1P117

平滑筋ミオシン制御軽鎖 N 末端部とテロキンとの相互作用

○飯原 寛子¹、木村 啓子¹、加藤 剛志²、矢澤 道生¹ (¹北大・院理・化学、²旭川医大・医・1生化)

平滑筋ミオシンは、重鎖、必須軽鎖、制御軽鎖 (RLC) から成り、精製したものは脱リン酸化状態では、生理的条件下でも、フィラメントを形成しない。しかし、生体内では脱リン酸化ミオシンもフィラメントとして存在し、生体内では脱リン酸化ミオシンフィラメントはテロキンなどのタンパク質によって安定化されていると考えられている。平滑筋ミオシンのテロキン結合については、当研究室正戸らにより、RLC の Lys3 及び Lys6 の寄与が示唆されていたので、N 末端 4 及び 8 残基を欠失させた変異体 RLC(それぞれ N-4 RLC、N-8 RLC) を遺伝子工学的手法により調製し、テロキン結合に対する RLC の N 末端部の寄与について調べた。これらの RLC を鶏砂囊平滑筋ミオシンに交換導入して、共沈法によりテロキンとの結合を調べたところ、未処理のミオシン、野生型 RLC 導入ミオシン、N-4 RLC 導入ミオシンは同程度のテロキン親和性を示した。しかし、N-8 RLC 導入ミオシンではテロキンに対する親和性はこれらの～50%であった。したがって、テロキンとの相互作用には主に RLC の Lys6 が寄与すると考えられた。しかし、N 末端 8 残基欠失の影響はあまり大きくはなく、テロキンとの結合には RLC だけでなく重鎖との相互作用も重要と考えられた。そこで、これらの RLC を、テロキンと結合できない骨格筋ミオシンへ導入し、テロキン結合における平滑筋ミオシン重鎖の重要性を検討した。野生型平滑筋 RLC を導入した骨格筋ミオシンはテロキンと結合したが、その親和性は平滑筋ミオシンに比べて著しく低く、平滑筋ミオシン重鎖との結合の重要性が確認された。また、N-8 RLC 導入骨格筋ミオシンとテロキンの結合も観察され、平滑筋 RLC 上には N 末端部以外にもテロキン結合部位がある可能性が示唆されたが、これについては現在、さらに詳細に検討している。

H. Iihara, K. Kimura, T. Katoh and M. Yazawa : Interaction between the N-terminal Region of Smooth Muscle Myosin Regulatory Light Chain and Telokin

1P119

バクテリオロドプシンのプロトンポンプ機能に対するハロゲン化炭化水素による阻害部位

○植野 哲¹、柴田 瑩¹、樋口 富彦¹、加茂 直樹² (¹徳島大薬、²北大院薬)

[1] 紫膜 (PM) 中のバクテリオロドプシン (bR) は、光駆動性のプロトンポンプ機能を有しており、分子中の Lys216 との間で形成しているレチナールシッフ塩基のシス-トランスの異性化反応が機能発現の引き金になっている。我々は、PM に対し光を照射した際に観測される容量性充電電流の時間変化のプロファイルを詳細に解析し、bR プロトンポンプ機能に対するハロゲン化炭化水素による阻害部位について検討した。[2] PM は、高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* S9 の形質膜より常法に従って単離した。bR のプロトンポンプ活性の測定は紫膜をポリエステル薄膜 (厚さ 0.9 μ m) に吸着させた¹⁾ 基盤に吸着した紫膜²⁾ を用いる Muneyuki¹⁾ 等の方法で測定した。[3] エーテル型ハロゲン化炭化水素エンフルランは、濃度依存的にレチナール周辺の環境を変化させ、これに伴ってポンプ機能を阻害した。一方、エーテル型ハロゲン化炭化水素セボフルランでは、レチナール周辺に対する影響力は弱い。セボフルラン共存状態における充電電流の時間プロファイルは、D96N ミュータントのものと類似している。これらの結果から、セボフルランによるプロトンポンプ機能にたいする阻害部位は、レチナール周辺ではなく D96 残基周辺の紫膜相 / 水相界面付近であることが示唆された。1) Muneyuki, E., Okuno, D., Yoshida, M., Ikai, A., Arakawa, H., *FEBS Lett*, 427, 109.

S. Ueno, A. Shibata, T. Higuchi and N. Kamo : Sites of inhibition of bacteriorhodopsin proton pumping activity by halogenated hydrocarbons

1P118

疎水性カチオンによるバクテリオロドプシンのプロトンポンプ活性の発現：三級アミン誘導体の効果

○頼光 絢子¹、柴田 瑩¹、植野 哲¹、樋口 富彦²、宗行 英朗³、加茂 直樹⁴ (¹徳島大・薬・薬品物化、²徳島大・薬・微生物、³東工大・資源化学研、⁴北大院・薬)

高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜から単離した紫膜は、脂質二分子膜上に膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) が二次元結晶状に配列した膜片である。bR は光駆動性のプロトンポンプ機能を有し、そのポンプ活性の発現には Ca^{2+} と Mg^{2+} が必須である。紫膜からこれら二価カチオンを除去すると、ポンプ活性を持たない青膜へと可逆的に転移する。 Ca^{2+} と Mg^{2+} は、bR に特異的に結合してプロトン受容体である Asp⁸⁵ を負電荷状態に保つ役割を持っていると考えられている。一方で、 Na^{+} やある種の有機カチオンの結合による青膜-紫膜転移も報告されている。本研究では、芳香環を有するエステルあるいはアミド型の三級アミン塩酸塩により誘導される青膜-紫膜転移に注目して、分光測定および電気化学測定を行い、bR のプロトンポンプ活性の発現因子について検討した。電気化学測定は青膜をポリエステル薄膜に配向吸着させて行った。まず Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cs^{+} による青膜-紫膜転移を確認した。金属カチオンでは、荷電数が同じであればカチオンの種類によらず同程度のポンプ活性発現効果が得られた。さらに、複数の三級アミン塩酸塩によってもポンプ活性の発現が起こることが示された。その効果は各アミンの分子量と分配係数に依存する傾向にあった。このことから bR のポンプ活性の発現には電荷のみならず、疎水性相互作用も寄与していることが示された。また、野生株 bR とプロトン輸送にかかわるアミノ酸残基を置換した変異株 bR との比較により、三級アミン塩酸塩の作用機構を検討した。少なくとも、三級アミン塩酸塩による紫膜中の bR のポンプ活性の阻害は、Glu²⁰⁴ を介さずに発現することを示唆する結果が得られた。

A. Yorimitsu, A. Shibata, S. Ueno, T. Higuchi, E. Muneyuki and N. Kamo : Expression of the proton pump activity of bacteriorhodopsin with hydrophobic cations: the effect of tertiary amine derivatives

1P120

ハロゲン置換レチナールを発色団とするバクテリオロドプシンアナログ

○浜中 俊明¹、平木 研司²、Zheng Xiang-Guo²、品田 哲郎²、吉原 和雄²、鬼頭 勇次³ (¹阪大院・基礎工・生物工学、²サントリー生有研、³TYK 光生物研)

バクテリオロドプシンの発色団レチナールは光プロトンポンプ機能に直接関わっている。レチナールのポリエーテル鎖の C9 および C13 位に結合するメチル基は発色団ポケット内で Trp182 と van der Waals 接触するなど近傍のアミノ酸残基と相互作用しており、この相互作用が光サイクルおよびプロトンポンプ機能にとって重要であることが知られている。C13 位のメチル基を他のものに置換した場合に生じる相互作用の変化が光サイクルおよびプロトンポンプ機能にどのような影響を与えるのか興味を持たれる。そこで我々は、C13 位のメチル基をハロゲン原子である F、Cl、Br および I で置換したレチナール四種類を合成し、これらが発色団とする再構成バクテリオロドプシンの光サイクルおよびプロトンポンプ機能を調べた。再構成バクテリオロドプシンの吸収極大波長は、それぞれ 598nm(13IPM)、598nm(13BrPM)、597nm(13CIPM) および 566nm(13FPM) であった。また、発色団の異性体組成 all-trans/13-cis は 97/3(13IPM)、93/7(13BrPM)、90/10(13CIPM) および 51/49(13FPM) であったが、いずれも明暗順応を示さなかった。このうち、13-F-レチナールを発色団とするものは光サイクルもプロトンポンプ活性も示さなかった。F 原子は C13 置換基のサイズとしては最小であり、電気陰性度では最大である。M 中間体の崩壊の半定数は 2.7ms(13IPM)、6.1ms(13BrPM) および 10.3ms(13CIPM) と置換原子の大きさとともに短くなった。また、近紫外部の aromatic 残基に起因する CD スペクトルは置換原子の大きさとともに大きくなった。この研究から置換原子のサイズの効果がバクテリオロドプシンの性質に大きな影響を及ぼすことが分かった。他方、電気陰性度の違いはあまり影響していないように思われる。

T.Hamanaka, K.Hiraki, X.-G.Zheng, T.Shinada, K.Yoshihara and Y.Kito : Bacteriorhodopsin analogues reconstituted with halogenated retinals