2H1400

好塩菌由来膜蛋白質 (pHtrII) の溶液構造解析とファラオニスフォロドプシンとの膜蛋白質間相互作用解析

○須藤 雄気^{1,2}、三島 正規²、加茂 直樹¹、児嶋 長次郎² (¹ 北大・薬・生物物理、² 奈良先端・バイオ)

高度好塩好アルカリ性菌 *Natronobacterium pharaonis* に存在する pHtrII は、光受容蛋白質ファラオニスフォロドプシン (ppR) と膜中で複合体を形成している¹。pHtrII は、ppR の光依存的構造変化を感知し、有害な光から遠ざかる走光性と呼ばれる機能が発揮される。我々は先に、膜貫通部位を保持した欠失変異体、pHtrII(1-159) を用い、界面活性剤 (DM) 中における ppR との化学量論比・結合定数を明らかにしてきた^{3,4}。本研究では、相互作用・情報伝達に関して詳細な議論を可能とするため、溶液 NMR による pHtrII の構造解析、及び ppR との相互作用情報を得ることを目的とした。

我々はまず、pHtrII(1-159) の DM 中における ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定したが、良好なスペクトルは得られなかった。他の界面活性剤、OG、CHAPSO でも同様の測定を行ったが、観測された信号の数は予想される半分程度であった。そこで、さらなる改善を目的に、可溶性部位をさらに欠失させた変異体 pHtrII(1-114) を作製し、OG、OTG、NG、DHPC 中において、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した。その結果、OG 中において、最も良好なスペクトルが得られた。さらに、ppR を共存させ同様の測定を行ったところ、NMR スペクトルが変化したこと、及び複合体の解離定数が以前算出した解離定数^{3,4} とほぼ等しかったことから、pHtrII(1-114) の信号が、ppR との複合体形成により変化したと考えられる。講演では現在解析中の ²H、¹³C、¹⁵N ラベル化蛋白質の結果も合わせて報告する予定である。

1. Sudo et al. (2001) Biophys. J. 80, 916. 2. 神取秀樹、加茂直樹 (2002) 蛋白質・核酸・酵素 47, 620. 3. Sudo et al. (2001) Photochem. Photobiol. 74, 489. 4. Sudo et al. (2002) Biophys. J. 83, 427.

Y.Sudo, M.Misima, N.Kamo and C.Kojima : Structural analysis of transmembrane helical halobacterial transducer protein and its interaction with *pharaonis* phoborhodopsin

2H1430

TritonX-100 による可溶化バクテリオロドプシンの光誘起変性

○佐々木 貴規¹、園山 正史¹、向井 有里²、中澤 千映子¹、美宅 成樹¹ (¹ 農工大・工・生命工、² 生命情報科学研究センター)

光駆動プロトンポンプ機能をもつバクテリオロドプシン (bR) は、*Halobacterium salinarum* の紫膜中で二次元結晶構造を形成している。最近では界面活性剤オクチルグルコシド (OG) により可溶化された bR は天然状態よりも不安定であり、暗で、照射下ともに常温で変性することが報告されている。また、OG 可溶化 bR では、天然 bR に特有の非対称エキサイトン可視 CD バンドは可溶化により消失することから、構造安定性と CD バンド間の関係が示唆されている。本研究では、可溶化 bR がポジティブな CD バンドを示すことで知られている界面活性剤 TritonX-100 (TX-100) を用いて、可溶化 bR の暗で、照射下それぞれの変性実験を行い、構造安定性を評価し、CD バンドと構造安定性との関係を調べた。実験方法としては、約 10 μ M の bR を TX-100 により 35℃、2h の条件下で可溶化後、30,000rpm、1h、4℃で遠心分離し、その上澄みを用いて 30~50℃での吸収変化測定および CD 測定を行った。照射下において、5mM-TX-100 可溶化 bR は OG 可溶化 bR と同様に常温でも光誘起変性挙動を示したが、暗中においては 50℃付近まで熱変性を起こさなかった。これらの結果から、可視領域の CD バンドで確認できる構造変化と、可溶化 bR の安定性との間にはなんらかの関係があることが示唆された。また、可溶化する際の TX-100 濃度を 5~50mM へ増加させたところ、CD バンドは同一のピークを示し、暗中においても 35℃では変性を起こさないが、照射下においては変性速度が上昇していることが観測された。これらの結果から、可溶化 bR の光機能中間体は TX-100 とのなんらかの相互作用により不安定化していることが示唆された。本学会ではこの可溶化 bR と TX-100 との関係についても詳しく議論する予定である。

T.Sasaki, M.Sonoyama, Y.Mukai, C.Nakazawa and S.Mitaku : Light-induced denaturation of bacteriorhodopsin solubilized by Triton X-100

2H1415

ファラオニスハロロドプシン変異体のクロライドイオン輸送と安定性

○佐藤 麻希¹、相沢 智康¹、出村 誠¹、新田 勝利¹、加茂 直樹² (¹ 北大院・理、² 北大院・薬)

高度好塩菌 *H. salinarum* 由来の光駆動型イオンポンプであるバクテリオロドプシン (sbR) 及びハロロドプシン (shR) は一次構造上高い相同性を有するにも関わらず、正負のイオン種を選択的に一方方向輸送する機構がある。これらの膜タンパク質のスイッチ装置を担うアミノ酸残基は、X 線結晶構造や分光学的成果に基づいてこれまで bR を中心に解明されてきた。一方、bR では 2000 年に X 線結晶構造解析され、クロライドイオンはレチナールシッフ塩基、Ser-115、Thr-111 側鎖とコンタクトしていることが示された。しかしその後、機能や安定性に関係するアミノ酸残基レベルの研究が十分すすんでいないのが現状である。高度好塩好アルカリ性菌 *N. pharaonis* 由来 bR (phR) は shR と高い相同性 (66 %) をもつことから、我々は、phR のクロライドイオン結合に重要なアミノ酸残基に着目し、そのクロライドイオン輸送と安定性への効果について検討することを目的とし、各種 phR 変異体を大腸菌発現系で作製した。phR の Ser-130 と Thr-126 の変異体はクロライド親和性と安定性がかなり変化するとを吸収スペクトルを中心に明らかにした。

M. Sato, T. Aizawa, M. Demura, K. Nitta and N. Kamo : Chloride ion transport and stability of pharaonis halorhodopsin mutants

2H1445

C 末端ペプチドを切除したバクテリオロドプシンの光誘起変性現象

○横山 泰範、園山 正史、美宅 成樹 (農工大・工・生命工)

好塩菌の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、複数の光中間体を経てプロトン輸送を行い、再び基底状態へ戻ることが知られている。近年報告された光中間体の詳細な構造から、細胞質側の構造変化が機能に重要であることが指摘されている。我々は光中間体の構造安定化メカニズムを明らかにするため、これまでに照射下での bR の変性実験を行ってきた。その結果、照射により引き起こされる変性、つまり光誘起変性現象は 60℃以上で起き、暗での bR 基底状態における可逆的な構造変化と何らかの関係があることを見出してきた。この結果は、暗での構造変化は光中間体からの復元を妨げるものであることを示唆しており、このような復元力に関する研究は光中間体の構造安定化メカニズムを考える上で非常に重要な情報を与えるものと考えられる。今回は、機能中に大きな構造変化が起きている細胞質側に着目し、中でも細胞質側ループとの相互作用が報告されている C 末端ペプチドに注目した。この C 末端ペプチドが bR の構造安定性に与える影響を調べるために、パバインにより C 末端ペプチドを切除した bR の暗・照射下での変性挙動を吸収・円二色性スペクトル測定により観測した。暗中において、パバイン処理 bR の温度に対する構造変化の様子は天然型 bR とほとんど変わらず、C 末端ペプチドは bR の構造や熱安定性にほとんど影響を与えていないことが示された。一方照射下では、パバイン処理 bR の光誘起変性が天然型よりもさらに 10℃低い 50℃付近から観測され、変性の速度論的な解析より約 8 kcal/mol の活性化エネルギーの低下が見積もられた。これらの結果により、C 末端ペプチドは光中間体のみを安定化させていることを示された。本年会では C 末端ペプチドがどのように光中間体の構造安定性に関与しているか議論したい。

Y. Yokoyama, M. Sonoyama and S. Mitaku : Light-induced denaturation of C-terminus cleaved bacteriorhodopsin.