

	カトウ ヨシタカ
氏 名	加藤 善隆
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博第1034号
学位授与の日付	平成28年3月23日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当 課程博士
学位論文題目	Function and Mechanism Study of Light-driven Ion Pumps from Marine Bacteria (海洋性細菌由来の光駆動イオンポンプに対する機能およびメカニズムの研究)
論文審査委員	主査 教授 神取 秀樹 教授 多賀 圭次郎 准教授 出羽 毅久

## 論文内容の要旨

本研究は、最近、新しく発見された海洋性細菌由来の光駆動外向キナトリウム・プロトンハイブリッドポンプ (*Krokinobacter eikastus* rhodopsin 2, KR2) と、光駆動内向キクロライドポンプ (*Fulvimarina* rhodopsin, FR) の機能メカニズムを、変異導入、機能活性測定、分光測定を駆使して明らかにしようとしたものである。各章の内容は次のように要約される。

第1章は序論であり、1970年代から続いている微生物型ロドプシンの研究について概説した。そして、本研究の対象となる2つのロドプシンが、2013年と2014年に発見されたものであることを述べ、新規光駆動イオンポンプの機能メカニズムの解明を目的として提示した。

第2章では光駆動ハイブリッドポンプ KR2 の構造を決定し、ナトリウムイオンの輸送メカニズムを提唱した。KR2 の発見以来、Na<sup>+</sup>がどのようにして正電荷を持ったシッフ塩基周辺を通るのかが大きな謎であったが、結晶構造と変異体の機能解析により、対イオン D116 がシッフ塩基のプロトンを受容し、回転して水素結合の相手を変えることで Na<sup>+</sup>輸送を可能にしていることがわかった。また、結晶構造で確認された細胞質側のキャビティ部分に変異導入を行なうことで、自然界に存在しない K<sup>+</sup>ポンプの創成に成功した。

第3章では、KR2 のイオン取り込み過程における H<sup>+</sup>・Na<sup>+</sup>選択性を反応速度論的に明らかにした。光反応によって形成される M 中間体の減衰が、Na<sup>+</sup>濃度と H<sup>+</sup>濃度によって

加速されることを明らかにし、競合反応モデルを提示した。また、M 減衰の時定数を  $\text{Na}^+$  濃度に対してプロットし、競合反応モデルより導き出された式によりフィッティングすることで、 $\text{H}^+$  -  $\text{Na}^+$  選択性を  $\text{H}^+$  と  $\text{Na}^+$  の取込み過程における反応速度定数の比 ( $k_{\text{H}}/k_{\text{Na}}$ ) として求めた。 $k_{\text{H}}/k_{\text{Na}}$  は pH 6.4 - 8.0 の間で 8,000 前後とほぼ一定値をとることが明らかになった。この結果から、 $\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  の濃度が同じであれば、KR2 は  $\text{H}^+$  を優先的に輸送することがわかる。一方で、海洋性細菌の細胞内イオン濃度比 ( $[\text{Na}^+]/[\text{H}^+]$ ) は  $2.8 - 4.4 \times 10^6$  であり、生理条件下で KR2 はナトリウムポンプとしてはたらくことが明らかになった。

第 4 章は光駆動セシウムポンプの創成に関する内容である。野生型 KR2 は  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  をポンプできるが、イオンサイズが  $\text{K}^+$  以上の陽イオンはポンプできずに、代わりに  $\text{H}^+$  を輸送することがわかっている。これに対し、第 2 章では結晶構造をもとに変異を導入することで、 $\text{Na}^+$  よりもイオンサイズが大きい  $\text{K}^+$  の輸送を実現した。本章では同一箇所にも別のアミノ酸変異を導入することで  $\text{Cs}^+$  イオンを輸送する KR2 変異体の創成に成功した。61 位と 263 位に導入したアミノ酸のサイズと、 $\text{K}^+$  もしくは  $\text{Cs}^+$  の輸送活性の間には相関性があり、この部位がイオン選択性フィルターを形成することを示した。

第 5 章では光駆動クロライドポンプ FR の機能解析と光反応解析に取り組んだ。海洋性細菌の遺伝子から新たに発見されたロドプシン FR に対して機能測定を行うことで、FR が細胞外側から細胞質側に  $\text{Cl}^-$  を輸送する内向きクロライドポンプであることを示した。光駆動クロライドポンプは 1977 年に見つかったハロロドプシン (HR) がよく研究されているが、FR と HR とのアミノ酸配列相同性は低く、むしろ 2013 年に海洋性細菌から発見された光駆動ハイブリッドポンプ (KR2) に近い配列を持っている。しかしながら、分光測定によって反応サイクルの中間体を捉えたところ、FR と HR の共通性がわかった。

第 6 章は総括であり、本研究の成果をまとめた。

以上のように、本論文は海洋性由来のイオンポンプの機能とそのメカニズムを実験的に解析し、新たに得られた知見をまとめたものである。既に  $\text{K}^+$  や  $\text{Cs}^+$  を輸送するタンパク質の創成にも成功しており、脳機能解明に向けた革新的技術である光遺伝学への応用、特定のイオンのみを回収するような工学分野への応用が期待される。これらの成果は、4 編の審査有論文としてまとめられており、本論文は学位論文として十分価値のあるものと認められる。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、最近、新しく発見された海洋性細菌由来の光駆動外向きナトリウム・プロトンハイブリッドポンプ (*Krokinobacter eikastus* rhodopsin 2, KR2) と、光駆動内向きクロライドポンプ (*Fulvimarina* rhodopsin, FR) の機能メカニズムを、変異導入、機能活性測定、分光測定を駆使して明らかにしようとしたものである。各章の内容は次のように要約される。

第1章は序論であり、1970年代から続いている微生物型ロドプシンの研究について概説した。そして、本研究の対象となる2つのロドプシンが、2013年と2014年に発見されたものであることを述べ、新規光駆動イオンポンプの機能メカニズムの解明を目的として提示した。

第2章では光駆動ハイブリッドポンプ KR2 の構造を決定し、ナトリウムイオンの輸送メカニズムを提唱した。KR2 の発見以来、Na<sup>+</sup>がどのようにして正電荷を持ったシッフ塩基周辺を通るのが大きな謎であったが、結晶構造と変異体の機能解析により、対イオン D116 がシッフ塩基のプロトンを受容し、回転して水素結合の相手を変えることで Na<sup>+</sup>輸送を可能にしていることがわかった。また、結晶構造で確認された細胞質側のキャビティ部分に変異導入を行なうことで、自然界に存在しない K<sup>+</sup>ポンプの創成に成功した。

第3章では、KR2 のイオン取り込み過程における H<sup>+</sup> - Na<sup>+</sup>選択性を反応速度論的に明らかにした。光反応によって形成される M 中間体の減衰が、Na<sup>+</sup>濃度と H<sup>+</sup>濃度によって加速されることを明らかにし、競合反応モデルを提示した。また、M 減衰の時定数を Na<sup>+</sup>濃度に対してプロットし、競合反応モデルより導き出された式によりフィッティングすることで、H<sup>+</sup> - Na<sup>+</sup>選択性を H<sup>+</sup>と Na<sup>+</sup>の取込み過程における反応速度定数の比 ( $k_H/k_{Na}$ ) として求めた。 $k_H/k_{Na}$  は pH 6.4 - 8.0 の間で 8,000 前後とほぼ一定値をとることが明らかになった。この結果から、Na<sup>+</sup>と H<sup>+</sup>の濃度が同じであれば、KR2 は H<sup>+</sup>を優先的に輸送することがわかる。一方で、海洋性細菌の細胞内イオン濃度比 ( $[Na^+]/[H^+]$ ) は  $2.8 - 4.4 \times 10^6$  であり、生理条件下で KR2 はナトリウムポンプとしてはたらくことが明らかになった。

第4章は光駆動セシウムポンプの創成に関する内容である。野生型 KR2 は Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>をポンプできるが、イオンサイズが K<sup>+</sup>以上の陽イオンはポンプできずに、代わりに H<sup>+</sup>を輸送することがわかっている。これに対し、第2章では結晶構造をもとに変異を導入することで、Na<sup>+</sup>よりもイオンサイズが大きい K<sup>+</sup>の輸送を実現した。本章では同一箇所別のアミノ酸変異を導入することで Cs<sup>+</sup>イオンを輸送する KR2 変異体の創成に成功した。61位と263位に導入したアミノ酸のサイズと、K<sup>+</sup>もしくは Cs<sup>+</sup>の輸送活性の間には相関性があり、この部位がイオン選択性フィルターを形成することを示した。

第5章では光駆動クロライドポンプ FR の機能解析と光反応解析に取り組んだ。海洋性細菌の遺伝子から新たに発見されたロドプシン FR に対して機能測定を行うことで、FR が細胞外側から細胞質側に Cl<sup>-</sup>を輸送する内向きクロライドポンプであることを示した。光駆動クロライドポンプは1977年に見つかったハロロドプシン (HR) がよく研究されているが、FR と HR とのアミノ酸配列相同性は低く、むしろ2013年に海洋性細菌から発見された光駆動ハイブリッドポンプ (KR2) に近い配列を持っている。しかしながら、分光測定によって反応サイクルの中間体を捉えたところ、FR と HR の共通性が明らかになった。

以上、本論文では過渡吸収測定や機能測定を駆使して、イオンポンプメカニズムの一端を分子構造のレベルで明らかにし、さらに新規機能の創成を実現している。これらの研究は、近年注目されているオプトジェネティクスにも大きく貢献すると考えられる。よって、本論文は博士 (工学) の学位にふさわしいものと認める。