1PB037

フォボロドプシン様蛋白質に特徴的な3ヶ所のアミノ酸残基がその極大吸収波長に及ぼす影響

○下野和実、岩本真幸、鷺見正人、加茂直樹
(北大・薬)

高度好塩好アルカリ性菌 *Natronobacterium pharaonis* のフォボロドプシン様蛋白質 (ppR) は、レチナールを発色団とする膜蛋白質である。フォボロドプシン (pR) 様蛋白質は、他の細菌のレチナール蛋白質と異なり短波長側に極大吸収波長 (λ_{max}) を持つ。この違いは、発色団近傍環境の違いによると考えられる。細菌のレチナール蛋白質では、発色団近傍に存在すると思われるアミノ酸は高度に保存されている。しかし長波長側に λ_{max} を持つ蛋白質で完全に保存され、pR 様蛋白質のみが異なるアミノ酸である部位が3カ所存在している。昨年の年会において我々は、変異体を用いてこれらのアミノ酸 (V108、G130、T204) のうち、G130とT204はppRの吸収波長制御に関与していることを報告した。今回これらの部位について多重変異体を作製し、ppRの吸収波長制御における役割をより詳細に再検討した。

多重変異体と単変異体との吸収波長シフト値の比較から、吸収波長制御に対する効果は、G130とT204 (またはV108) では相加的であるが、V108とT204では協同的作用であった。以上の結果をもとに、本発表ではこれらの残基がレチナール蛋白質の吸収波長制御に果たす役割とその分子機構について議論する。

K. Shimono, M. Iwamoto, M. Sumi, N. Kamo: Roles of three characteristic sites of phoborhodopsin-like proteins in its absorption maximum.

1PB039

センソリーロドプシンIIの光サイクルにおけるプロトン輸送機構
佐々木純¹・John L. Spudich² (¹阪大理、²テキサス大ヒューストン校)

センソリーロドプシンII (SRII) は、高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* (*H. salinarum*) が青緑色光に対する負の走性を司る光受容体として働くレチナール蛋白質であり、伝達蛋白質であるHtrIと複合体を形成している。*H. salinarum* はSRIIの他にも3つの類似の蛋白質を持ち、その中でもバクテリオロドプシン (BR) とハロロドプシン (HR) は単独で光エネルギーを利用した水素または塩素イオンポンプとしてそれぞれ働く。一方、もう一つの橙色の光に対する正の走性を司る光受容体であるセンソリーロドプシンI (SRI) は水素イオンポンプの機能もあるので、伝達蛋白質であるHtrIへの情報伝達の際の構造変化はポンプとして働く際の構造変化と共通のものであることが考えられる。

本研究ではSRIと逆の情報を伝えるSRIIが、他の類似蛋白質と同様に水素イオンポンプの機能を有するのかを明らかにするために実験を行った。結果、SRIIの光サイクルの過程で発色団のシッフ塩基結合が脱プロトン化したM中間体から次のO中間体への変化の過程でプロトンが蛋白質内に取り込まれシッフ塩基をプロトン化し、O中間体が元の状態に戻る過程でプロトンが放出される。しかし、プロトンの取り込み・放出はいずれも細胞外側のみで行われる、つまりプロトンは循環されるがポンプされないことがわかった。さらに、中間体のpH依存性からあるpKa=7.5の残基がプロトン取り込みをリレーしていることが示唆された。

以上の結果から、SRIIの細胞質側はプロトンが通りにくい構造になっているか、またはBRに見られる細胞質側が開くような構造変化を起こさないことが考えられる。

J. Sasaki and J. L. Spudich
Proton Circulation During the Photocycle of Sensory Rhodopsin II

1PB038

高感度pH変化測定系を用いた光センサー蛋白質の光駆動型プロトン輸送活性の検討

○岩本真幸、下野和実、鷺見正人、小山行一、加茂直樹 (北大・薬、¹富士写真フイルム(株)・足柄研究所)

ファラオニスフォボロドプシン (ppR) は高度好塩好アルカリ性菌の細胞膜に存在し、レチナールを活性中心に持つレチナール蛋白質の一つである。ppRは光受容後、トランスデューサーを介して鞭毛モーターまでシグナルを伝達し、このバクテリアの走光性を制御しているが、シグナル発生のメカニズムについては未だ解明されていない。バクテリアのレチナール蛋白質である、バクテリオロドプシンやハロロドプシン、センソリーロドプシンなどは、ある条件下で光駆動型プロトンポンプとして機能することがわかっている。機能は異なるにもかかわらず、ppRはこれらの蛋白質と高い相同性を有することから、同様に光駆動型プロトンポンプ活性を持ち、それに伴うタンパク質内部環境の変化がトランスデューサーへのシグナル伝達に密接に関与しているのではないかと我々は考えた。1992年に小山らは、SnO₂を蒸着させたガラス透明電極表面にバクテリオロドプシン薄膜を作り、その光電応答を測定することでバクテリオロドプシン分子からのプロトンの出入りを観察することに成功している。我々はこの系に改変を加え、ppRの光電応答の測定を行なったところ、ppRは光反応中にまず分子内へプロトンを取り込み、その後放出していることを示唆する結果が得られた。

M. Iwamoto, K. Shimono, M. Sumi and N. Kamo: Proton uptake and release of *pharaonis* phoborhodopsin detected by a photo-electrochemical cell.

1PB040

高度好塩性古細菌におけるレチナールタンパク遺伝子の分布とその発現

井原邦夫[○]、杉山康雄 (名大院・理・生命理学)

高度好塩性古細菌は、これまでのところ、レチナールタンパク質の存在が確認できた唯一の原核生物である。好塩菌のレチナールタンパク質は、エネルギー変換タンパク質 (バクテリオロドプシン bR とハロロドプシン hR) と光情報変換タンパク質 (センサリーロドプシン sR とフォボロドプシン pR) に分けられる。これらのタンパク質は、そのアミノ酸配列の相同性解析によって、好塩菌が属レベルで分散進化する以前に遺伝子重複によって生じ、機能分化したことが推定されている (Ihara et al. J. Mol. Biol. 285, 163-174, 1999)。現在 13 属 34 種にまで広がっている好塩菌の各族の標準株 (タイプストレイン) を調べたところ、既知の核酸情報にもとづく PCR 反応やサザンブロッティング法によってレチナールタンパク質をコードする遺伝子が検出できない株や、生菌を用いた光応答 (ATP 合成、pH 変化) が検出できない株が存在した。中でも、*Natrinema* 属には、レチナールタンパク質をコードする遺伝子 (bR と hR) は存在するが、生理的レベルでは発現していない株が存在した。最も解析がすすんでいる *Halobacterium salinarum* の bR 遺伝子の場合、その発現には光と酸素分圧が大きく関わっている事が分っている。そこで、レチナールタンパク質遺伝子を持つ好塩菌について、特に bR 遺伝子の発現に及ぼす光と酸素分圧の影響について調べた。*Halorubrum* の bR (アーキロドプシン aR) について調べたところ、やはり光と低酸素条件で発現が誘導されるという結果が得られた。

K. Ihara, Y. Sugiyama : *The Archaeal Rhodopsins*