2F1445

ファラオニスハロロドプシンの変異体タンパク質がクロライドイオン親和性に及ぼす影響

○金盛 竜朗, 岩本 真幸, 鷺見 正人, 加茂 直樹 (北大・院薬)

バクテリオロドプシン (bR) およびハロロドプシン (hR) は、高度好塩菌の細胞膜に存在する光駆動型イオンポンプである。両者は一次構造上高い相同性を有するが、輸送するイオンの種類、その方向など、機能は大きく異なっている。bR については研究が進み、プロトン輸送に必須とされるアミノ酸残基の同定がなされている。なかでも 85 番目の Asp は、bR が光によって励起された後、プロトン化シッフ塩基からプロトンを受け取るアクセプターとして大きな役割を果たしている。また、bR の 85 番目の Asp 残基を Thr に置換すると、クロライドイオンポンプとして機能することが知られている。このように、ただ一つのアミノ酸残基を変えただけでまったく別の機能を持つ、という例は他になく、この残基の重要性が伺える。一方で、hR のクロライドイオン輸送についての詳細なメカニズム、特にどのアミノ酸を経由してイオンが輸送されるか、ということは未だ明らかにされていない。今回我々は *Natrobacterium pharaonis* に存在する hR, phR の 126 番目の Thr (これは bR の 85 番目の Asp に相当する) に着目し、大腸菌での発現系を用いた部位特異的な変異実験により、その光学的性質を解析しようと試みた。しかし結果として phR の 126 番目の Thr を Asp に置換しても、bR がクロライドポンプとなったように、プロトンポンプとはならなかった。また、この T126D 変異体では、bR において acid-blue と呼ばれる、強酸性条件下の吸収極大シフトがみられなかった。このことから、この変異体 phR におけるプロトン化シッフ塩基と、導入した Asp の相互作用が、bR におけるそれよりも強固であることが唆された。現在は同部位に新たな変異を導入し、それらの変異体タンパク質について検討中である。

T.Kanamori, M.Iwamoto, M.Sumii, N.Kamo : Effect of mutant protein of pharaonis halorhodopsin on its affinity for chloride

2F1530

二糖による膜蛋白質立体構造安定化の機構：固体高分解能 ^{13}C NMR による解析

○辻 暁, 内藤 晶, 斉藤 肇 (姫路工大・理)

トレハロース、スクロース等の二糖類は膜蛋白質の乾燥、加熱等による変性を妨げる保護剤としての作用を持つことが知られており、なかでもトレハロースによる蛋白質安定化の効果は高いと報告されている。ここでは光プロトンポンプ活性を持つ膜蛋白質バクテリオロドプシンを試料として、二糖の共存による膜蛋白質の立体構造への影響を固体高分解能 ^{13}C NMR を用いて分子レベルで解析した。バクテリオロドプシンを含む生体膜懸濁液において、20-60 % (w/w) の範囲での糖の添加は、バクテリオロドプシンの親水表面に位置するループおよび末端部フラグメントの信号に糖-OH 基の濃度に依存する低磁場シフトを誘起した。このシフトは蛋白質親水部に水素結合している水分子の糖-OH 基による置換に由来すると考えられ、蛋白質表面と糖の直接の相互作用を示している。このとき膜貫通部位に位置する蛋白質疎水部分の構造は糖の添加による影響を受けないことが見いだされた。紫膜の 40 % (w/w) 二糖溶液懸濁液を相対湿度 86 % で平衡化すると、スクロース試料は溶液状態を保つが、トレハロース試料は常温で固体状のガラス状態をとる。スクロース試料は 60 % (w/w) スクロース溶液の場合とはほぼ一致する信号を示した。一方、トレハロース試料では蛋白質由来の CPMAS NMR 信号はスクロース試料とはほぼ一致し、蛋白質立体構造がガラス化した糖マトリクス中で溶液状態と同様に保たれていることが示された。これに対し、DDMAS 法によって観測される運動性の高い C-末端部位の信号はスクロース試料と異なり大きな運動速度の低下を示した。相対湿度 0 % での平衡化は蛋白質の信号全体を大きく変化させることから、トレハロースによる構造保護機構の少なくとも一部は生体膜表面に水素結合した糖のマトリクスのガラス化により蛋白質表面の構造が固定されるとともに膜中の水分子の蒸散が妨げられることによると考えられる。

S. Tuzi, A. Naito, and H. Saito : Mechanism of stabilization of membrane protein by disaccharide: a high-resolution solid state ^{13}C NMR study

2F1500

ファラオニスフォボロドプシンの光照射プロトン輸送に対するトランスジューサ蛋白質の影響

○須藤 雄気¹、岩本 真幸¹、下野 和実¹、鷺見 正人¹、小山行^{1,2}、加茂 直樹¹ (¹ 北海道大学大学院薬学研究科、² 富士フィルム (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中に存在する光受容レチナール蛋白質であり、ppR が受けた光信号は、トランスジューサ蛋白質 (pHtrII) をへて、鞭毛モータに伝えられる。しかし ppR と pHtrII との相互作用、およびその信号伝達の詳細は未だほとんど明らかにされていないのが現状である。

ppR と同様、光センサー蛋白質として機能するセンサーロドプシンは、光照射によりプロトンを細胞内から細胞外へ輸送すること、およびトランスジューサ蛋白質と複合体を形成すると、その輸送が止まることが知られている。このことより、プロトン輸送そのもの、またはプロトン輸送の機構の一部が、シグナル伝達と密接に関係しているのではないかと考えられる。ppR / pHtrII に於いても、同様のことが想定される。

そこで我々は、微量な pH 変化を感度良く測定できる SnO_2 透明電極を用い、ppR 単独時、および pHtrII との複合体形成時の光照射によるプロトン輸送活性を測定した。ppR 単独時にはプロトンを細胞内から細胞外へ輸送するのに対し、pHtrII との複合体ではプロトン輸送が観測されなかった。この可能性として、1) 複合体形成によりプロトンの放出／取込みがなくなる、2) 細胞外からプロトンが取込まれ、同方向の細胞外へ放出される、3) 細胞内から取込まれ、同方向の細胞内へ放出される、等が考えられるが、いずれが正しいかについては現在検討中である。

Y. Sudo, M. Iwamoto, K. Shimono, M. Sumi, K. Koyama, N. Kamo : Effect of transducer protein on the photo-induced transmembrane proton-transport by *pharaonis* phoborhodopsin.

2F1545

H^+ -ATP 合成酵素サブユニット c の合成と固体 NMR

○望月 晃司¹、小西 寛生¹、佐藤 毅²、川上 徹²、相本 三郎²、吉田 賢右³、藤原 敏道¹、阿久津 秀雄^{1,2} (¹ 横浜国大・工、² 阪大・蛋白研、³ 東工大・資源研)

緒言 H^+ -ATP 合成酵素は F_1 部位と F_0 部位から構成され、 F_0 は 3 種類のサブユニットからなる。subunit c はモノマーでは 2 本の α -helix が脂質二重膜を貫通するような構造をとっており、これらが 10~12 本集まって、ドーナツ状に配置されたオリゴマーを構成していると考えられている。しかし、これらのモデルは溶液 NMR などを基に作られたもので天然状態とは異なる。そこで、本研究では subunit c を人工膜に埋め込み膜中での機能と構造を固体 NMR により解析をめざす。**実験** (1) 安定同位体でラベルされた subunit c の合成と精製：固相合成機を用い、安定同位体 (^{13}C) でラベルされたアミノ酸 (Ala24, Asp61) が導入された subunit c の合成を行った。ここで得た crude subunit c を逆相 HPLC を用いて精製した。Gly (^{15}N) ラベル subunit c についてはアミノ酸培地により大腸菌 MEG 119 株で大量発現させた。精製は CHCl_3 ・MeOH などの有機溶媒を用いた方法で行い、最終的に crude 状態の subunit c を陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。(2) subunit c の膜への導入と固体 NMR 測定：subunit c の膜への再構成として DPPC にラベル subunit c を加えて膜中に導入した。この試料を相対湿度等を変化させながら固体 NMR 測定を行った。**結果** (1) 安定同位体でラベルされた subunit c の合成と精製：化学合成で得た物は、質量分析、アミノ酸分析とも理論値と一致した。大腸菌で大量発現させた subunit c の精製物を SDS-PAGE で確認したところ理論値と一致した。よって、これらの方法により安定同位体でラベルした subunit c の合成方法、精製方法を確立できた。(2) subunit c の膜への導入と固体 NMR 測定：ラベル subunit c を膜中に再構成して、固体 NMR 測定を相対湿度等の条件を変化させて行った。この結果、ラベル部分のシグナルが観測された。

K.Mochizuki, T.Sato, T.Kawakami, S.Aimoto, M.Yoshida, T.Fujiwara and H.Akutsu : Synthesis and Solid-state NMR of H^+ -ATP synthase