1PB033

ニワトリ松果体の光受容蛋白質ピノプシンのメタII中間体
○仲村厚志^{1,3}、小島大輔^{1,3}、今井啓雄^{2,3}、寺北明久^{2,3}、
岡野俊行^{1,3}、七田芳則^{2,3}、深田吉孝^{1,3} (1 東大・院理・
生物化学、2 京大・院理・生物物理、3 CREST・JST)

ニワトリ松果体には約24時間周期の時を刻む概日時計が存在する。ロドプシンファミリーの一員であるピノプシンは、ニワトリ松果体において概日時計の光位相同調を担うと考えられる。現在、概日時計への光入力系の分子メカニズムはほとんど謎に包まれており、ピノプシンの機能を明らかにすることは、光入力メカニズム解明への第一歩になると考えられる。

これまでに我々は、ピノプシンの光退色過程が網膜の光受容蛋白質(視物質)と大枠では一致していることを、分光学的解析により明らかにした。さらに、ピノプシンが桿体型あるいは錐体型いずれの視物質に近い性質を持つのかを調べるために、ピノプシン、ロドプシン(桿体型)およびGreen(錐体型)のメタII中間体の生成と崩壊の速度を比較した。その結果、メタII中間体の生成速度については、ピノプシンはロドプシンに比べて約20倍速く、Greenとほぼ同じ(約2倍速い)であることがわかった。一方、ピノプシンのメタII中間体はGreenよりも20倍以上遅く崩壊し、ロドプシンと同程度の崩壊速度(約2倍)を示した。これらの結果よりピノプシンは、桿体と錐体視物質のキメラの性質を持つ新しいタイプの光受容蛋白質であることが明らかになった。

視物質においては、メタII中間体はG蛋白質トランスデューションを活性化させる重要な中間体である。今回我々は、ピノプシンのメタII中間体が生体活性中間体であるか否かを調べるために、ピノプシンのメタII中間体の寿命とG蛋白質活性化能の減衰過程を比較した。その結果、両者はよく一致し、減衰の半減期は2℃においてそれぞれ約50分と70分であった。メタII中間体と後続のメタIII中間体との平衡を考慮すると、ピノプシンにおいてもメタII中間体が生体活性中間体であると考えられた。

さらに我々は、ピノプシンに特徴的なメタII中間体の性質の由来を明らかにするために、視物質とピノプシンの1次構造を比較し、ピノプシンに特徴的なアミノ酸残基を見出した。現在、これらの部位に変異を導入したピノプシン変異体を作製し、それらのメタII中間体の性質を調べている

A.Nakamura, D.Kojima, H.Imai, A.Terakita, T.Okano, Y.Shichida, Y.Fukada

: Meta II intermediate of chicken pinopsin

1PB035

PYPを持つ *Ectothiorhodospira halophila* の

新しいトランスデューサー蛋白のクローニング

○小田和司、西川彩成、高橋哲郎

(北陸先端科学技術大学院大・材料科学)

PYPは3次元構造解析や光サイクルの過程の解析が進んでいるがPYPからの信号を受け取る信号伝達分子は同定されていない。また、走化型トランスデューサーはメチル化による制御を受けることが知られているが、紅色光合成細菌の光駆動性もメチル化が影響するといわれている。

前年度の年会で我々は紅色光合成細菌 *Ectothiorhodospira halophila* における光駆動性の精密なアクションスペクトルの測定の結果、PYPの吸収スペクトルとよく一致することを報告した。また *cheB* を含む走化型オペロンを見出し、その中に含まれる走化型トランスデューサーの一つ *mcp1* の全塩基配列を決定した。ゲノミックサザンプロットの結果 *E. halophila* にはさらに6つ程度の走化型トランスデューサーの存在が示唆された。しかし、この中のどのトランスデューサーが光信号伝達を担っているかは不明である。

mcp1 を、Highly Conserved Domain (HCD配列) を指標としてクローニングする際いくつかの問題点が上がった。1) *E. halophila* のようにGCリッチな配列を扱うとき、宿主が~1.5kbp以上の長いインサートを持ったマルチコピーベクターを取り込みにくい。2) ゲノミックサザンによるクローニングを行う場合、宿主の大腸菌のゲノム中のHCD配列がスクリーニングする上で障害となる。3) PCRで目的の配列を含んだ断片を増幅しようとする際、非特異的な増幅が頻繁に起こるため、特異的増幅断片の選別が重要になる。

そこで、1.5kbp以下の断片を目指すHCD配列が含まれるようにアンカーPCRのカセット配列を選び、できたPCR産物を電気泳動してサザンプロットによって特異的増幅断片を選別してクローニングを行ったところ *mcp1* 以外に3つのHCD配列を得ることができた。これらのHCD配列は *mcp1* も含めて塩基配列で相互に72から81%の相同性が認められた。

現在これらの遺伝子の全長配列を解析している。

K. Oda, S. Nishikawa, T. Takahashi: Cloning of novel transducer-like protein genes in *Ectothiorhodospira halophila*

1PB034

ニワトリ松果体と網膜における新規の光情報伝達経路

○笠原和起、岡野俊行、吉川朋子、山崎一恭、深田吉孝
(東大・院理・生化、JST・CREST)

哺乳類を除く多くの脊椎動物では、松果体や網膜が概日時計の機能を持っている。これらの組織は光受容能を持ち、ここで受容された光情報は、概日時計の位相調節やメラトニン分泌の急激な抑制をもたらす。これらの光情報伝達経路を明らかにするため、ニワトリ松果体からオプシン型の光受容タンパク質ピノプシンを同定した。次に、ピノプシンと相互作用する分子としてGタンパク質を想定し、ニワトリ松果体に存在するGαのcDNAクローニングと免疫組織化学的な解析を行った。その結果、桿体型トランスデューシン(Gt₁α)とG₁₁αの細胞内局在がピノプシンと一致していることを見出し、昨年の年会において報告した。さらに、トリプシンプロテクションアッセイを応用した活性検出法を用いることにより、光刺激に伴なって松果体Gt₁αが活性化することを報告した。

本年は、免疫沈降法を用いてGαと光受容タンパク質の相互作用を調べた結果について報告する。暗順応させたニワトリ網膜の懸濁液から、抗Gt₁α抗体または抗Gq/11α抗体によってGαを免疫沈降し、ロドプシンが共沈するか否かをウェスタンブロットにより解析した。その結果、Gt₁αとG₁₁αはいずれも、暗中でもロドプシンと会合していることがわかった。さらに、GTP存在下において光照射を行うと、両者ともロドプシンと解離することが判明した。このように、Gt₁αと同様、G₁₁αが光依存的にロドプシンと結合・解離したことから、脊椎動物のオプシン型光受容タンパク質がG₁₁αを活性化するという新しい光情報伝達経路が示唆された。ここで、我々が単離したG₁₁α cDNA クローンから推定されるアミノ酸配列にはPTXによるADPリボシル化部位が存在せず、G₁₁αはPTX非感受性であると考えられる。従来において、ニワトリ松果体細胞に百日咳毒素(PTX)を投与すると、光によるメラトニン合成の急性抑制は阻害されるが、概日時計の光位相調節は影響を受けないことが知られている。これらを考え併せると、G₁₁αを介した新規の光情報伝達経路は、概日時計に入力して光位相調節に関与している可能性が高いと考えられる。

T. Kasahara, T. Okano, T. Yoshikawa, K. Yamazaki, T. Fukada : A novel phototransduction pathway in the chicken pineal gland and retina

1PB036

ハロロドプシンの光電圧発生と光サイクルの

Cl⁻濃度依存性

○宗行 英朗¹、柴崎 千枝²、薬師神 学²、
大谷 弘之² (東工大・1資源研、2生命理工)

ハロロドプシンは高度好塩菌のもつレチナール膜タンパク質で、光を吸収してそのエネルギーでCl⁻を菌体内に能動的に輸送する。我々は高分子薄膜表面にハロロドプシンを含む細胞膜画分を吸着させ、レーザーパルスによる光電圧発生の時間分解測定を行う系を構築した。そして、ハロロドプシンによる電荷移動は主にサブミリ秒とミリ秒の時間領域で起こることを示し、光サイクルとの比較から、それらはN中間体の生成と崩壊の過程に対応すると推論した。

一方、時間分解能の低い光電流測定の結果は、Cl⁻輸送の活性がCl⁻濃度に対してベル形の依存性を示すことを示し、増加と減少の部分はそれぞれ輸送イオンの取り込みと吐き出しを反映していると考えた。

今回、イオンの輸送ステップについて更に詳しい知見を得るために、ハロロドプシンの光電圧発生の時間分解測定を様々なCl⁻濃度で行った。

その結果、Cl⁻濃度が高いほどミリ秒の時間領域で起こる電荷移動が顕著に遅くなることが観察された。更にその信号強度もCl⁻濃度依存性を示し、光電流測定の結果と良い相関が見られた。

これらの電流ならびに電圧測定の結果をフォトサイクルの時間分解吸収ならびに蛍光測定の結果と関連づけて、ハロロドプシンによるCl⁻輸送ステップについて考察したい。

E. Muneyuki, C. Shibazaki, M. Yakushijin and H. Ohtani : Chloride concentration dependency of the photovoltage generation and photocycle of halorhodopsin