

Biophysical study of bacterial rhodopsins

その他（別言語等） のタイトル	細菌ロドプシン類タンパク質の生物物理学的研究
著者	GENG Xiong
学位名	博士（工学）
学位の種類	課程博士
報告番号	甲第430号
研究科・専攻	工学専攻・先端生産システム工学コース
学位授与年月日	2019-03-25
URL	http://doi.org/10.15118/00009903

氏 名 GENG XIONG

学位論文題目 細菌ロドプシン類タンパク質の生物物理学的研究

論文審査委員 主査 教授 戎 修二
教授 宮永 滋己
准教授 澤田 研

論文内容の要旨

細菌ロドプシン類タンパク質は7本の α -ヘリックスから構成され、発色団としてビタミンAアルデヒド(レチナール)を持つ光受容膜タンパク質であり、レチナールに吸収された光エネルギーの生体エネルギーへの変換や、外界の光情報の受容に関わっている。細菌ロドプシン類タンパク質は、生体膜中での立体構造が明らかにされた最初の膜タンパク質であり、モデル膜タンパク質として、詳細に研究され、それらの機能について、個々のアミノ酸レベルで、その分子機構が議論されている。本研究では、センサーロドプシンII(SRII)と、中国内モンゴルの塩湖から我々のグループによって発見された*Halorubrum* sp. *ejinoor*の持つアーキロドプシン(*HeAR*)について、新たなアミノ酸変異体を作成し、その光化学的性質を調べ、これまで分かっていなかったアミノ酸の働きを明らかにした。

SRIIは、細菌が青緑光から逃げる負の走光性の光受容体である。本研究では、バクテリオロドプシン(BR)のプロトンポンプ機能に重要なアミノ酸残基であるアスパラギン酸(D)115に対応するSRIIのD103の変異体を作成した。SRIIのD103をアスパラギン(D103N)やグルタミン酸(D103E)に置換した変異体を作成し、その光反応を調べた。その結果、変異体では、M中間体の崩壊は速くなるが、光反応サイクル後半の中間体の寿命が長くなること、また、長寿命の副産物の生成が観察され、SRIIのD103は、SRIIの光反応サイクルの回転速度の調節に重要な役割を果たすことが分かった。

*HeAR*は、BRと同様に光駆動外向きプロトンポンプとして働く。ARのアミノ酸配列はBRとよく似ており、これまで、プロトンポンプ機能に必須であることが明らかになっているアミノ酸は全て保存されていた。しかし、ARだけに共通して保存されているアミノ酸があることに注目し、これらのアミノ酸(C末より164番目のトレオニン; T164と165番目のセリン; S165)をアラニン(A)に置換した変異体、T164A、S165AとT164A/S165Aを作製し、それらの光化学的性質を調べた。その結果、変異体では、M中間体の崩壊は速くなるが、光反応サイクル後半の中間体の寿命が長くなり、また、T164の変異では光反応中間体の数が増加した。発色団レチナールから離れた場所にあるにもかかわらず、*HeAR*のT164とS165は、*HeAR*の光反応サイクルの回転速度の調節に重要な役割を果たすことが分かった。

また、*HeAR* の立体構造の熱安定性を X 線小角散乱法 (SAXS) によって調べた。脂質に再構成した *HeAR* と界面活性剤存在下での *HeAR* の光反応を比較検討し、タンパク質周辺環境の違いの影響についても調べた。

ABSTRACT

Microbial rhodopsins are typical membrane proteins with seven transmembrane alpha-helices (helices A–G). This type of protein has a retinal molecule as the chromophore. The microbial rhodopsins use the retinal chromophore attached at a conserved lysine residue to absorb photons for light-energy conversion and light-signal transduction. The molecular mechanisms of microbial rhodopsins have been discussed at the individual amino acid level. In this study, we have prepared amino acid replaced mutants for sensory rhodopsin II from *Halobacterium salinarum* (*HsSRII*), and archaerhodopsin discovered by our group from salt lake in Inner Mongolia of China (*HeAR*). Their photochemical properties were studied by flash photolysis and the function of amino acids which have been not reported until now was clarified.

HsSRII is a negative phototaxis receptor, which makes bacterium avoid blue-green light. In this study the amino acid replaced mutants of aspartic acid 103 (D103) of *HsSRII* were prepared and analyzed with flash photolysis. Aspartic acid 103 of *HsSRII* corresponds to D115 of bacteriorhodopsin (BR). This amino acid residue D115 is functionally important in BR. Aspartic acid D103 were replaced with asparagine (D103N) or glutamic acid (D103E). The work revealed that a substitution of D103 with asparagine (D103N) or glutamic acid (D103E) can result in large changes in *HsSRII* photocycle. These alterations include acceleration of the decay of the M intermediate, prolonging the lifetime of intermediates in the later part of photocycle, and appearance of a long-lived shorter-wavelength photoproduct. Thus, D103 of *HsSRII* may play an important role in regulation of the photocycle of *HsSRII*.

HeAR is a Light-driven outward proton pump like to BR. All key functional amino acid residues for proton pump of BR are conserved in *HeAR*. In the present work, we paid an attention to amino acids which are only conserved in ARs, prepared the mutants T164A, S165A and T164A/S165A (T164 and/or S165 were replaced with an alanine) and analyzed the photocycles of the mutants with flash photolysis. The amino acid replacements caused profound changes to the photocycle of *HeAR* including acceleration of the decay of M intermediate, prolonging lifetime of intermediates in the later part of photocycle, and appearance of additional two intermediates which were evident in the photocycles of T164 mutants. These results suggest that although T164 and S165 are located at the far end of the photoactive center, these two amino acid residues are important for regulation of the *HeAR* photocycle.

Moreover, the thermal stability of three-dimensional structure of *HeAR* and its mutants were investigated by small angle x-ray scattering (SAXS). In addition, the photocycles of *HeAR*

reconstituted into lipid and *HeAR* in the presence of detergent were compared and the influence of the different environment on *HeAR* photocycle was investigated.

論文審査結果の要旨

学位申請者・耿兄くんの博士論文の研究対象である細菌ロドプシン類は共通した立体構造や発色団（ビタミンAアルデヒド、レチナール）を持つ光受容膜タンパク質であり、生体膜中での立体構造が最初に明らかにされたモデル膜タンパク質として詳細に研究され、近年では「光遺伝学」に用いられる光受容体として、応用面でも注目を浴びている。耿兄くんは、細菌ロドプシン類の中のセンサーロドプシンII（SRII）と、中国内モンゴルの塩湖から室蘭工大のグループによって発見された *Halorubrum* sp. *ejinoor* の持つアーキロドプシン (*HeAR*) について、新たなアミノ酸変異体を作成し、その光化学的性質を調べ、これまで分かっていなかったアミノ酸の働きを明らかにした。

SRII は、細菌が青緑光から逃げる負の走光性の光受容体である。耿兄くんは、バクテリオロドプシン (BR) のプロトンポンプ機能に重要なアスパラギン酸 (D) 115 に対応する SRII の D103 をアスパラギン (D103N) やグルタミン酸 (D103E) に置換した変異体を作成し、その光反応を調べた。その結果、変異体では、M 中間体の崩壊は速くなるが、光反応サイクル後半の中間体の寿命が長くなること、また、長寿命の副産物の生成を見出し、SRII の D103 はその光反応サイクルの回転速度の調節に重要な役割を果たすことを明らかにした。この成果は関連論文 1 として発表された。

HeAR は、BR と同様に光駆動外向きプロトンポンプとして働き、プロトンポンプ機能に必須のアミノ酸は全て保存されていた。しかし、耿兄くんは AR だけに共通して保存されているアミノ酸があることに注目し、これらのアミノ酸 (C 末より 164 番目のトレオニン ; T164 と 165 番目のセリン ; S165) をアラニン (A) に置換した変異体、T164A、S165A と T164A/S165A を作製し、それらの光化学的性質を調べた。その結果、変異体では、M 中間体の崩壊は速くなるが、光反応サイクル後半の中間体の寿命が長くなり、また、T164 の変異では光反応中間体の数が増加することを見出した。T164 と S165 は発色団レチナールから離れた場所にあるにもかかわらず、*HeAR* の光反応サイクルの回転速度の調節に重要な役割を果たすことを明らかにした。これらの成果は関連論文 2 として発表された。

耿兄くんの以上の研究成果は細菌ロドプシン類の生物物理学的研究の分野において新規な重要な知見をもたらすものであり、細菌ロドプシン類の生体工学的応用に資するところも大きく、博士 (工学) の学位に値するものと判断された。