B677

光受容蛋白質ファラオニスフォボロドプシンの光反応サイクル制御機構

○岩本 真幸^{1,2}、須藤 雄気²、下野 和実²、荒磯 恒久¹、加茂直樹² (¹北大・先端研 (CAST)、²北大・院薬・生物物理)

古細菌型レチナル蛋白質は、光駆動イオンポンプ型と光センサー型とに大きく分類される。アミノ酸配列や立体構造の相溶性が高いこれらの蛋白質が全く異なる機能を発現することは、構造機能相関の面で大変興味深い事実であり、わずかなアミノ酸残基の違いで各機能が最適に発現されるように制御されていると考えられる。我々はこれまで、古細菌型レチナル蛋白質が機能発現時に示す光反応サイクルの速度がイオンポンプとセンサーとで大きく異なる点に着目し、センサー型のファラオニスフォボロドプシンを用い、その制御機構について解析してきた。イオンポンプ型の光反応サイクルは数十ミリ秒で完結するのに対し、センサー型は数秒以上を要する。これは、単位時間当たりのポンプ効率を上げるためには速いサイクルが必要であるし、一方ではシグナル伝達のための中間体構造を維持するためと考えられている。このような速度の違いは、光反応サイクル後期に出現するMやO中間体の寿命の違いに由来する。このうちM中間体の崩壊過程については、イオンポンプ型に共通して存在する分子内の特定のアスパラギン酸がセンサー型では保存されていないために発色団のプロトン化が遅れ、センサー型のM中間体の寿命を長くしていることを以前明らかにした^{1,2)}。

今回は特にO中間体の崩壊過程について検討を行った。その結果、M中間体崩壊過程と同様、O中間体の崩壊過程においても分子内プロトン移動速度の違いがイオンポンプ型とセンサー型の違いを生じる原因となっている可能性が示唆された。これまでの結果と併せ、古細菌型レチナル蛋白質の光反応サイクル制御機構について議論したい。

1) Iwamoto et al. (1999) *Biophys. Chem.* 79, 187

2) Iwamoto et al. (2003) *Biochemistry* 42, 2790

M. Iwamoto, Y. Sudo, K. Shimono, T. Arais, and N. Kamo : Molecular mechanism for regulation of the photocycle of *pharaonis* phoborhodopsin

B679

イエロープロテインL中間体には2つのコンフォメーションが存在する—共鳴ラマン分光法による解析

○海野 雅司¹、熊内 雅人²、濱田 格雄³、徳永 史生²、山内清語¹ (¹東北大・多元研、²阪大・院理、³CREST・JST)

【序論】Photoactive Yellow Protein (PYP) は紅色光合成細菌中に含まれ、この細菌が示す負の走光性の光受容タンパク質だと考えられている。発色団はシステイン残基にチオールエステル結合を介して結合した4-ヒドロキシけい皮酸で、暗状態ではC=C二重結合部位がトランス構造でフェノール部分が脱プロトン化している。この暗状態PYPに可視光を照射すると複数の反応中間体を経る光反応サイクルを示し、我々は共鳴ラマン分光法を用いて各中間体における活性部位の構造解析を行ってきた[1-3]。本研究では吸収極大が465nm付近のL中間体の活性部位構造を解析した結果について報告する。

【実験】共鳴ラマンスペクトルはKrレーザーの413nm光を用いて測定した。レーザー光強度を変えた実験から暗状態のみの状態や暗状態とL中間体が共存した状態で測定を行い、差スペクトルを計算することでL中間体の共鳴ラマンスペクトルを得た。

【結果と考察】L中間体の共鳴ラマンスペクトルに対するpH依存性を検討したところ、顕著なスペクトル変化が観測された。pH9.0では発色団カルボニル部位のC=O伸縮振動モード ν_{11} とC=C伸縮振動モード ν_{13} はそれぞれ1672と1553 cm^{-1} に観測されたが、pHを下げるとそれぞれ1655と1575 cm^{-1} 付近にもラマンバンドが現れた。発色団の一部を同位体ラベルした試料の測定なども行った結果、L中間体には2つのコンフォメーションが存在し、その割合がpHによって変化することが明らかになった。当日はアミノ酸置換の効果や光反応サイクルのメカニズムとの関連についても議論する予定である。

[1] Unno et al. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, 4233. [2] Unno et al. (2002) *Biochemistry* 41, 5668. [3] Unno et al. (2003) *J. Phys. Chem. B* 107, 2837.

M.Unno, M. Kumauchi, N. Hamada, F. Tokunaga, and S. Yamauchi : Resonance Raman Evidence for Two Conformations in L Intermediate of Photoactive Yellow Protein

B678

特定残基のプロトンの解離・結合で制御されるPYP_Mの構造状態の変化

○清水 伸隆^{1,2}、上久保 裕生¹、山崎 洋一¹、今元 泰¹、片岡 幹雄¹ (¹奈良先端大・物質、²Spring-8/JASRI)

PYPの生理活性状態とされるM中間体の崩壊速度定数は顕著なpH依存性を示し、pH8付近では酸性条件下に比べ数10倍程度増加する事が知られている。この時定数のpH依存性から算出される見かけの pK_a は約6.4であり(Genick *et al.* (1997) *Biochemistry* 36, 8-14)、M中間体の崩壊速度に影響を与える解離性アミノ酸残基の存在が示唆されてきた。そこで本報告では、M中間体の吸収スペクトル及び構造のpH依存的な変化を測定し、pHがM中間体に与える影響を検証した。pH4から8.5の間でM中間体の絶対吸収スペクトルを測定した結果、pHの上昇に伴い吸収極大波長が12nm短波長シフトし、335nm付近に顕著なショルダーが観測された。このスペクトル変化は明確な等吸収点を示す事から2状態遷移であると考えられる。また、その変化の pK_a は6.4であり、速度定数の変化から求められた値と一致していた。次に、この2つのM中間体の構造を比較する為、各pHで遠紫外CDスペクトルとX線溶液散乱曲線を測定した。その結果、いずれのpHでもM中間体生成に伴う2次構造と全体構造の変化が観測されたが、pHの上昇に伴いその変化量は増大する事が示された。また、この構造変化量を元に算出した pK_a は分光学的に求めた値(6.4)と一致していた。従って、2つのM中間体は、解離性アミノ酸残基(X)のプロトン化状態が異なっており、両者は平衡関係にあると示唆される。プロトン化状態が吸収スペクトルの変化として観測される為、残基Xは発色団近傍に存在すると考えられ、発色団と水素結合しPYPの色制御に関与するE46であると予測した。この残基Xが解離している条件下でM中間体の構造がより大きく変化する事が示されたが、残基XをE46とすれば、E46の解離に伴う蛋白質内部の静電的不安定化によって構造変化が誘発される(Xie *et al.* (2001) *Biochemistry* 40, 1510-1517)というこれまでの予測と矛盾しない。

N. Shimizu, H. Kamikubo, Y. Yamazaki, Y. Imamoto, M. Kataoka : Structural Change of PYP_M Depending on the Protonation/Deprotonation of the Specific Residue.

B680

Photoactive Yellow Proteinにおけるグリシン29の役割

○龍見 さなえ、山崎 洋一、上久保 裕生、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

Photoactive Yellow Protein(PYP)は、*Ectothiorhodospira halophila*に存在する光受容蛋白質で、*E. halophila*の負の走光性に関与すると考えられている。われわれは、PYPにおけるグリシンの役割を調べるため、それらの置換変異体を作製し、置換による効果が光反応や発色団に与える影響を比較している。

今回の発表では、他のアミノ酸残基でも許容される二面角をもつにもかかわらず、すべてのPYP類似蛋白質間で保存されており、光反応、発色団に大きな影響をもつ29番目のグリシンに注目した(龍見ら、2002年度年会)。

G29のアラニン置換変異体(G29A)は、吸収極大波長が443nmに短波長シフト(野生型は446nm)し、360nmに吸収極大をもつ退色成分が共存していた。0M NaCl(pH7)では黄色成分の割合が22%であったが、1M NaClでは34%に増加した。また、5℃から50℃へ加熱すると、黄色成分は42%から5%に減少した。さらに、pH5では黄色成分は13%だったが、pH8では36%に増加した。M中間体の寿命は野生型の約1500倍であった。以上のことから、G29を置換することで、PYPの暗状態の構造が不安定になることが示された。G29のセリン置換変異体(G29S)では、生理的条件下で退色成分が95%を占めていた。また、M中間体の寿命が野生型の約20000倍になり、セリン置換の方が安定性に対する影響が大きかった。

29位のアミノ酸側鎖が入る位置にはE46のカルボキシル基があり、29位の α 炭素とE46の ϵ 炭素の距離は3.32 Åと小さい。このため、G29へ側鎖を付加する変異が、E46を通して発色団に影響を及ぼしていると考えられた。G29周辺のキャビティーの変化が発色団にどのような影響を与えるのか考察したい。

S.Tatsumi, Y.Yamazaki, H.Kamikubo, Y.Imamoto, M.Kataoka : The Role of Glycine 29 in Photoactive Yellow Protein