2F1345

バクテリオロドプシンヘリックスFプローブとしてのAla184残基の固体¹³C NMR信号の帰属

○長谷川 潤、辻 暁、内藤 晶、斉藤 肇（姫路工大・院理）

バクテリオロドプシン (bR) は *Halobacterium salinarum* の紫膜に存在する光駆動プロトンポンプ活性をもつ膜蛋白質である。分光法および回折法による光反応中間体の構造解析から、M 中間体において発色団であるレチナール基部のシッフ塩基のプロトン脱離とともにヘリックスFの構造変化が生じることが知られている。回折法によって得られる立体構造のモデルより、光励起後にシッフ塩基の脱プロトン化が Asp85-Asp212-Tyr185 の側鎖間相互作用を通じて、ヘリックスFの構造変化を誘起する可能性が考えられる。これまで本研究室ではシッフ塩基およびプロトンチャネル近傍の Ala および Val 残基の ¹³C NMR 信号を帰属し、立体構造を解析してきたが、ここではさらにヘリックスFに位置する Ala184 の NMR 信号を分離、帰属して上記のような遠隔的な構造変化の伝達を固体 NMR を用いて解析することを試みた。

Mn²⁺ 処理した A184G 部位特異的変異と野生株の NMR スペクトルを比較し、17.26 ppm に Ala184 側鎖メチル炭素由来の信号を独立した信号として分離、帰属できた。これは紫膜表面部位に局在している2価カチオンを NMR 緩和試薬である Mn²⁺ と置換することで、親水性表面にある残基からの NMR 信号を消去し、膜貫通部位にある残基を選択的に観測することができることに基づく。その結果、Ala184 由来の信号はループ領域の信号に重なり、Pro186 近傍の二面角構造が常温、懸濁液中では通常のヘリックスとは著しく異なることが示唆された。また、Ala184 およびシッフ塩基近傍の Ala 残基をプローブとして、Pro186→Ala および Tyr185→Phe 等の変異によるシッフ塩基およびヘリックスFの構造への影響を解析し、bR 内における構造変化の伝達経路を検証する。

J. Hasegawa, S. Tuzi, A. Naito, H. Saito : An assignment of the solid state ¹³C NMR signal of Ala184 of bacteriorhodopsin

2F1415

バクテリオロドプシンの細胞質側膜表面構造におけるカチオンの効果

○米林 香華¹、山口 悟¹、辻 暁¹、Richard Needleman²、Janos K. Lanyi³、内藤 晶¹、斉藤 肇¹（¹ 姫路工大・理、² ウェイン州立大、³ カリフォルニア大）

バクテリオロドプシン (bR) は膜蛋白質のモデルの一つとして、回折法および分光学的手法によりその構造と機能の相関が原子レベルで解析されつつある。紫膜の膜表面には二価カチオンが局在していることが知られており、さらに本研究室の山口らにより細胞質側膜表面のループと C-末端 α -ヘリックスの間に複合体が存在し膜表面構造を形成している可能性が示唆された。本研究ではこの細胞質側膜表面領域に注目して、固体高分解能 ¹³C NMR を用い金属イオンがその高次構造にどのように影響するかを解析した。試料は野生株由来 bR (WT) と E-F ループ変異株由来 bR (A160G) およびこれらの脱金属イオン試料 (deionized WT, deionized A160G) を用いて、Na⁺ と Ca²⁺ による滴定を行った。その結果、100mM Na⁺ 存在下では、二価カチオンの有無に関らず WT における高次構造がほぼ同じであったことより、膜表面領域の二価カチオンの大部分が一価カチオンの Na⁺ により置換されることが示された。また deionized WT に対し様々な [Na⁺/Ca²⁺] 条件で滴定を行ったが、金属イオン除去前の WT (10mM NaCl 存在下) と同一の NMR スペクトルは再現できなかった。このことより、Na⁺ 及び Ca²⁺ のみによる脱カチオン膜の再生処理では bR の細胞質側膜表面の構造を完全に再生できないことが示された。この原因として、金属イオン除去による bR 表面構造における種々の相互作用の不可逆的な組換え、およびこの滴定に用いていないカチオン (Mg²⁺ など) の構造への寄与が考えられる。さらに Ala84 残基周囲 (α -ヘリックス) の構造とダイナミクスの変化が誘起されたことより、膜貫通領域の一部にも二価カチオン除去の影響が及ぶことが分った。結論として、細胞質側膜表面高次構造の維持には二価カチオンを含む金属イオンが重要な役割を果たしていると言える。

K Yonebayashi, S Yamaguchi, S Tuzi, R Needleman, J K. Lanyi, A Naito, H Saito : Cation-induced alterations on the cytoplasmic surface structure and dynamics of bacteriorhodopsin, as viewed by solid state ¹³C NMR

2F1400

バクテリオロドプシンにおける Asp212 の高次構造への寄与；固体高分解能 ¹³C NMR による研究

○谷生 道一¹、辻 暁¹、Richard Needleman²、Janos K. Lanyi³、内藤 晶¹、斉藤 肇¹（¹ 姫路工大・理、² ウェイン州立大、³ カリフォルニア大）

光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (bR) は、光励起後に蛋白質中心部に位置する Asp85 のプロトン化を起こす。昨年の年会では、この Asp85 の荷電状態の変化が、レチナールシッフ塩基近傍に位置する Val49 主鎖および細胞外側プロトンチャネルに位置する Arg82 側鎖の構造変化を誘起することを報告した。一方、これまで報告されている bR 立体構造モデルでは、レチナールシッフ塩基と Arg82 に対して Asp85 とほぼ対称な位置に Asp212 が存在している。この位置のアスパラギン酸は、ほとんどの古細菌ロドプシンで保存されていることから、構造上および機能上重要な働きをしていることが予想される。本研究では、この Asp212 の電荷が bR 高次構造にどのような寄与を与えるかを、固体高分解能 ¹³C NMR を用いて解析し、Asp85 との類似点・相違点について解析を行った。

D212N 変異株は 10 mM NaCl 存在下では中性において青色 (585 nm) を呈することから、その構造は野生株 (WT) よりも同じ青色を呈する D85N に類似していると予想された。実際、[3-¹³C]Ala および [1-¹³C]Val 標識 D212N 変異株の ¹³C NMR スペクトルは、WT よりも D85N のそれらに類似していた。しかし D85N と異なり、D212N では Val49 の著しい構造変化は観測されず、さらに D212N/R82Q 変異株の解析から Asp212 の Arg82 に対する寄与も Asp85 とは異なることが示唆された。もし光サイクルの後半に Asp212 のプロトン化が起こるのであれば [Dioumaev et al., (1999) *Biochemistry* 38, 10070-10078]、このような Asp85 と Asp212 の bR 高次構造への寄与の違いが不可逆的なプロトン輸送に関与しているのかもしれない。

M. Tanio, S. Tuzi, R. Needleman, J. K. Lanyi, A. Naito and H. Saito : Contributions of Asp212 to the conformation of bacteriorhodopsin ; ¹³C solid-state NMR studies

2F1430

バクテリオロドプシンの熱変性過程で起こる構造変化と光誘起変性現象との関係

○横山 泰範、園山 正史、美宅 成樹（農工大・工）

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌の細胞膜中にある膜タンパク質で、光エネルギーを利用してプロトンの能動輸送を行なう。これまでに bR に対して様々な変性実験が行なわれ、その熱変性過程では 80℃ 付近で 2 次元結晶の融解が起こり、95℃ 以上で 3 次元構造の崩壊が起こることがわかっている。一方で、我々は 80℃ 以上の温度で bR に光を照射すると変性が促進されるという現象を見出してきたが、この光誘起変性に対応した熱変性過程で起こる bR の構造変化に関してはまだ不明な点が多い。そこで本研究では、50-90℃ における bR の吸収・CD スペクトルの経時変化を暗中・光照射下において測定するとともに、その可逆性についても調べた。暗中における bR の熱変性を吸収スペクトルの変化により調べたところ、65-70℃ で 560 nm 付近の吸収バンドのブルーシフトと強度の減少が見られはじめた。温度を急冷して可逆性を見ると、75℃ までは可逆な変化しか起こらなかったのに対し、bR の変性による吸収スペクトルの不可逆な変化は 80℃ 付近から見られはじめた。可視 CD スペクトル測定では、常温で見られたエキサイトン型の CD バンドが 65℃ 付近からポジティブバンドへと変化しはじめ、80℃ 付近でこの変化は完了した。可視 CD バンド変化の可逆性も調べたところ、ポジティブバンドが見られた温度では可逆な CD バンドの変化は見られなかった。このような CD バンドの変化は bR の 2 次元結晶の融解と対応していることが報告されており、80℃ 付近ではじまる bR の熱変性はその 2 次元結晶の融解と関係していることが示唆された。一方光照射下では、bR の吸収スペクトルの不可逆な変化は 65℃ 付近から見られはじめた。65℃ 付近では吸収スペクトルの可逆な変化や可視 CD バンドのポジティブ型への変化が起こりはじめていることから、これらのスペクトル変化が bR の光誘起変性のきっかけとなる構造変化を示唆している可能性が示された。

Y.Yokoyama, M.Sonoyama, S.Mitaku : Light-induced denaturation phenomenon of bacteriorhodopsin during its thermal unfolding process