

氏名	いまもと やすし 今元泰
学位(専攻分野)	博士 (理学)
学位記番号	理博第1470号
学位授与の日付	平成5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物物理学専攻
学位論文題目	高度好塩菌の青緑色光受容蛋白質・フォボロドプシンの光反応機構

論文調査委員 (主査) 教授 宮田 隆 教授 大西俊一 教授 柳田充弘

### 論文内容の要旨

高度好塩菌は、飽和に近い塩濃度に棲息する細菌である。好塩菌は動物の網膜の光受容蛋白質と同じくレチナールを発色団とする光受容蛋白質をいくつかもっているが、これまで主に研究が行われてきたのは、bacteriorhodopsin など、光駆動のイオンポンプとして機能する光受容蛋白質であった。一方、好塩菌はイオンポンプの他にも光走性のための光受容蛋白質をもっているが、その研究はほとんど行われていなかった。本研究では好塩菌の負の光走性に関与する光受容蛋白質である phoborhodopsin (pR) を、*Halobacterium halobium*, あるいは *Natronobacterium pharaonis* から調製し、その光反応機構の解析を行った。

一般にレチナール蛋白質の吸収スペクトルは、なだらかな釣鐘型であるが、pR のものは半値幅が狭く、振動構造がみられた。この事は、pR の発色団と蛋白質部分との間に、他のレチナール蛋白質にはない特徴的な相互作用のあることを示している。そこで、分光学的手法により pR の特徴を検討したところ、以下のことが明らかになった。まず、低温スペクトル法により光反応過程を解析したところ、pR の初期中間体の安定性が他のレチナール蛋白質のものとは比べて非常に高いことがわかった。ところが、ナノ秒レーザーパルスを励起光源とする閃光分解装置を用いて、室温での光反応過程を解析したところ、室温での初期中間体の寿命は、他のレチナール蛋白質のものとは大差がなかった。つまり、pR の初期中間体の崩壊速度は、温度によって大きく影響を受けることが示された。さらに、発色団レチナールの構造解析を行ったところ、他のレチナール蛋白質と同様に、pR の発色団は光吸収により、全トランス型から13シス型に異性化することがわかった。したがって、pR の初期中間体の安定性が低温で極めて高いのは、発色団構造の違いではなく、その蛋白質部分に起因することが示された。以上のことから、pR における蛋白質と発色団の相互作用は、以下のようなものであると推測した。

まず、吸収スペクトルに振動構造が現れることから、蛋白質部分が発色団のβイオン環部分を強く固定していると考えた。また、初期中間体の寿命が温度に大きく依存することから、その活性化エンタルピーが大きい、これは異性化にともなって、発色団のβイオン環部分が解放され、振れの少ない安定な

構造をとっていることが原因であると考えた。他のレチナル蛋白質では蛋白質部分にこのような $\beta$ イオン環固定部位を考える必要はないことから、pRの特徴は、蛋白質部分に $\beta$ イオン環固定部位があることであると結論した。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、高度好塩菌の負の光走性に関与する光受容蛋白質・phoborhodopsin (pR)の光反応過程を、低温スペクトル法、閃光分解法、発色団の構造解析等の手法を用いて総合的に検討したものである。

pRは*Halobacterium halobium*に存在する第4番目のレチナル蛋白質として発見された。しかし、その光反応機構の研究は、菌体中に存在するpRの量が非常に少ないこと、またpRの精製が非常に困難であることなどから、ほとんど行われていなかった。そこで申請者は、pRを含む膜断片の懸濁液を試料として、pRの低温スペクトル的研究を開始した。そして、測定・解析法に改良を加えることによって、pRの光反応に由来する吸光度 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ のスペクトル変化を精度よく測定することに成功した。その結果、pRの光反応初期過程を初めて解析することに成功し、pRの初期中間体が他のレチナル蛋白質では見られないほど高い温度安定性を持つことなどを明らかにした。

その後、共同研究者によって好塩好アルカリ菌*Natronobacterium pharaonis*のpRの精製法が確立されたので、申請者は精製した試料を用いてさらに詳細なpRの研究を行った。まず、pRの室温での光反応過程をナノ秒レーザーを励起光源とする閃光分解法によって解析し、低温スペクトル法で得られた結果と比較した。その結果、初期中間体の活性化エンタルピーが非常に大きいことや、低温では観測できなかった二つの中間体が存在することなどを発見した。さらにpRおよびその中間体の発色団の構造解析を行い、pRの光反応は、他のレチナル蛋白質と同様に発色団の異性化反応によって始まるが、初期中間体の特徴的な挙動は蛋白質部分との特異な相互作用の結果であることを見いだした。

以上の知見を基に、申請者はpRの光反応における発色団と蛋白質部分との相互作用の変化について考察した。そして、pRの蛋白質部分には、発色団の $\beta$ イオン環部分を固定する部位があることを推定した。このような発色団と蛋白質の相互作用は、他のレチナル蛋白質では見られなかったものであり、この知見は独創的かつ貴重なものとして、高く評価される。

pRは好塩菌の光走性をトリガーする蛋白質であり、pRの光反応機構が明らかになったことから、その分子メカニズムの解明に大きく寄与したといえる。また、pRにおける特徴的な光反応メカニズムは、動物のロドプシン等、他のレチナル蛋白質の研究においても多くの示唆を与えるものと期待される。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。