B657

松果体細胞における光依存的な転写調節の分子メカニズム

○岡野 俊行^{1,2}、高中 陽子¹、加藤 哲¹、深田 吉孝¹ (¹ 東大院・理学系・生物化学、² 科技団・さがけ21)

動物の光受容細胞においては、概日時計を構成する時計タンパク質や光受容タンパク質オプシンの mRNA 量が光依存的に増加することが知られている。これらの現象は、それぞれ、概日時計の外部環境への光同調や、光依存的なオプシンの代謝（分解）を補う働きに関連すると考えられているが、その生理的な意味や詳細な分子機構には不明な点が多い。我々は以前、光感受性を示す眼外器官であるニワトリ松果体において、光受容分子ピノプシンの mRNA 量が光依存的に増加することを見いだした。今回、ピノプシンプロモーターの詳細な解析を行い、光応答に関わるシスエレメント（光応答配列）を同定した。まず、ピノプシン遺伝子のプロモーター領域（約 2 kbp）を単離し、この全長あるいはその部分領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーターコンストラクトを多数作製した。これらを、培養したニワトリ松果体細胞に導入し、光刺激の有無によるルシフェラーゼ活性の変化を調べた結果、転写開始点上流 1122 塩基 (-1122) までを含むコンストラクトにおいて光依存的なルシフェラーゼ活性の上昇が観察された。このことから、光によるピノプシン mRNA 量の増加は、おそらく光依存的な転写の誘導によると推測された。さらに、光応答に必要な領域を系統的に調べた結果、-1086~-1103 の間の 18 塩基の領域が必須であることが判明し、これをピノプシン光応答配列と命名した。このピノプシン光応答配列を含む 49 塩基対の領域を SV40 プロモーターに結合して同様のレポーターアッセイを行ったが、光依存的な転写誘導は観察されず、ピノプシン光応答配列はプロモーター特異性を示す可能性が示唆された。現在、ピノプシン光応答配列に結合するトランス因子を探るため、種々の臓器から核タンパク質を調製し、ピノプシン光応答配列をプローブに用いてゲルシフト解析を行っている。

T. Okano, Y. Takanaka, T. Kato and Y. Fukada : Molecular mechanism of light-dependent transcriptional regulation in the pineal cells.

B659

ホヤ幼生における視細胞と視覚サイクルシステムの可視化

○岩本 英男、堀江 健生、奥濃 清貴、中川 将司、日下部 岳広、津田 基之（姫路工大・院理・生命科学）

脊椎動物では光信号の受容は視細胞で行われ、光受容により異性化した全トランスレチナールはレチノールに還元された後、網膜色素上皮細胞 (RPE) へと移行する。網膜色素上皮細胞では、全トランス型から 11 シス型へと異性化された後、視細胞に戻り、ロドプシンを再生する（視覚サイクル）。一方、無脊椎動物での視覚サイクルは視細胞内で行われている。ホヤは脊椎動物の祖先型であり、その視覚サイクルの場を明らかにする事は脊椎動物の視覚サイクルの起源を探る上で重要である。

我々はすでにホヤの視細胞特異的遺伝子（オプシン、アレスチン）、視覚サイクル特異的遺伝子（*RGR*, *CRALBP*, *BCO/RPE65*）のホモログを単離し、その mRNA の発現を観察した。視細胞特異的遺伝子は視細胞に発現していたが、視覚サイクル特異的遺伝子は脳胞全体と運動神経節にまで発現していた。これらのタンパク質の局在を明らかにするため、これらの遺伝子産物の抗体を作製した。視細胞の特異的な抗体としてオプシン、アレスチンを、視覚サイクル特異的な抗体としてレチナール光異性化酵素、*CRALBP*, *BCO/RPE65* を用いた。*BCO/RPE65* 以外の抗体を得る事が出来た。*Ci-opsin1* は視細胞の外節に、*Ci-arr* は外節を含む視細胞全体に局在していた。*Ci-opsin3*, *Ci-CRALBP* は遺伝子と同様に脳胞全体を染色した。視細胞と視覚サイクルシステムの関係を示すために、視細胞をアレスチン抗体で、視覚サイクル細胞を *Ci-opsin3* 抗体で 2 重染色を行ったところ、*Ci-opsin3* は視細胞の一部を含む脳胞に広く局在していた。この結果からは、ホヤ幼生の視覚サイクルが視細胞のみで行われているのか、脳胞の視覚サイクル細胞で行われているか明らかでない。このことから、今後は視覚サイクル遺伝子をノックダウンするなどして調べていきたい。

H.Iwamoto, T.Horie, K.Okunou, M.Nakagawa, T.Kusakabe and M.Tsuda : Visualization of photoreceptor and visual cycle system in ascidian larva

B658

タコロドプシンの結晶化条件の検索

○松本 久実、芦田 明美、高良 匠、松本 修育、中川 将司、津田 基之（姫路工大・院理・生命科学）

G タンパク質共役型受容体は神経系や内分泌系で最も多く発現しているレセプターで、ロドプシンはその最たるモデルである。近年、ウシロドプシン（不活性型）が結晶化され立体構造が明らかとなった。しかし、ウシなど脊椎動物のロドプシンは、活性型が生理温度で分解するため結晶化が困難である。一方、無脊椎動物のロドプシンは活性型が生理温度で安定である。G タンパク質の活性化機構を明らかにするためには活性型の立体構造の解析が望まれる。そこで我々は、タコロドプシンを用いて不活性型および活性型ロドプシンの構造を解析し、両者を比較することで構造と機能の関係を明らかにしたいと考えている。

タコロドプシン（分子量約 5 万）は C 末端に由来する 3 つの分子量の異なるアイソフォームが存在する。そこで、G タンパク質の活性化能を保持しながら C 末端を切断した均一なロドプシン (t-Rh) を得ることを試みた。種々のプロテアーゼを検索した結果、V8 プロテアーゼで処理した視細胞膜画分を Nonyl-glucoside (NG) で可溶化し、硫酸分画を行うことにより目的とする t-Rh が単離できた。膜タンパク質の結晶化には界面活性剤が重要であるため、数十種類の界面活性剤での t-Rh の安定性を分光学的に調べた。また、動的光散乱により種々の界面活性剤での t-Rh の分子サイズの分布も調べた。その結果、Dodecyl-Maltoside (DDM) で最も安定性がよく、均一な分子サイズが得られることが分かったため、陰イオン交換カラムを用いて t-Rh が安定な DDM と交換した。この t-Rh を TOF-MS で分析したところ、均一なサンプルであることが分かった。現在、このようにして得られた標品について結晶化条件を検索している。

K.Matsumoto, A.Ashida, T.Takara, N.Matsumoto, M.Nakagawa and M.Tsuda : Research of Crystallization conditions in Octopus Rhodopsin

B660

古細菌型レチナールタンパク質ファミリーの比較解析

○井原 邦夫（名大・遺伝子）

高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* には、レチナールを発色団にもつ 7 回膜貫通タンパク質が、4 種存在している。それらは、2 種の光駆動性イオンポンプであるバクテリオロドプシン (bR) とハロロドプシン (hR)、2 種の光センサーであるセンサリーロドプシン (sR) とフォボロドプシン (pR) に分類される。これら 4 種のタンパク質は、好塩性古細菌が属レベルで分化する以前に、遺伝子重複によって同一遺伝子から増幅したことが推定されている。さらに、2 種のイオンポンプの内、塩素イオンポンプである hR は、プロトンポンプである bR よりも早い速度で進化した事が、2 種類の光センサーの内では、sR が pR より速い速度で進化した事が推定されている。この結果は、原始的なイオンポンプ、光センサーが、それぞれ bR 型、pR 型である事を示しており、タンパク質の進化を考える際の格好の材料であると思われる。ところが、好アルカリ性好塩性古細菌の中には、*Natronomonas pharaonis* のように bR, sR の存在が認められないものが存在する。機能分化したタンパク質の運命を知るために、他の好アルカリ性高度好塩菌でレチナールタンパク質がどのように分布しているのかを調べた。その結果、*Natronobacterium* 属や *Halorubrum* 属 (vacuolatum が好アルカリ性) でも hR しか見いだせなかった。*Halorubrum* 属の中で、レチナールタンパク質を 4 種持つ株、1 種持つ株、が存在する事は、bR (あるいは sR) の欠損が属レベルの分岐後に生じた事を示しており、この性質はアルカリ環境への適応の結果である可能性が高い事が推定された。この事は、bR が無くて光エネルギーが利用できなければ、sR も不要ということを意味しているのかもしれない。

K. Ihara : Comparative study of archaeal type retinal protein family