*He*)と名付けた。*He* からゲノム DNA を抽出し、全ゲノム解析を行った。その結果、三種類の細菌ロドプシン類タンパク質遺伝子、BR-like (*HeAR*)、HR-like (*HeHR*)、SRII-like (*HeSRII*) を見つけた。それらのタンパク質遺伝子に対して Quantitative RT-PCR を行った結果、菌体中での mRNA の比率が *HeAR* : *HeHR* : *HeSRII* : *HeHtrII* = 30 : 10 : 1 : 1 であることを明らかにした。次に、菌体膜から凍結融解法により菌体膜小胞を作製し、その光駆動ポンプ活性を調べた。菌体膜小胞を 4M NaCl に懸濁し、590nm の光で照射すると、外液のアルカリ化が観察された。菌体膜小胞液に 10 uM CCCP を入れると光照射に伴う外液のアルカリ化は大きくなった。10 uM TPP 存在下では外液の酸性化が観察された。菌体膜小胞をクロライドイオンがない条件 (3M NaNO<sub>3</sub>) で光照射すると外液の酸性化が観察された。以上の結果より菌体膜小胞には HR と同様のクロライドイオンポンプ活性と BR と同様のプロトンポンプ活性があると結論できた。*Halobacterium salinarum* (*Hs*) の紫膜を分離するのと同様に 60~30% のショ糖溶液のステップ密度勾配で超遠心を行い、菌体膜の分離を試みた。*He* の

膜は *Hs* のように明瞭に 2 層には分かれなかった。このことより、*HeAR* は紫膜様の膜構造をとらないものと結論された。レーザー閃光分光法で菌体膜の光反応を 410 nm、670 nm、540 nm、570 nm の波長で追跡したところ、BR のような M 中間体の生成・崩壊を示す吸光度変化を観察できた。さらにクロライドイオンがある条件下と無い条件下での 510nm での吸光度変化が大きく異なることから HR の存在が示唆された。次に発現精製したタンパク質を得て、より詳細にそれらの性質を調べることにした。

*HeAR* を大腸菌で発現した。Ni カラムより精製した AR は紫色で、SDS-PAGE 解析では分子量が 27 kDa であり、予測した分子量と一致した。吸収極大波長は 555 nm であった。CD スペクトルより精製した AR が 0.15% DDM を含むバッファ中で三量体構造を持つことが分かった。精製した AR は明暗順応を行うので、発色団レチナールの異性体構造を調べた。また、レーザー閃光分解解析から光反応を追跡したところ、(K)、M、N、O 中間体を持ち、光反応サイクル時間が 70 ms であることを明らかにした。*HeAR* 遺伝子を発現させた大腸菌では、光照射に伴う、外液の酸性化が観察された。この結果は、*HeAR* がプロトンポンプ細菌ロドプシンであることを示している。

## ABSTRACT

Microbial rhodopsins belong to the large family of retinal protein, a family of photoactive protein which has seven trans-membrane helices and a retinal molecule binding to a lysine residue in the seventh helix via the Schiff base as the photoactive center. Because of structural simplicity and functional diversity, microbial rhodopsins have been an excellent model system for structural biology.

In this study, a bacterial strain was collected and identified from a salt lake in Inner Mongolia of China. According to the sequence of 16S rRNA gene of the bacterium the strain belongs to *Halorubrum* genus and was named *Halorubrum* sp. ejinoor (*He*). Three kinds of microbial rhodopsin genes, BR-like (*HeAR*), HR-like (*HeHR*) and SRII-like (*HeSRII*) were identified in *He* by a whole genome DNA analysis of the bacterium. The mRNAs of three types of microbial rhodopsin genes were detected by RT-PCR and their amounts were determined by quantitative RT-PCR. The amount of mRNA of these genes in *He* was *HeAR* : *HeHR* : *HeSRII* = 30 : 10 : 1. Measurements of light-induced ion transportation of membrane vesicles suggest the existence of a proton pumping activity and a chloride pumping activity in membrane vesicles of *He*. *He*

membrane fraction was isolated from cell membrane of the bacterium by sucrose density gradient centrifugation method similar to that for isolation of purple membrane from *Halobacterium salinarum*. The kinetics of the light-induced absorbance changes of the membrane fraction of *He* suggested the presence of M-like intermediate (*HeAR*) and L-like intermediate (*HeHR*).

*HeAR*, a light-driven proton pump of *Halorubrum* sp. ejinoor was heterologously expressed in *Escherichia coli*. The expressed *HeAR* showed purple colour in the *E. coli* membrane and was purified by Ni-chelate chromatography. The purified *HeAR* shows a light-dark adaptation. After illumination, the purified *HeAR* showed a spectral redshift from 555 to 565 nm, suggesting an increase in the all-*trans* retinal content. The HPLC analysis revealed that the spectral shift accompanies with the change in retinal contents from 66% all-*trans* and 34% 13-*cis* in the dark to 85% all-*trans* and 15% 13-*cis* after illumination. The time courses of the absorbance change of *HeAR* suggested the presence of (K), M, N and O intermediates similar to those of BR-system. The half-life of the M intermediate was estimated as 0.001 s, faster than that in BR (0.005 s). But the photocycling rate was slower than BR. The measurements of light-induced pH changes of the *E. coli* cell suspensions containing *HeAR* revealed that *HeAR* is a light-driven proton pump.

#### 論文審査結果の要旨

本研究は細菌ロドプシン (Rh) 類タンパク質を対象としたものである。それらは発色団としてレチナールを持ち、7 回膜貫通型  $\alpha$  ヘリックス構造を持つ光受容膜タンパク質である。細菌 Rh 類タンパク質として大きく 4 種類のもの、Bacteriorhodopsin (BR)、Halorhodopsin (HR)、Sensory rhodopsin I (SRI) と Sensory rhodopsin II (SRII) が知られている。発色団レチナールが光を受容することによって、BR が光駆動プロトンポンプとして、HR では内向きのクロライドイオンポンプとして働く。脳の神経細胞の役割を調べるため細菌ロドプシン類タンパク質を用いてオプトジェネテックスへの応用が盛んに行われている。そのため、新規なロドプシン類を発見することでオプトジェネテックスへの応用にも貢献できる。本研究では中国の内モンゴルのエジノルに生育する菌から新規な細菌ロドプシン類タンパク質遺伝子を探して、それらの光化学的性質を明らかにしている。

博士論文の前半では、菌の単離とその菌のロドプシン類タンパク質の性質について述べている。エジノル塩湖から菌を単離し、16S rRNA 遺伝子配列により菌の同定を行ったところ単離した菌は *Halorubrum* 属の菌であったので、*Halorubrum* sp.

ejinoor (*He*)と名付けている。*He*のゲノム解析を行った結果、三種類のロドプシン類タンパク質 BR-like (*HeAR*), HR-like (*HeHR*), SRII-like (*HeSRII*) 遺伝子が見つけられている。RT-PCR 解析より *He*ではそれらのロドプシン類タンパク質が発現していることを、また、Quantitative RT-PCR よりそれらのロドプシン類タンパク質の mRNA の量比が *HeAR:HeHR:HeSRII*=30:10:1 になっていることを明らかにしている。*He*の菌体膜小胞を作製して、光駆動イオンポンプ活性を測定し、菌体膜小胞に *HeAR* と *HeHR* が含まれていて、それぞれ光駆動外向きプロトンポンと光駆動内向きクロライドイオンポンプとして働いていることを明らかにしている。*He*菌体膜を精製して光反応を調べ、*HeAR*由来の M 中間体と *HeHR*由来の N/L 中間体の変化を見出している。つまり、*He*菌体膜に *HeAR* と *HeHR* が含まれ、光を受容することでそれぞれの光反応を行っていることを示唆する結果を得ている。ここまでの結果は英文ジャーナルに原著論文として発表されている。

後半では、大腸菌を用いて 3 種類のロドプシン類 (*HeAR*, *HeHR*, *HeSRII*) タンパク質遺伝子の発現を試み、一種だけにして、その機能を調べた結果について述べている。3 種類のロドプシン類タンパク質の内、*HeAR*のみ精製することができている。精製した *HeAR*の吸収スペクトルより吸光極大波長は 555 nm で現れている。精製した *HeAR*の光反応より *He*菌体膜の光反応で見出した M 中間体は確かに *HeAR*に由来することを明らかにしている。また、*HeAR*の全体の光反応サイクル時間は 70  $\mu$ S であることを明らかにしている。*HeAR*遺伝子をもつ大腸菌を用いてその光駆動ポンプ活性を測ったところ *HeAR*は大腸菌膜でも *He*の菌体膜と同様に配向し、光によってプロトンを菌体内部から外部へポンプしていることを明らかにしている。つまり、*HeAR*は BR と同様に単一のタンパク質で光駆動プロトンポンプとして働くことを明らかにしている。

以上の結果は細菌ロドプシン類タンパク質の生物物理学的研究と応用に寄与するところが大きく、本論文は博士（工学）の学位論文に値すると認められた。