1P269

ハロロドプシンのアルギニンとクロライド相互作用と吸収波長制御

○久保 恵美¹、相沢 智康¹、加茂 直樹²、新田 勝利¹、河野 敬一¹、出村 誠¹ (¹ 北大院・理、² 北大院・薬)

ハロロドプシン(hR)は、光駆動型クロライドポンプとして機能する。高度好塩菌 *H. salinarum* 由来ハロロドプシン(shR)の立体構造は2000年に明らかになっており、構造と機能の両面からの研究が可能な数少ない膜タンパク質の1つである。hRは、分子内に発色団としてレチナールを保持し、その近傍に1個アニオンを結合できる部位が存在する。現在までに、その発色団周辺の電荷分布がこれらのレチナールタンパク質の吸収波長を決定していると考えられている。高度好塩好アルカリ性菌 *N. pharaonis* 由来ハロロドプシン(phR)は、暗所下、pH 7の基底状態でクロライド滴定実験を行うと、その最大吸収波長(λ_{max})は600 nmから578 nmへと短波長シフトする。一方pH 2で同様の実験を行うと、逆に長波長シフトすることがわかった。phRと一次配列の相同性が66%のshRは、中性でのクロライド滴定で長波長シフトすることが報告されていることから、酸性でのphRはshRと類似した発色団近傍環境に変化したことが推測された。レチナールに近接し、アニオン結合部位を含む水素結合ネットワークをとともに形成すると予想されるphR-Arg123の変異体実験(R123K, R123H)から、この残基が吸収波長の決定に寄与している可能性が示唆された(Sato et al., 2005)。Arg123は古細菌ロドプシン4つ全てに保存されているため、その機能だけではなくその吸収波長制御にも重要であると考えられる(shR:R108, バクテリオロドプシン:R82, ファラオニスフォロドプシン:R72)。本年度では、主にR123とphRさらに古細菌ロドプシンの吸収波長制御の関係について報告する予定である。

M. Kubo, T. Aizawa, N. Kamo, K. Nitta, K. Kawano and M. Demura : Control of absorption maximum and interaction between arginine and chloride ion in halorhodopsin

1P271

ハロロドプシンCP側チャネル変異体K215Rの光中間体への寄与

○斉藤 裕子¹、久保 恵美¹、佐藤 真希¹、菊川 峰志²、相沢 智康¹、加茂 直樹³、新田 勝利¹、河野 敬一¹、出村 誠¹ (¹ 北大院理、² 北大創成研、³ 北大院薬)

ハロロドプシン(hR)の光駆動クロライドポンプの分子機構の解明には、バクテリオロドプシン(bR)との立体構造とイオン輸送の比較が有用である。本研究では、大腸菌発現可能かつ安定な *N. pharaonis* 由来hR(phR)を用いて、hRのクロライドイオンポンプ機能とアニオンチャネル構造の関係を解明することを目的とし、今回は、我々のphR変異体の知見を基に、細胞質(CP)側チャネルに着目した変異体実験を行った。*H. salinarum* 由来hR(shR)に関して、Cl⁻結合や輸送に重要と考えられているCP側チャネル形成残基としてFヘリックスのArgが挙げられている。shRの結晶構造では、このArgは3残基手前のAsp側鎖とイオン対を形成している。これら2残基の相互作用がCP側へのCl⁻放出に関わっていると予想される。そこで、このArg, Aspとの相同部位であるphR-K215R, N212D, K215R/N212D変異体を作成し、Cl⁻結合や輸送に及ぼす効果について調べた。K215R, K215R/N212D変異体では可視吸収、CDスペクトルのどちらにも主ピークの他に副ピークが400nm付近に現れ、シッフ塩基の脱プロトン化に関与していると考えられる。このKdは野生型よりわずかに高く、シッフ塩基のpKaはCl⁻の有無に拘らず野生型より低かった。Flashphotolysis実験から、K215R, K215R/N212Dでは中間体L1, L2を同定できたが、L2中間体の崩壊速度の異常な遅さから、shR同様にO中間体が蓄積されなかった。すべての実験において、Asn212変異はイオンポンプ活性に直接関与しなかった。一方、Lys215部位はlong rangeでシッフ塩基と連結するネットワークがあること、さらにシッフ塩基のpKaがO中間体の蓄積に関連していることが示唆された。

Y Saito, M Kubo, M Sato, T Kikukawa, T Aizawa, N Kamo, K Nitta, K Kawano, M Demura : Effects of CP-channel mutant halorhodopsin, K215R on photo-intermediates.

1P270

トランスジューサタンパクがハロロドプシンの光化学反応に及ぼす影響

○長谷川 千紗¹、須藤 雄気^{1,2}、下野 和実^{1,3}、宮内 正二¹、出村 誠⁴、加茂 直樹¹ (¹ 北大院・薬・生物物理、² 名工大院・工、³ 理研 GSC、⁴ 北大院・理・生物科学)

ファラオニスフォロドプシン(ppR)は、*Natronobacterium pharaonis*の負の走光性のレセプターである。ppRは膜内でトランスジューサタンパクpHtrIIと膜内で強く相互作用しており、その結合にはTyr199^{ppR}とAsn74^{pHtrII}、Thr189^{ppR}とGlu43^{pHtrII}、Ser62^{pHtrII}との水素結合が重要である。ところで*N. pharaonis*には、光駆動Cl⁻ポンプであるファラオニスハロロドプシン(phR)が存在する。ppRとphRは互いに類似した構造を持っているにも拘らず、phRはTyr199^{ppR}がPheに、Thr189^{ppR}がProになっており、pHtrIIと水素結合を形成せず、結合しない。昨年の学会において、この2ヶ所に変異を入れたphR-P240T/F250YがpHtrIIと結合能を持つことを報告した。ppRはpHtrIIと結合するとその光化学反応が変化する。また、ppRは単体ではプロトンポンプ活性があるが、pHtrIIと結合するとその活性が失われる。このようにpHtrIIはppRの性質に様々な影響を及ぼすが、phR-P240T/F250Yにも影響を及ぼすのであろうか。今回我々は、pHtrIIがphR-P240T/F250Yの性質に及ぼす影響について、特にphRの光化学反応や、Cl⁻ポンプ活性に及ぼす影響に焦点をあて、解析を試みた。Cl⁻ポンプ活性に及ぼす影響については、oocyteにphR-P240T/F250YおよびpHtrIIを発現させ、光照射時の膜電流を測定する事でCl⁻ポンプ活性の変化を調べた。本発表においてはこれらの結果について述べる。

C.Hasegawa, Y.sudo, K.Shimono, M.Demura, S.Miyauchi and N.Kamo : Effects of transducer binding on pharaonis halorhodopsin

1P272

プロトンポンプ活性をもった真核生物ロドプシン *Leptosphaeria Rhodopsin* の構造解析

○住井 昌代¹、古谷 祐詞^{1,2}、Waschuk Stephen³、Brown Leonid S.³、神取 秀樹^{1,2} (¹ 名工大院工、² CREST/JST、³ グエルフ大・カナダ)

近年のゲノム解析の進展によって、古細菌だけでなく真核生物においても様々な古細菌型ロドプシンが発見されているが、これまでプロトンポンプ活性を示すものは存在しなかった。アカパンカビから見つかったNR(*Neurospora rhodopsin*)にもプロトンポンプ活性はなく、光センサーとして機能していると考えられている。一方、今回報告するLR(*Leptosphaeria rhodopsin*)は真核生物で初めて光駆動プロトンポンプ活性の確認された古細菌型ロドプシンである¹。

LRのアミノ酸配列は、高度好塩菌に存在する光駆動プロトンポンプBR(bacteriorhodopsin)と26%の一致度しかないのに対し、プロトンポンプ活性のないNRとは56%の一致度を有する。従って、プロトンポンプ機能とアミノ酸配列の一致度に相関性はないことが示唆される。本研究では、低温赤外分光法による詳細な光誘起構造変化解析によって、プロトンポンプ活性に重要な構造的要因を明らかにしようと試みた。その結果、LRは初期中間体においてNRよりもむしろBRと似た構造変化をしていることがわかった^{2,3}。例えば、LRはBRと同様にレチナールの構造変化がシッフ塩基周辺に限られており、NRとは異なり α -ヘリックスの変化が現れた。さらに、LRにはBRと同様、強い水素結合を形成した水分子のO-D伸縮振動が観測された。以上の結果から、特に水分子の水素結合変化に注目してLRの構造と機能について議論したい。

1. Waschuk et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6879.
2. Furutani et al. (2004) *Biochemistry* 43, 9636.
3. Sumii et al. submitted.

M.Sumii, Y.Furutani, S.Waschuk, L.S.Brown and H.Kandori : Structural analysis of *Leptosphaeria rhodopsin*, bacteriorhodopsin-like proton pump protein from a eucaryote