

(京大院理) ○井上圭一・西奥義憲・寺嶋正秀
 (阪大院理) 森崎雅世・佐々木純・徳永史生

【序】古細菌はその細胞膜中に様々な光受容タンパク質を持ち、それを利用して光のエネルギーをイオンポンピングや走光性の発現などの生体活動に役立てている。そのような光受容タンパク質の一つである Sensoryrhodopsin II (SRII)は光を受け取ると、古細菌の負の走光性をもたらす一連の細胞内シグナル伝達を開始させる信号を相手方の膜タンパク質である Transducer タンパク (HtrII)に送る。SRII と HtrII の間に行われるタンパク間情報伝達の機構を詳細に調べることは、生物の細胞内シグナル伝達に対して重要な知見を与えるとして期待されている。光励起された SRII では発色団の *all-trans* レチナールが *13-cis* レチナールに異性化した後、レチナールとタンパク質を架橋しているシッフ塩基からプロトンが放出される。このプロトンは SRII のアミノ酸残基の間で受け渡され、それに伴いタンパク質の構造が変化する。光入射後の SRII はこれら構造の異なる中間体を経て元の基底状態に戻り、フォトサイクルを形成する。この構造変化を介して SRII は HtrII と相互作用すると考えられており、その機構を調べるにはフォトサイクルの解明が必須である。しかし、このダイナミクスは非常に複雑で、決定的なモデルは提唱されていない。そこで本研究では過渡吸収 (TA) と過渡回折格子 (TG) 法を用いることでフォトサイクルの解明を試みた。

【方法】本研究では *Natronobacterium pharaonis* から得た SRII (pSRII)を界面活性剤 Dodecyl Maltoside に可溶化させたものと、pSRII にペプチドリンカーを介して同じ細菌から得た HtrII の生体膜部分に当たる C 末端側の 159 残基分を結合させた pSRII- Δ pHtrII を同様に可溶化させたものの2種類をサンプルとして用いた。両サンプルともタンパク質濃度は $200\mu\text{M}$ とした。pSRII のフォトサイクルを調べるため、TA 法と TG 法の二つの異なる分光法を用いたが、前者は主に発色団周りのダイナミクスを調べることを目的としており、後者は pSRII 全体の構造変化や pHtrII の変化を検出し、

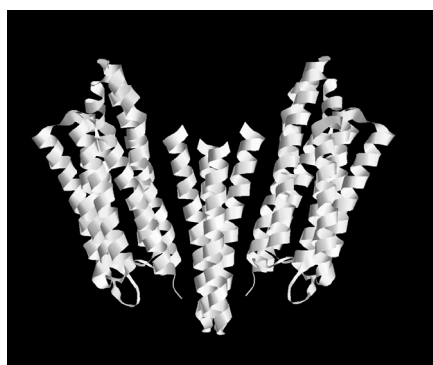


図1 pSRII- Δ pHtrII 複合体構造

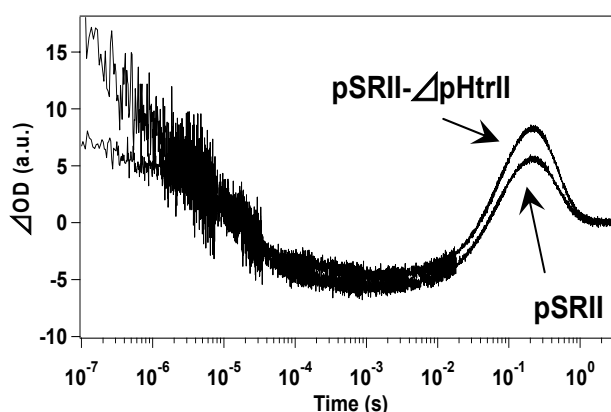


図2 pSRII 及び pSRII- Δ pHtrII の TA 信号

更にタンパク質の構造変化に伴う体積変化やエンタルピー変化を測定するために用いた。両測定とも励起光として Xe-Cl Excimer レーザー励起の色素レーザーによる 465nm の光を用いており、光強度は $<1 \mu\text{J}$ 程度とした。また probe 光として TA 測定には 543.5nm の He-Ne レーザーを、TG 測定には 780nm のダイオードレーザーを用いた。この probe 波長では TG 信号には分子の屈折率変化のみが寄与する。

【結果と考察】図 2 に pSRII 及び pSRII- Δ pHtrII の TA 測定の結果を、図 3 に TG 測定の結果を示す。TA 信号の時間変化は、両サンプルとも 7 つの指数関数の和で表された。また、TG 信号の時間変化は、pSRII は 7 つの pSRII- Δ pHtrII は 8 つの指数関数の和で信号を再現することが出来た。両サンプルともこのうち一成分は励起された分子から放出された熱の拡散過程に対応しており、残りの成分がタンパク質の変化過程に対応するものである。両測定によって得られた成分の帰属と各々の成分の寿命を表 1 に示す。

TA、TG 各測定で N₂O 中間体の生成の段階までは良い一致を示しており、また両サンプル間で大きなダイナミクスの違いは出なかった。しかし TG 測定の結果から N₂O 中間体から pSRII の基底状態への戻り反応において両サンプル間で減衰成分の振幅が大きく異なり、pSRII- Δ pHtrII ではある程度の振幅があるのに対し pSRII では検出できないほど小さくなるという違いが見られた。これにより pSRII と pHtrII の相互作用はこの過程において強く現れていると考えられる。pSRII において基底状態への戻り反応過程において振幅が極端に小さくなった理由として、TG 信号に関わる要因のうち分子の体積変化による寄与と分子の吸収スペクトルが変化することによる寄与が互いに打ち消しあい、偶発的にこの成分の振幅がゼロに近くなったことが考えられる。プローブ光の波長を変化させると、これらの寄与の度合いが変化し打ち消し合いがなくなるため、この成分が現れてくることが期待されたので、より長波長の probe 光として 1064nm のダイオードレーザーを用いた測定を試みた。この測定に際し、より検出感度の高い Heterodyne TG 法を用いたが、このプローブ光波長でも pSRII の基底状態への戻り過程は検出することが出来ず、更なる長波長化を試みる必要があることが分かった。pSRII および pSRII- Δ pHtrII のダイナミクスを熱力学的な側面から解明するため、現在 TG 法を用いて反応に伴うタンパク質のエンタルピー変化や体積変化の測定を行っており、討論会で報告する。

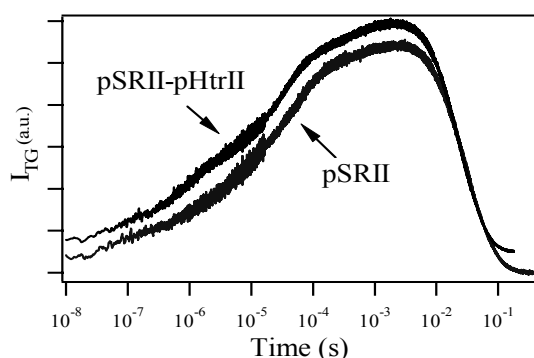


図 3 pSRII 及び pSRII- Δ pHtrII の TG 信号

成分	TA		TG	
	pSRII	pSRII- Δ pHtrII	pSRII	pSRII- Δ pHtrII
K $\rightarrow$ L	680ns	700ns	640ns	740ns
L $\rightarrow$ L ₂ M	11 μ s	14 μ s	11 μ s	11 μ s
L ₂ M $\rightarrow$ M	25 μ s	20 μ s	25 μ s	20 μ s
	460 μ s	350 μ s	420 μ s	380 μ s
M $\rightarrow$ M'	12ms	12ms	8.5ms	7.1ms
M' $\rightarrow$ N ₂ O	130ms	100ms	130ms	92ms
N ₂ O $\rightarrow$ 基底状態	240ms	270ms		250ms

表 1 TA 及び TG 信号の各成分の寿命