1P121

ファラオニスフォボロドプシンの Arg-72 がM中間体崩壊速度に与える影響について

○池浦 夕香子、須藤 雄気、岩本 真幸、下野 和実、加茂 直樹（北大・院薬）

高度好塩好アルカリ性菌 *Natronobacterium pharaonis* の細胞膜には、レチナル蛋白質であるファラオニスフォボロドプシン (ppR) が存在する。ppR は、バクテリオロドプシン (bR) と一次構造上の高い相同性を有しているが、bR が光駆動型プロトンポンプとして機能するのに対して、ppR は光センサーとして機能する。この光駆動型イオンポンプから光センサーといった機能分化や、ppR の光センサー機能発現のメカニズムの詳細は現在、解明に至っていない。この解明はレチナルタンパク質に共通した原理、性質を明らかにするのに重要であると考えられる。

バクテリアのレチナル蛋白質は、特定波長の光により励起され、エネルギーを緩和する過程で吸収波長の異なるいくつかの準安定化状態（光中間体）を経て、再び基底状態に戻るというサイクリックな光化学反応を示し、この間にそれぞれの機能を発現すると考えられている。ppR においても、M や O といった光中間体を経て、基底状態に戻るという bR と類似したフォトサイクルが知られているが、その速度は bR と比較すると非常に遅い。しかし、ppR にもプロトン輸送活性があることが明らかになっている。bR でプロトン輸送に重要な役割を担っている Arg-82 は、バクテリアの全てのレチナルタンパク質において完全に保存されていることから、bR 以外のレチナルタンパク質でも、その機能において重要な役割を担っているのではないかと考えられる。

そこで、ppR では 72 番目に存在するこのアルギニンをそれぞれ、アラニン、リジン、グルタミンに置換したミュータント を作製したところ、M 中間体の崩壊速度が全てのミュータントで、wild-type と比較して 10 倍以上と著しく速くなるということがわかった。ポスターでは、この機構について発表したい。

Y. Ikeura, Y. Sudo, M. Iwamoto, K. Shimono and N. Kamo : Influence of Arg-72 of pharaonis phoborhodopsin on M intermediate decay

1P123

ファラオニスフォボロドプシンの低温赤外分光

○神取 秀樹¹、下野 和実²、岩本 真幸²、須藤 雄気²、七田 芳則¹、加茂 直樹²（¹京大・院理・生物物理、²北大・薬）

古細菌のロドプシンが光を吸収すると、発色団レチナル分子の異性化反応が起こる。そして後続する蛋白質構造変化によって、光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (BR) では光エネルギー変換が、ファラオニスフォボロドプシン (ppR) などのセンサー蛋白質では光情報変換が実現する。ppR はトランスデューサー非存在下では BR のようにプロトンをポンプする 1 もの、吸収の性質 (70 nm ほどの短波長シフトとスペクトルの振動構造) や異性体組成、初期中間体の安定性が BR とは大きく異なっている。そこで本研究においては、低温赤外分光 (77-170 K) を用いて ppR の異性化反応に伴うスペクトル変化を測定し、これまでに多くの知見の得られている BR の結果を対照として、その構造や構造変化を比較した。

His-tag をつけた ppR を可溶化、精製し、脂質膜に再構成した試料に対する測定の結果、ppR に特徴的な性質は発色団の両端付近の蛋白質構造によってもたらされることが示唆された。さらに、ppR の異性化に際しては BR と同様、シッフ塩基部分が回転するものの、K 中間体の構造は、変化がシッフ塩基部分に局在する BR とは大きく異なり発色団全体に拡がっていることが明らかになった。これらの違いが K 中間体の安定性に関与しているものと考えられる。ポスターでは、最近報告された ppR の立体構造³も併せて、構造や異性化に伴う構造変化について議論したい。

1. Sudo et al. (2001) Biophys. J. 80, 916.
2. Kandori et al. (2001) Biochemistry in press.
3. Luecke et al. (2001) Science in press.

H. Kandori, K. Shimono, M. Iwamoto, Y. Sudo, Y. Shichida and N. Kamo : Low-temperature FTIR spectroscopy of pharaonis phoborhodopsin

1P122

ファラオニスフォボロドプシン・トランスデューサー蛋白質複合体の M 中間体に対する水溶性試薬の影響

○須藤 雄気、岩本 真幸、下野 和実、加茂 直樹（北大・院薬）

高度好塩好アルカリ性菌 *Natronobacterium pharaonis* には、レチナルを発色団とする光受容膜蛋白質、ファラオニスフォボロドプシン (ppR) が存在する。ppR は光を受けると膜中で複合体を形成するトランスデューサー蛋白質 (pHtrII) に情報を伝達する。その結果、好塩菌は有害な光から遠ざかる走光性と呼ばれる機能を獲得している。ppR は安定性に優れることや大腸菌における発現系が確立していることなどから、光センサー蛋白質の中で唯一結晶構造が解かれるなど近年非常に注目されつつある蛋白質である。

我々は先に、ppR 単独時に有するプロトン輸送能が pHtrII との複合体形成時に消失することを示した。このことは、バクテリオロドプシン同様、M 中間体時に F ヘリックスの細胞質側が外側へ動くことにより、ppR 単独時にはプロトン輸送を可能とするが、複合体形成時にはこの動きが制限され輸送が起こらないためと考察した。

アザイド及びヒドロキシルアミンは、ppR の M 中間体と反応する水溶性試薬である。両試薬とも反応部位はレチナル近傍であり、通常は水溶性試薬が到達できるとは考えにくい。我々は M と反応する理由が、M 中間体時に細胞質側が親水的環境になることに由来するものであり、複合体形成時には、試薬との反応性が低下するのではないかと考えた。そこで、試薬濃度及び M 中間体寿命を変化させることにより試薬との反応性を測定した。その結果、基底状態ではヒドロキシルアミンとの反応性に大きな違いがなかったが、M 中間体では、ppR 単独時に比べ、ppR/トランスデューサー蛋白質複合体との反応性が両試薬とも大きく低下した (アザイド約 4.6 倍、ヒドロキシルアミン約 7.4 倍)。この結果は pHtrII が ppR のヘリックスの動きを制限していることを示唆するものであると考えられる。

Y. Sudo, M. Iwamoto, K. Shimono, N. Kamo : Photo-dependent reactivity of ppR/t-Htr complex with water-soluble reagents of azide and hydroxylamine

1P124

ファラオニスフォボロドプシン多重変異体の低温赤外分光法による構造解析

○下野 和実¹、古谷 祐詞²、神取 秀樹²、七田 芳則²、加茂 直樹¹（¹北大・院薬、²京大・院理・生物物理）

ファラオニスフォボロドプシン (ppR) は、バクテリオロドプシン (BR) 同様レチナルを発色団とする光受容膜蛋白質である。発色団近傍のアミノ酸は高度に保存されているものの、ppR は BR より 70 nm 短波長側に極大吸収波長を持つ。我々はこれまで、発色団から 5 Å 以内のアミノ酸のうち、両者で異なる 10 個をすべて BR のものに変異させた多重変異体 ppR (BR/ppR) を作製したものの、変異による長波長化は 40 % 以下に留まった¹。そこで本研究においては、吸収スペクトルに影響する構造を解析する目的で、多重変異体と ppR、BR の低温赤外分光を行った。

これまでに、ppR は BR と異なり光異性化による構造変化が発色団全体に拡がることがわかっているが²、BR/ppR の構造変化は BR のようにシッフ塩基近傍に局在していた。3 者の蛋白質で同様の構造を示したポリエン鎖部分も含め、BR/ppR の発色団近傍は BR のような構造をとっているものと考えられる。ところが、シッフ塩基に由来する振動バンドだけは、BR とは大きく異なり ppR とほぼ等しかった。このことは、レチナルシッフ塩基部分の構造構築がより広範な領域に依存することを示し、BR/ppR における限定された波長シフトの主要因であると考えられる。ポスターでは、最近報告された ppR の立体構造³も併せて、ppR と BR それぞれに特徴的な構造について議論したい。

1. Shimono et al. BBA submitted.
2. Kandori et al. (2001) Biochemistry in press.
3. Luecke et al. (2001) Science in press.

K. Shimono, Y. Furutani, H. Kandori, Y. Shichida and N. Kamo : Structure of a ppR mutant having the retinal binding site of BR