1P133

Photoactive Yellow Protein M 中間体崩壊過程の律速段階

○熊内 雅人、濱田 格雄、佐々木 純、徳永 史生（阪大院・理・宇宙地球）

Ectothiorhodospira Halophila の光受容タンパク質である Photoactive Yellow Protein (PYP) は 125 アミノ酸残基からなる分子量約 14kD の水溶性タンパク質である。Cys69 でチオールエステル結合した *p*-クマール酸を発色団として持ち 446nm に吸収極大を持つ。PYP_{Dark} が可視光を吸収するといくつかの反応中間体を経て 1 秒以内に再び PYP_{Dark} へと戻る光サイクルが始動する。光サイクル中での変化は (1) 発色団のプロトン化・脱プロトン化 (2) 発色団の *cis-trans* 異性化 (3) タンパク質の構造変化に大別できる。一般に室温下、溶媒中では二重結合の *cis-trans* 熱異性化速度は極めて遅いが PYP 中では M 中間体 (PYP_M) の崩壊過程で極めて速く熱異性化反応が進行する。本研究では PYP_M 崩壊過程の律速段階の決定と発色団の速やかな熱異性化を制御している機構を解明するため Methionine100 に注目し 4 種の Met100 変異 PYP の調製を行った。これら変異 PYP の吸収極大波長は野生型 (WT) と比べ変化しなかったが PYP_M の寿命は 50~1000 倍長くなった。PYP_M 崩壊過程の反応速度の温度依存性測定を行い、この過程の活性化パラメーターを求めたところ WT に比べ特に活性化エンタルピーの増加が顕著であった。これは、変異導入による影響が PYP_M 崩壊過程でも特に結合の生成、開裂に関係する過程に現れたことを示唆するものである。PYP_M の pKa と PYP_M 崩壊速度、活性化エンタルピーにはそれぞれ良い相関関係があり PYP_M 崩壊過程の律速段階は発色団の脱プロトン化過程であり Met100 は発色団の pKa を調節することでこの過程の速やかな進行を可能にしているという結論を得た。

M.Kumauchi, N.Hamada, J.Sasaki and F.Tokunaga : The Rate-Determining Step of The M Intermediate Dycay Process of Photoactive Yellow Protein

1P135

アカパンカビにおける光信号伝達の初期過程の分子解析

○蓮沼 仰嗣（横浜市大・木原生研・総合理学）

アカパンカビの菌糸の粗膜分画を用いて光信号伝達の試験管内実験系を構築した。粗膜分画を 0℃、1 秒光照射することにより、15kDa タンパク質のリン酸化の上昇が見られた。15kDa タンパク質は粗抽出液より精製され、ヌクレオシド二リン酸キナーゼであることが判明し、NDK-1 と命名された。NDK-1 の cDNA、およびゲノミック DNA、*ndk-1* がクローニングされた。NDK-1 が全くリン酸化されない *psp* (phosphorylation of small protein) が単離された。*psp* の cDNA は Pro72His 変異を含んでいた。His タグ NDK-1 および His タグ NDK-1^{Pro72His} が構築され、大腸菌で発現され、精製された。His タグ NDK-1 は i) ATP+GDP → GTP+ADP の NDK 活性、ii) 自己リン酸化活性、iii) ミエリン塩基性タンパク質をリン酸化するタンパク質キナーゼ活性が存在した。しかし His タグ NDK-1^{Pro72His} は ii) の活性が野生型の 2%、iii) の活性はその Vmax が野生型の 5% であった。野生株は暗黒下に子嚢殻の胞子の放出口、ピークがランダムな方向に作られるが、培地に平行な光により、上方に作られる。しかし *psp* は光を当ててもランダムな方向に作る。*psp* に野生型 *ndk-1* の cDNA、ゲノミック DNA を導入すると、光に対する感受性は野生株と同一になった。従って、*psp* は *ndk-1*^{Pro72His} であることが判明した。*ndk-1*^{Pro72His} 変異株は活性酸素の発生剤であるパラコートに感受性であることが判明した。パラコートに耐性な変異株を 600 株単離したが、そのうち 400 株は菌糸におけるカロテノイド合成の光誘導が見られなかった。これらの変異株の示す性質は *wc-1*、*wc-2* という光受容体と考えられるタンパク質の変異株とその性質がかなり似ていた。パラコート耐性株は発生した活性酸素を消去するスーパーオキシドジムスターゼ (SOD) などの活性が強いと考えられる。このことは活性酸素が光信号伝達の初期過程に関与することを示唆している。

K.Hasunuma : Molecular analysis of early events occurring during light signal transduction in *Neurospora crassa*

1P134

クラミドモナスの古細菌型ロドプシン様蛋白質

○鈴木 武士¹、山崎 健太¹、小田 和司¹、伊関 峰生²、吉田 和治²、渡辺 正勝²、大安 裕美³、藤 博幸³、田畑 哲之⁴、三浦 謙治⁵、福澤 秀哉⁵、中村 省吾⁶、高橋 哲郎^{1,7} (¹ 北陸先端大・材料、² 基生研、³ 生物分子工研、⁴ かずさ DNA 研、⁵ 京大院・生命、⁶ 富山大・理、⁷ 東邦大・薬)

単細胞緑藻クラミドモナスの走光性受容体は眼点付近に局在するロドプシン様蛋白質であり、その発色団の立体構造、光異性化反応は古細菌型であることが生理学的解析より明らかである。これまでに光受容体分子の候補の報告はあるが、ロドプシン様蛋白質は見つかっていなかった。かずさ DNA 研のクラミドモナス EST データベースを古細菌のパクテリオロドプシン (bR) との相同性で検索すると、2 つの候補が新たに見い出された。これらの推定アミノ酸配列 (残基数 712、737) の N 末端側は 7 つの疎水領域から成る。2 次構造予測プログラムによるとこれらの疎水領域は α ヘリックスであり、bR の 7 本の膜貫通ヘリックスの位置とよく対応する。bR で発色団と相互作用する残基もよく保存されていることから、それぞれを Acop-1 (Archaeal-type Chlamydomonas opsin-1)、-2 と名付けた。ホモロジーモデリングによれば Acop-1 の推定膜貫通領域は bR と同じ立体構造をとる。系統解析の結果、Acop-1、-2 のロドプシン相同領域はセンサリーロドプシン 1 (sR-1)、フォボロドプシン (pR) の近傍にクラスタを作り、真正細菌のプロテオロドプシンファミリーと最も近縁で、菌類に見つかった古細菌型ロドプシンファミリーとは比較的遠縁であった。部分配列に対する抗ペプチド抗体による免疫組織学的検出からは、Acop-1 は眼点付近に局在することが確認された。Acop-1、-2 は、古細菌型ロドプシンファミリーに属するが、ロドプシン相同領域の C 末端側に機能未知の約 400 残基の領域があるほか、ヘリックス B が酸性残基 (D) に富むという既知のロドプシンにはない特徴をもつ。

T. Suzuki, K. Yamasaki, K. Oda, M. Iseki, K. Yoshida, M. Watanabe, H. Daiyasu, H. Toh, S. Tabata, K. Miura, H. Fukuzawa, S. Nakamura, T. Takahashi : Archaeal-type opsin in *Chlamydomonas*

1P136

タコ皮膚における感光性色素タンパク質 (2) _タコ皮膚における感光性色素タンパク質 (2)

○山下 友明、井上 明美、津田 基之 (姫工大理)

タコは外敵から身を守るために背景にあわせて皮膚を様々な色に変化させる。タコの皮膚は少なくとも 3 種類の色素細胞が確認されており、外側から表皮、3 層の色素細胞、虹色素細胞と白色色素細胞の反射板がありタコはこれらの色素細胞の大きさや反射板の角度を変えて自由に体色を変化させていると考えられる。また色素細胞については細胞体に含まれる色素の拡散・凝集により皮膚の色を変えていると考えられる。 タコの網膜には一種類の視物質しか見出されていないこと、視神経を切断しても体色変化を起こすことから眼以外に色を認識する組織があると思われる。当研究室においてはすでに遺伝子解析、抗体、レチナールイメージング法でタコの皮膚にレチナールタンパク質が存在する結果を得ている。本研究ではタコの皮膚より感光性色素を抽出してその生化学的・分光学的性質を明らかにする目的で研究を行った。まず 30 種の界面活性剤を用いて色素タンパク質の可溶化の効率と安定性を調べたところ、吸収スペクトルの形の異なる 3 タイプにわかれた。可溶化液に光照射による吸収スペクトルの変化を測定したところ、程度の差はあれいずれも青色光の照射により 440nm の吸収が減少し、それに橙色光を照射すると 470nm の吸収が回復した。コール酸ナトリウムが最も抽出効率が高いこと、SM 1200 で最も安定性が高いことから、後の抽出、精製にはこれらの界面活性剤を用いた。タコ皮膚の細胞をコール酸ナトリウムで可溶化した抽出液をヒドロキシアパタイトカラムに注入しその後は SM 1200 を含む燐酸溶液の濃度勾配で展開した。この結果、440 nm から 500 nm の吸収極大の異なる 4 つの分画を得ることができた。現在はそのタンパク質の生化学的性質、分光学的性質を明らかにすることを目的として実験を行っている。

T.Yamashita,A.Inoue and M.Tsida : Light sensitive chromoproteins in chromatophore of the Octopus