B669

脂質再構成ファラオニスフォボロドプシンの光化学反応：脂質および塩組成の影響

○水田 督久¹、下野 和実¹、岩本 真幸^{1,2}、須藤 雄気¹、加茂 直樹¹ (¹ 北大院・薬・生物物理、² 北大・先端研 (CAST))

ファラオニスフォボロドプシン (ppR) は高度好塩好アルカリ性菌に存在するレチナールを発色団とする膜タンパク質であり、負の走光性のレセプターである。ppR は 498nm に吸収極大を持ち、光励起により、M および O 中間体を経て、元の ppR に戻るというフォトサイクルを示す。いままでは、大腸菌での大量発現系を用い、精製した ppR の光化学反応を測定してきたが、本実験では脂質に再構成した試料の光化学反応を調べた。ppR：脂質=1：50 とした。ppR に対する脂質の量比を増加させても中間体の速度定数に変化はなかった。得られた結果は次の通りである。

1) 脂肪酸鎖長の決まった合成 PC に再構成した。炭素数=14 の鎖長の時、M の崩壊速度は一番遅かった。鎖長の変化は脂質二重層の厚さを変えると考えられるので、M が安定となるヘリックスの傾き等を含む配置があると考えられる。

2) DMPC および DPPC に再構成した。相転移温度である 21 °C および 40 °C で速度定数のアレニウスプロットに折れ曲がりは見られなかった。従って、脂質の運動性は、光化学反応速度に影響を与えないと考えられる。

3) 脂質の polar head の影響を調べるために、PC および PG に再構成した。4 から 9 の pH の範囲で、また、種々の濃度の NaCl または Na₂SO₄ 溶液で実験したところ、すべての条件で、PG に再構成した方が、M の崩壊速度が大きかった。それは、PG が負に荷電しているための電気的な相互作用によるものであると考えられたので、PC および PG において塩濃度依存性を調べたところ、PG に再構成させた方が、NaCl および Na₂SO₄ 溶液において、速度定数に濃度依存性が見られた。従って、脂質二重層による静電的な相互作用が影響していると考えられる。

T.Mizuta, K.Shimono, M.Iwamoto, Y.Sudo and N.Kamo : Photochemical reaction of lipid-reconstituted *pharaonis* phoborhodopsin: Effect of lipid and salt composition

B671

光受容・変換蛋白質複合体の光情報伝達機構：複合体形成により影響を受ける振動バンドの帰属

○須藤 雄気¹、古谷 祐詞^{2,3,4}、下野 和実¹、加茂 直樹¹、神取 秀樹^{2,4} (¹ 北大・院薬・生物物理、² 名工大・工・応用化学、³ 京大・院理・生物物理、⁴ CREST・JST)

高度好塩菌に存在する、ファラオニスフォボロドプシン (ppR) は、膜中で 2 回膜貫通型蛋白質 (pHtrII) と 2:2 の比で結合している¹。ppR が光を受けると、K, L 中間体を経て、活性型中間体を生成し pHtrII に情報を伝達する。光の情報は膜内でどのように伝達されるのであろうか？我々はこれまでに、低温赤外分光法を用いて、発色団レチナールの異性化前後での構造変化を pHtrII 非存在下²・存在下³で解析した。その結果、重水素置換されない X-H 基由来の伸縮振動のスペクトル変化が、複合体形成時にのみ観測されることを見出した³。

ppR の Tyr199 は pHtrII の Asn74 と水素結合を形成し、かつ複合体形成に重要な残基である⁴。そこで Tyr199 由来である可能性を変異体により検討したが、測定の結果は野生型と同じであった。レチナールの異性化は、近傍の構造変化を誘起すると考えられるので、次にレチナールシッフ塩基近傍の Thr204 に注目した。測定の結果 T204S 変異体では X-H 伸縮振動がシフトし、T204A 変異体では消失した。このことから X-H 伸縮振動は、Thr204 の O-H 基に由来すると結論した。ppR には、短波長に吸収極大をもち、フォトサイクルの速度が遅いという特徴がある。Thr204 は短波長化、中間体の崩壊速度制御に重要な残基である。今回我々は、複合体形成時の構造変化にも重要であることを明らかにした。シッフ塩基の水素結合、水分子の構造、Thr204 と水素結合を形成する Tyr174 変異体の実験結果も併せ、複合体形成機構と光情報伝達における初期構造変化に関して議論したい。

¹Sudo et al. (2001) Photochem. Photobiol. 74, 489. ²Kandori et al. (2001) Biochemistry 40, 9238. ³Furutani et al. (2003) Biochemistry 42, 4837. ⁴Sudo et al. (2002) Biophys. J. 83, 427.

Y.Sudo, Y.Furutani, K.Shimono, N.Kamo and H.Kandori : Primary structural changes of *pharaonis* phoborhodopsin/its transducer complex for signal transduction

B670

セミランダム変異導入法による古細菌型ロドプシンの吸収波長制御部位の同定の試み

○下野 和実¹、須藤 雄気¹、岩本 真幸²、加茂 直樹¹ (¹ 北大院・薬・生物物理、² 北大・先端研 (CAST))

古細菌型ロドプシンは、主として高度好塩菌に存在するレチナールを発色団とする光受容膜蛋白質であり、波長選択的な光受容機能をもつ。ファラオニスフォボロドプシン (ppR) は、他の古細菌型ロドプシン (バクテリオロドプシン (BR; 極大吸収波長 (λ_{max}), 570 nm) など) に比べ大きく短波長側に吸収を持つ (λ_{max} , 500 nm)。発色団周辺残基すべてを BR と同一アミノ酸に変異させた多重変異体 ppR による解析から、ppR のプロトン化シッフ塩基 (PSB) 周辺が、BR とは若干異なることが示唆された [1,2]。このような違いは発色団周辺のアミノ酸の違いよりも遠距離相互作用により決定されていると考えられる。昨年の年会において我々は、BR と ppR の様々なキメラ蛋白質を作製し、ヘリックス D と E の相互作用が BR と ppR の吸収波長制御に重要であると報告した [3]。

そこで今回、ヘリックス D と E のアミノ酸残基から吸収波長制御に重要な部位を同定するためにセミランダム変異導入法を適応した。20 個のクローンの変異蛋白質の発現チェックを行った結果、13 個のクローンがコントロールに比べレチナール蛋白質を発現していると思われる呈色を示したことから、これらのクローンは変異蛋白質を発現していると考えられる。またこれらのクローンから変異蛋白質を精製し、吸収スペクトルを測定した結果、2 個のクローンから長波長シフトした変異蛋白質を得た。現在、検体数を増やした解析を試みていると共に、高効率なスクリーニング系の開発を行っている。本発表では、長波長シフトした変異蛋白質のアミノ酸配列をもとに吸収波長制御部位及び相互作用様式について議論する予定である。

[1] Shimono, K. et al. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, 1515, 92. [2] Shimono, K. et al. (2002) *Biochemistry*, 41, 6504. [3] Shimono, K. et al. (2003) *J. Biol. Chem.*, in press

K.Shimono, Y.Sudo, M.Iwamoto and N.Kamo : Assignment of Color Determining Residues Causing the Difference among Archaeal rhodopsins by Semi-Random Mutagenesis Approach

B672

赤外分光法によるファラオニスフォボロドプシンの光反応サイクルにおける構造変化の解析

○古谷 祐詞^{1,2,3}、岩本 真幸^{4,5}、下野 和実⁴、和田 昭盛⁶、伊藤 允好⁶、加茂 直樹⁴、神取 秀樹^{1,3} (¹ 名工大・院工、² 京大・院理、³ CREST・JST、⁴ 北大・院薬、⁵ 北大・先端研 (CAST)、⁶ 神戸薬大)

古細菌の負の走光性にはたらく光センサータンパク質であるファラオニスフォボロドプシン (ppR) が光を吸収すると、その構造を変化させて伝達タンパク質を活性化する。ppR における光情報伝達機構を明らかにするためには、ppR の光反応中間体においてどのような構造変化が生じているのかを詳細に検討する必要がある。我々はこれまでに ppR の発色団であるレチナールが光異性化した直後の K 中間体¹⁻⁴、レチナールシッフ塩基が脱プロトン化した M 中間体^{5,6}を、それぞれ 77K、250K で安定化させ、その構造変化を低温赤外分光法により明らかにしてきた。

光反応サイクルの最後の中間体である O 中間体は M 中間体と同程度の寿命を持つため、伝達タンパク質への情報伝達において何らかの役割を果たしているのではないかと考えられているが、その構造についての情報は限られている。我々は低温赤外分光法と低温可視分光法を駆使することにより、260K で測定した M および O 中間体の情報が混ざっている赤外差スペクトルから純粋な O と ppR との差スペクトルを得た。また、同位体標識レチナールで再構成した ppR 試料を用いることにより O 中間体におけるレチナール構造も明らかにした。講演ではこれまでに得た K、M 中間体の情報と併せて ppR の光反応サイクルにおけるタンパク質の構造変化について議論したい。

1. Kandori et al, 2001, *Biochemistry*, 40, 9238-9246. 2. Kandori et al, 2002, *Biochemistry*, 41, 4554-4559. 3. Furutani et al, 2003, *Biochemistry*, 42, 4837-4842. 4. Shimono et al, *Biochemistry*, in press. 5. Furutani et al, 2002, *Biophys. J.*, 83, 3482-3489. 6. Iwamoto et al, 2003, *Biochemistry*, 42, 2790-2796.

Y. Furutani, M. Iwamoto, K. Shimono, A. Wada, M. Ito, N. Kamo and H. Kandori : Structural changes during the photocycle of *pharaonis* phoborhodopsin studied by infrared spectroscopy