B673

ファラオニスフォボロドプシンにおける
 Schiff塩基の振動モードの解析下野 和実¹、古谷 祐詞^{2,3,4}、加茂 直樹¹、○神取 秀樹^{2,4} (¹ 北大・院薬、² 名工大、³ 京大・院理、⁴ CREST/JST)

古細菌の負の走光性センサーであるファラオニスフォボロドプシン (ppR) は光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (BR) と同じファミリーに属する。よく似た構造をもちながら吸収波長や機能が異なっており¹、我々は赤外分光を用いた比較解析により²⁻⁸、両者の共通性や特異性を原子レベルで明らかにしたいと考えている。

色の問題、さらには異性化・プロトン移動反応の問題を取り扱う場合に鍵となるのが、発色団レチナルの proton 化 Schiff 塩基部位である。今回我々は Schiff 塩基の振動モードを同定するため、Lys 側鎖を ¹⁵N で標識した ppR 試料を作製し、K 中間体の赤外差スペクトルを 77 K で測定した⁹。その結果、重水置換試料における N-D 伸縮振動は BR のものより低波数に現れ、ppR では強い水素結合環境にあることが明らかとなった。BR と違って ppR では N-D 伸縮が水分子の O-D 伸縮と異なる振動数領域に現れたが、これは両者の Schiff 塩基領域におけるペンタゴンクラスター構造の相違を反映した結果であると考えられる。このような水素結合構造の違いが異なる吸収波長に関わるのであろう。それに対し、異性化反応後の K 中間体においては、Schiff 塩基の N-D 伸縮も Schiff 塩基近傍にあるスレオニンの O-D 伸縮も BR と ppR で同じ振動数領域に現れ、両者が同様の異性化反応機構をもつことがわかった。

¹ 神取秀樹、加茂直樹 (2002) 蛋白質核酸酵素 47, 620. ²Kandori et al. (2001) Biochemistry 40, 9238. ³Kandori et al. (2001) Biochemistry 40, 15693. ⁴Kandori et al. (2002) Biochemistry 41, 4554. ⁵ Shimono et al. (2002) Biochemistry 41, 6504. ⁶Furutani et al. (2002) Biophys. J. 83, 3482. ⁷Iwamoto et al. (2003) Biochemistry 42, 2790. ⁸Furutani et al. (2003) Biochemistry 42, 4837. ⁹Shimono et al. (2003) Biochemistry 42, in press.

K. Shimono, Y. Furutani, N. Kamo and H. Kandori : Vibrational modes of the protonated Schiff base in *pharaonis* phoborhodopsin

B675

ファラオニスフォボロドプシンのフォトサイクルにおよぼす Trp171 の影響

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

光センサー型レチナル蛋白質、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) と類似のフォトサイクルを持ち、さらに ppR も bR 同様プロトンを輸送することから、基底状態の構造のみならずフォトサイクル中の構造変化も bR と類似していることが予想される。bR は M または N 中間体において F ヘリックスの細胞質側の蛋白質側への動きが起こることが知られている。この構造変化が ppR でも起こることは実験により示されており、またこの変化がシグナル伝達に必要であると考えられている。

bR の初期中間体である K 中間体において、レチナルの異性化に伴いレチナルの 13 位のメチル基が F ヘリックスに存在する 182 番目のトリプトファン残基 (W182^{bR}) のインドール環に近づくことが X 線結晶構造解析から示されている。また、bR の M 中間体の X 線結晶構造では、W182^{bR} の構造が変化している。これらのことから、K 中間体に見られるレチナルの 13 位のメチル基と W182^{bR} の側鎖との立体的な衝突が、後期中間体である M または N 中間体における F ヘリックス細胞質側の大きな構造変化を引き起こすのではないかと考えられている。

このトリプトファン残基は ppR においても保存されており (W171)、bR と ppR で機能は違うものの、両者に共通しており、かつ機能発現に重要と考えられている構造変化に関与していると思われる。そこで我々は、この W171 に変異の導入は、ppR のフォトサイクルに影響を与えるのではないかと考えた。その結果 W171A 変異体ではフォトサイクルが野生型に比べ、大きく変化していることを観測することに成功した。現在、アラニン以外の変異体を作成中でありこれらの結果もふまえ、年会では W171 のフォトサイクル中の構造または構造変化における役割について議論したい。

H. Yoshida, Y. Sudo, M. Iwamoto, K. Shimono, N. Kamo : Effect of W171 mutation on photocycle of *pharaonis* phoborhodopsin

B674

固体高分解能 NMR によるフォボロドプシン-トランスデューサーの構造解析

○山口 悟¹、下野 和実²、須藤 雄気²、辻 暁¹、加茂 直樹²、斎藤 肇¹ (¹ 姫路工大・院理、² 北大・院薬)

古細菌に存在する 4 種類のロドプシントランスデューサーは、光のエネルギーを利用した生命活動の維持装置である。近年、走光性受容体ファラオニスフォボロドプシン (ppR) の結晶構造がトランスデューサー (pHtrII) 結合状態で報告されたが、ppR の構造はバクテリオロドプシンとよく似た構造をしていた。一方、光情報伝達を行う部分であると考えられる pHtrII の脂質二重膜外部についてはその構造が明らかになっておらず、機能を解明するにはいたらなかった。本研究では固体高分解能 NMR によって pHtrII の脂質二重膜外部の構造、ダイナミクスの研究を行った。アミノ酸残基 159 番目までの pHtrII を大腸菌を用いて大量発現をおこない、[3-¹³C]Ala および [1-¹³C]Val 標識をおこなった。得られた pHtrII(1-159) を脂質二重膜へ再構成を行い、固体 NMR 測定を行い、局所構造を反映した NMR 信号を得た。pHtrII(1-159) 単体の時、[3-¹³C]Ala の信号は CP-MNASC、DD-MAS 共に α -helix 領域及び α -helix 領域にのみ信号が観測されたが β -シート、ループやランダムコイル領域に信号は観測されなかった。さらに ppR と複合体を作ることによって DD-MAS スペクトルでは α -helix 領域の信号強度の増大が観測された。この変化は CP-MAS スペクトルでは観測されなかった。このことは複合体形成により交差分極が効果的でない部分、つまり脂質二重膜外部に揺らぎの大きなヘリックス構造があることを示している。これらの変化は ppR が受け取った光情報が pHtrII のダイナミクスの変化をととして伝達されることを示唆している。

S.Yamaguchi, K.Shimono, Y.Sudo, S.Tuzi, N.Kamo and H.Saito : Conformation and Dynamics of Cytoplasmic Domain of Truncated pharaonis Transducer, pHtr II (1-159) as Revealed by Solid-state NMR

B676

光受容蛋白質ファラオニスフォボロドプシン F86D、E 変異体の分子内プロトン移動解析

岩本 真幸^{1,2}、古谷 祐詞^{3,4,5}、○加茂 直樹²、神取 秀樹^{3,5} (¹ 北大・先端研 (CAST)、² 北大・院薬・生物物理、³ 名工大・工・応用化学、⁴ 京大・院理・生物物理、⁵ CREST・JST)

ファラオニスフォボロドプシン (ppR) は光センサーとして機能する古細菌型レチナル蛋白質であるが、共役する伝達蛋白質が存在しないと光サイクル中に H⁺ 輸送活性を示す。また、Phe86 を Asp に置換した F86D 変異体では H⁺ 輸送活性が上昇する。ppR の Phe86 は、光駆動 H⁺ ポンプ、バクテリオロドプシン (BR) の H⁺ 輸送に重要な Asp96 に一次構造上対応することから、導入した Asp が分子内 H⁺ 移動を促進する役割を果たしていると考えられる。本研究ではフーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法と SnO₂ 電極を用いた pH 変化測定から、F86D、E 変異体 ppR の分子内 H⁺ 移動過程を解析した¹。基底状態、K、M 中間体の FTIR スペクトルは変異体と野生型とで良く一致し、蛋白質構造や構造変化は類似していることがわかった。また Asp、Glu86 は基底状態では H⁺ 化し、BR の Asp96 同様、非常に高い pKa を持つことが明らかになった。そしてこれらの pKa は光サイクル中に低下し、13-cis 型発色団の再 H⁺ 化と同時に Asp、Glu86 の解離の信号が観測された。予想通り光サイクル中に Asp、Glu86 から発色団への分子内 H⁺ 移動が起こっていたのである。ところが、pH 変化の測定では導入したカルボン酸から蛋白外部への H⁺ 放出も同時に観測された。すなわち ppR の変異体では、86 位のカルボン酸から発色団と蛋白外部の両方向へ H⁺ が移動したのであり、BR のような Asp96 から発色団へ方向性をもった H⁺ 移動には、そのための制御機構が必要であると考えられる。ppR が N 中間体の構造をもたない事実² と併せ、機能が異なる古細菌型レチナル蛋白質間での蛋白質構造変化の相違点を議論したい。

¹Iwamoto et al. (2003) Biochemistry 42, 2790. ²Furutani et al. (2002) Biophys. J. 83, 3482.

M. Iwamoto, Y. Furutani, N. Kamo, and H. Kandori : Proton transfer reactions in the F86D and F86E mutants of *pharaonis* phoborhodopsin