

博士学位論文

高度好塩古細菌の走光性センサー・トランスデューサー間の
シグナル伝達分子機構解明に向けた新たな視点の構築

A New Perspective on the Molecular Mechanism of Signal Transduction
between Phototaxis Sensor and Transducer Proteins
in Highly Halophilic Archaea

松山大学大学院 医療薬学研究科

医療薬学専攻 生物物理化学分野

中村（松波） 梨佐

略語表

<u>略語</u>	<u>正式名称</u>
A/D	Analog/Digital
Amp	Ampicillin
BR	Bacteriorhodopsin
CM	Complex medium
CP	Cytoplasmic side
EC	Extracellular side
EPR	Electron paramagnetic resonance
ESR	Electron spin resonance
FDA	Food and Drug Administration
fps	Frames per second
FRET	Förster resonance energy transfer
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GPCR	G protein-coupled receptor
<i>Ha</i>	<i>Haloplanus aerogenes</i>
HAMP	Histidine kinase, Adenylate cyclase, Methyl-accepting chemotaxis protein, Phosphatase
<i>Hh</i>	<i>Halobacterium hubeiense</i>
<i>Hm</i>	<i>Haloarcula marismortui</i>
<i>Hp</i>	<i>Halomicroarcula pellucida</i>
HR	Halorhodopsin
<i>Hs</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
HtrII	Halobacterial transducer II
<i>Hv</i>	<i>Haloarcula vallismortis</i>
ITC	Isothermal titration calorimetry
<i>I-V</i>	Intensity of an electric current - Voltage
λ_{\max}	Absorption maximum wavelength
LB	Luria-Bertani
MCP	Methyl-accepting chemotaxis protein
Mev	Mevinolin
MST	Membrane-embedded steric trigger
n	Number of total light-induced reversing cells
NMR	Nuclear magnetic resonance
<i>Np</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i>
<i>Ns</i>	<i>Natrialba swarupiae</i>
P480	Photoproduct having absorption maximum wavelength at 480 nm
PCR	Polymerase chain reaction

PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylene glycol
<i>ppR</i>	<i>pharaonis</i> phoborhodopsin
pR	Phoborhodopsin
PSB	Protonated Schiff base
RCD	Rate of change of direction
SB	Schiff base
S/N	Signal/Noise
SPD	Swimming speed
SRI	Sensory rhodopsin I
SRII	Sensory rhodopsin II
TM	Transmembrane
WT	Wild type
Y171F ^{HsSRII}	<i>HsSRII</i> mutant in which tyrosine-171 is replaced with phenylalanine (Nomenclature of other mutants: same as above)

目次

略語表

第 1 章 序論	1
1.1 はじめに	1
1.2 高度好塩菌の 4 種のレチナールタンパク質	2
1.3 センソリーロドプシン II (フォボロドプシン)	3
1.4 トランスデューサータンパク質	4
1.5 光センサー・トランスデューサータンパク質複合体	4
1.6 研究背景および目的	6
第 2 章 実験材料および方法	14
2.1 生物材料および培地	14
2.2 プラスミドおよび形質転換	14
2.3 試料の調製	18
2.4 光照射による反転応答の観察とモーション解析	18
2.5 フラッシュフォトリス (閃光光分解) 法とデータの速度論的解析 ...	19
第 3 章 結果および考察	24
3.1 <i>H. salinarum</i> のセンソリーロドプシン II/トランスデューサー間の シグナル伝達における Ser201 ^{HsSRII} および Tyr171 ^{HsSRII} 置換の影響	24
3.1.1 緒言	24
3.1.2 結果	25
3.1.3 考察	29
3.2 <i>Natronomonas pharaonis</i> 由来 SRII-HtrII 間の光応答の情報伝達機構、 その部位特異的変異体による機能解析	38
3.2.1 緒言	38
3.2.2 結果	40
3.2.3 考察	45
第 4 章 研究総括	55
参考文献	57
謝辞	68

第 1 章 序論

1.1	はじめに	1
1.2	高度好塩菌の 4 種のレチナールタンパク質	2
1.3	センサーロドプシン II (フォボロドプシン)	3
1.4	トランスデューサータンパク質	4
1.5	光センサー・トランスデューサータンパク質複合体	4
1.6	研究背景および目的	6

第1章 序論

1.1 はじめに

生物は、外界の環境の変化を常に受けながら適切に対応し、また細胞の働きを調節しながらフレキシブルに、しかし力強く生命活動を維持している。外界の変化は細胞膜に直接作用したり、細胞内への物質の移動によっても伝達されるが、感度よく伝達する経路として細胞膜上に様々な受容体タンパク質を備えている。この膜タンパク質は細胞外からの刺激情報を細胞内に情報伝達し、様々な生理機能を制御する。その代表例である G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) は、ドーパミン、ヒスタミン、セロトニンなどのホルモンや神経伝達物質、また、においや味、光を受容するタンパク質として細胞内にシグナル伝達するセンサーとして知られる。その複雑な働きは、形態形成から生理機能の発現に至る指示系統として、また自律神経など様々な調節の情報伝達系として、生命の成り立ちと維持に重要な役割を果たすことは言うまでもない。受容体の変調は疾患の原因となることも多く、例えば GPCR を標的とする薬はアメリカ食品医薬品局 (FDA) に認可されている薬のおよそ 35% を占めるとされる[1]。GPCR の機能・構造解析、特に受容体から下流エフェクターへの情報伝達の分子機構をいち早く解明することが、我々の健康維持や疾患の治療、そして創薬という意味においても大きな課題の 1 つと言える。

単純に見える微生物にも、GPCR に良く似た感覚レセプターが存在する。その代表例が、古細菌の一種、高度好塩菌がもつセンサーロドプシン[2]である。センサーロドプシンは 2000 年に結晶構造解析が成功したウシ・ロドプシン[3]と同じく、タンパク質内部に発色団レチナールをもつ。ロドプシンが 3 量体 G タンパク質と共役し、セカンドメッセンジャー系を介したシグナル伝達により細胞の様々な機能調節に関与するのに対し、微生物のセンサーロドプシンは、これとは全く形態の異なるトランスデューサータンパク質を伴い、2 成分情報伝達系 (two-component system) [4]を介して主に鞭毛の回転を制御し[5]、特定の波長の光に近づく誘引応答 (正の走光性) や逆に逃げる忌避応答 (負の走光性) を示す[6]。微生物型ロドプシンと動物型ロドプシンには 1 次配列上の相同性はなく、発色団の異性化も光中間体の生成も詳細は異なり、更に情報伝達の共役タンパク質も異なるなど、両者の情報伝達の仕組みについての共通性は特筆されて来なかった[7,8]。しかしセンサータンパク質の高次構造や、共役タンパク質への情報伝達の際に両者とも 7 本の α ヘリックスから形成される膜貫通部位 (Transmembrane, TM) の N 末端側から 6 番目のヘリックス (TM6) が動くなど、情報伝達の構造変化に関してはむしろ類似点も挙がる[9-11]。

筆者は本研究において、微生物の走光性を司るセンサーロドプシンおよびトランスデューサー間のシグナル伝達の分子機構を明らかにしようとした。ここで得られた知見は、微生物の走光性センサー・トランスデューサー間の情報伝達の分子機構の理解だけでなく、ヒト GPCR とその下流エフェクター類へのシグナル伝達の分子機構の理解にも繋がると考えている。研究成果を論じる前に、微生物型ロドプシンの概要と本研究を始めるに至った背景を先ず説明する。

1.2 高度好塩菌の4種のレチナールタンパク質

微生物型ロドプシンの中で最初に発見されたのがバクテリオロドプシン (BR) である。これは塩濃度の高い極限環境で生息する高度好塩菌の一種 *Halobacterium salinarum* (Hs) の紫膜から見出された[12]。まだ膜タンパク質の構造情報が乏しかった頃、Henderson らの電子線回折を利用した解析により7本の α ヘリックスが膜を貫通するという今では一般的に知られていることが BR で初めて明らかにされた[13]。BR に次いで、同じ高度好塩菌から1977年にハロロドプシン (HR) [14-16]、1982年にセンサーロドプシン I (SRI) [17-19]、1985年にセンサーロドプシン II (SRII、またはフォボロドプシン、pR) [20-23]が発見された。BR と HR は光駆動イオンポンプとして機能し、前者は細胞質側から細胞外側にプロトン、後者は細胞外側から細胞質側にクロライドイオンを輸送することにより光エネルギー変換を行う[24]。また SRI と SRII は高等生物と同様の光センサーとして機能し、前者は 570 nm 付近の光に誘因応答する正の走光性と 370 nm 付近の光に忌避応答する負の走光性の2つの機能を併せ持つセンサーとして、一方後者は 500 nm 付近の光に忌避応答する負の走光性センサーとして光情報伝達を行う[25]。これらの微生物型ロドプシンは、7本の膜貫通 α ヘリックス (A-G ヘリックス) から成る共通した高次構造をとると考えられ、N 末端を細胞外に、C 末端を細胞内に向けて存在する。G ヘリックスの中段に保存される Lys 残基の側鎖の窒素原子はレチナールの C15 位とイミンを作って共有結合した、いわゆる Schiff 塩基 (Schiff base、SB) を形成する (図 1-1)。この内包するレチナールが光を吸収すると図 1-1 のように all-trans 型から 13-cis 型に異性化し、吸収波長の異なるいくつかの中間体を経て、再び元の状態に戻るサイクリックな光化学反応、フォトサイクルを示す[8]。一次構造は大きく違いながらも類似の高次構造を有する点や、互いに共通する構造や光化学的性質をもちながら異なる機能を発現するというこれら4種類のレチナールタンパク質の機能・構造相関は、タンパク質科学の観点からも大変興味深い。

1980年代までに発見された4種類のレチナールタンパク質のうち、BR はきわめて安定性が高く[26,27]、大量発現や精製の容易さといった利便性から、光反応過程における構造解析や原子レベルにおけるタンパク質構造ダイナミクスの解明[28-31]など、最も研究の進んだ膜タンパク質の1つとなった。G ヘリックス上の Lys216^{BR} と共有結合する発色団レチナールは、基底状態では SB の窒素原子がプロトン化され、C ヘリックス上にカウンターイオンとして存在する Asp85^{BR} (解離型) と塩橋を形成して安定化している[32]。レチナールが光を吸収して光異性化 (all-trans 型 \rightarrow 13-cis 型) すると、オプシンと異性化レチナールは K 中間体の生成とともに、一気に不安定化する。次にプロトン化 SB (protonated Schiff base、PSB) からカウンターイオンへプロトンが移動した後 (M 中間体)、プロトン輸送経路に存在する複数の解離性アミノ酸残基 (Asp96^{BR}、Lys216^{BR}、Asp85^{BR}、Glu204^{BR} など) を経由したプロトンリレーによって一方向にプロトンが移動する。わずか数十ミリ秒程度で吸収波長の異なる中間体に変化し (BR₅₆₈ \rightarrow J₆₁₀ \rightarrow K₅₉₀ \rightarrow L₅₅₀ \rightarrow M₄₁₂ \rightarrow N₅₃₀ \rightarrow O₆₄₀) [29,33]、元の状態 (13-cis 型 \rightarrow all-trans 型) に戻るまでに1個のプロトンが細胞質側から細胞外側に能動輸送される。この光駆動プロトンポンプとしての BR の知見や解析手法は、本研究で論じる SRII の機能・構造解析においても優れた類例として比較検討の対象となった。

一方、負の光センサータンパク質 SRII は、遺伝子のクローニング[34,35]、好塩菌での発現系の構築[36-38]などが成功し、レチナールとオプシンから成る構成[39]やフォトサイク

ルの同定[40,41]など、BR との類似性が報告された。また、可逆的メチル化を受ける大腸菌の走化性受容体様のトランスデューサーとの共役が生化学的手法で示され[42]、更に、種々のレチナールアナログを用いた *in vivo* での光応答の解析から、M/O 中間体（後述、図 1-3）でセンサーからトランスデューサーにシグナリングされることも推定された[43]。しかしセンサー・トランスデューサーの発現量が少なく、また塩強度や pH の変化に不安定であったため[44]、BR に比べて研究が遅れることとなった。

1.3 センソリーロドプシン II (フォボロドプシン)

HsSRII が発見された翌年の 1986 年に *Hs* と近縁の高度好塩好アルカリ性古細菌 *Natronomonas pharaonis* (*Np*) から良く似た *SRII* (*NpSRII* またはファラオニスフォボロドプシン、*ppR*) が同定され[45]、塩強度や pH の変化に比較的強いことから研究対象として注目された[46-52]。また、1997 年に *NpSRII* の大腸菌での機能発現系が構築され[53]、これにより試料の大量調製や物理化学的測定などが可能となった。こうした試料調製の面での進展も相俟って、2001 年には *NpSRII* の高分解能の X 線結晶構造が報告され[54,55]、その構造は BR と驚くほど似ていることが分かった。報告された構造によると、239 アミノ酸から成る分子量約 26 kDa の *NpSRII* は、BR と同様に A-G の 7 本の α ヘリックスから構成され、細胞外側に N 末端、細胞質側に C 末端を突出して配向する（図 1-2）。基底状態では、G ヘリックス上の Lys 残基に結合したレチナール SB の窒素原子はプロトン化しているが、この PSB のもつ正電荷はカウンターイオン Asp75^{*NpSRII*} と塩橋を形成し安定化している。光励起により G ヘリックス上の Lys205^{*NpSRII*} と結合するレチナールが *all-trans* 型から *13-cis* 型に異性化（K 中間体）すると、図 1-3 のような特有のフォトサイクル（*NpSRII*₄₉₈→K₅₄₀→L₄₈₈→M₃₉₀→O₅₆₀）を示す[46,48,52]。このサイクル反応時、紫外領域に吸収極大波長をもつ M 中間体でレチナールの PSB 部位の脱プロトン化によりカウンターイオン（C ヘリックス上の Asp75^{*NpSRII*}）へプロトンが移動し、O 中間体で *all-trans* 型に戻る際、SB は再びプロトン化して基底状態に戻る[56]。このフォトサイクルの分子機構は BR と良く類似し、単体 *NpSRII* は実際にプロトンポンプ機能をもつ[57,58]。しかし、*NpSRII* は細胞質側からのプロトン供給に関与する BR の Asp96^{BR} に相当する残基をもたないことから、SB の再プロトン化に時間を要する[59]。また、*NpSRII* では図 1-2 に示したように固有のトランスデューサータンパク質と共役して細胞内に情報を伝える[60]。この情報伝達は M/O 中間体時に起こると考えられるが[43]、この時 *SRII* がどう振る舞うのか注目される。単体 *NpSRII* を用いた *in vitro* 解析の結果、電子スピン共鳴法（Electron paramagnetic resonance、EPR または Electron spin resonance、ESR）を用いた解析では M 中間体時に F ヘリックスが C ヘリックスから遠ざかる動きが[61-64]、また Förster 共鳴エネルギー移動法（Förster resonance energy transfer、FRET）[65,66]や化学修飾による構造変化の検出[67]でも、同じく M 中間体時に F ヘリックスが外側に露出する結果が得られている。後期中間体（M/O 中間体）において、*NpSRII* の F ヘリックスが外側に傾くのである。この F ヘリックスの動きは BR でも確認されており[68]、レチナールタンパク質で広く当てはまる構造変化と考えられる。更に、ヒト GPCR のシグナル伝達においても TM6 が動くことから[9-11]、7 回膜貫通型受容体がシグナル伝達する際の共通の過程として、情報伝達の一般的な分子機構がこの動きに含まれる可能性が高い。センサーからトランスデューサーへの情報伝達

過程の本質的な現象として、その分子機構は興味深い。

1.4 トランスデューサータンパク質

SRII と複合体を形成するトランスデューサータンパク質 (Halobacterial transducer II, HtrII) は、大腸菌の走化性シグナルトランスデューサータンパク質 (Methyl-accepting chemotaxis protein, MCP) [69]と相同性をもつ。534 アミノ酸からなる分子量約 60 kDa の *Np*HtrII は、2 回の膜貫通部位 (TM1、TM2) とその下流の HAMP ドメインおよびシグナル産生ドメインから構成される[70,71]。HAMP ドメインは Histidine kinase、Adenylate cyclase、Methyl-accepting chemotaxis protein、Phosphatase の膜貫通部位直下の何れでも見られる保存性の高い特徴的な繰り返し配列で、それぞれのタンパク質機能の調節に重要な部位と考えられている[72]。この部位の構造を固定する変異導入後の試料の核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 解析により、HAMP 部位は Four-helix bundle 状の形態でありながら柔らかい構造であると報告された[70-72]。その下流のシグナル産生ドメインは、断片として発現後に結晶構造解析が成功し、縦に長い Four-helix bundle 構造をとることも明らかになった[70,71]。また、その中段には適応に関与する可逆的メチル化を受ける部位が存在し、先端にはアダプタータンパク質 CheW を介してヒスチジinkinナーゼ CheA を結合する部位が存在することが明らかになった[5]。光刺激後、HtrII は光センサー受容体タンパク質 (SRII) の構造変化を介して光信号を受け取り、細胞質中で自己リン酸化型ヒスチジinkinナーゼ CheA から応答調節因子 CheY への His-Asp リン酸リレー系を介して鞭毛の回転方向を制御する (図 1-4) [73]。CheA や CheY のリン酸化は忌避応答のシグナルに相当し、誘引応答の場合はこの頻度が低下する。SRII-HtrII を青緑色光で活性化すると、2 成分情報伝達系の一連のリン酸化を促進し、最終的に鞭毛モーターの反転頻度を上昇させて負の走光性 (反転応答) を示すと考えられている。

1.5 光センサー・トランスデューサータンパク質複合体

センサー *Np*SRII とトランスデューサー *Np*HtrII の遺伝子が 1 つのオペロン *htrII-sopII* を形成していること[34]、また 4 種のレチナルタンパク質とトランスデューサー遺伝子を欠損する *H. salinarum* Pho81wr-株に *Np*SRII と *Np*HtrII を発現すると光応答能が回復すること[38,74]等から、*Np*SRII と *Np*HtrII の複合体が 2 成分情報伝達系に情報を伝える機能単位であると考えられてきた。*In vitro* での閃光光分解 (フラッシュフォトリス) 実験により複合体の光反応を解析すると、複合体の形成で *Np*SRII のフォトサイクル中間体である M 中間体の崩壊が遅くなること[61]、また pH 感受性電極やアフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学実験などの方法でプロトンポンプ活性を調べると、複合体では細胞膜内外のプロトン輸送が消失するなど[57,58]、単体と複合体でセンサー *Np*SRII の働きが変わることが報告された。この差を指標に、センサー・トランスデューサーの様々な混合比における機能変化を解析し、*Np*SRII は、*Np*HtrII と 1 : 1 の量比で複合体を形成することが分かった[75]。更に、2002 年に *Np*SRII と *Np*HtrII の TM2 まで含む断片 (1-114 アミノ酸残基部位) を用い、センサー・トランスデューサー複合体の結晶構造も明らかにされた[76]。結晶構造としては、図 1-2 のように 2 : 2 の量比で 2 量体の HtrII の両脇に SRII が 6 番目と 7 番目のヘリックスである F、G ヘリックス側を接して挟み込むような構造をとっている[76]。

この高度好塩菌トランスデューサー *NpHtrII* と大腸菌 MCP やヒトチロシンキナーゼ型受容体などとの類似性[77,78]を考えると、*NpHtrII* の 2 量体構造は妥当な形であり、自然界でも図 1-2 の結晶構造が示すような 2:2 の複合体構造を表すと考えられる。また *NpSRII* と *NpHtrII* 間の相互作用は、膜貫通部位の接触によるファンデルワールス力の他、3 箇所の水素結合の存在によっても形成されていることが明らかにされた (図 1-5) [76]。膜貫通部位中でのこれらの水素結合の形成により、センサー・トランスデューサー間の特異的結合が達成されると考えられる。実際、これらの水素結合形成に関与する側鎖の変異により、結合の親和性が低下することが示されている[79]。

単体としての *NpSRII* は、前述のように光励起後に示すサイクリックなフォトサイクル過程での M 中間体時に F ヘリックスが外側に傾く[61-64]。この時、*NpSRII* は BR と同様に細胞内側から外側へのプロトンポンプ機能をもつ[57,58]。しかしトランスデューサー *NpHtrII* と複合体を形成後は、この外向きプロトン輸送は止まる[57,58]。トランスデューサー *NpHtrII* の結合は、センサー *NpSRII* が構造変化する際、その可動域を狭める方向へと影響する。複合体形成後は、M 中間体の崩壊速度定数も小さくなる[61]。一方、共役するトランスデューサー *NpHtrII* をスピンドラブル化して構造変化を捉えると、*NpSRII* の M 中間体崩壊に同期する様に TM2 が 20-30 度捻れることが示された[62]。前述のように、SRII の M/O 中間体がシグナル伝達する活性中間体と推定されることから、この一連の動きがセンサー SRII からトランスデューサー HtrII へ情報伝達を達成する構造変化であると考えられている[61-64,67]。

この SRII のシグナル伝達時の F ヘリックスを動かす分子機構を解明する鍵と考えられる現象がいくつか報告された。*NpSRII* が *NpHtrII* と複合体を形成した際に特徴的に現れ、また発色団レチナールの 13-*cis* 異性化と関連がありそうな *NpSRII* での変化として検出されたのが、13-*cis* 異性化レチナールの C14 位の水素と G ヘリックス上の Thr204^{*NpSRII*} との相互作用である。レチナールの C-H を C-D に重水素置換した合成レチナールを用いてのフーリエ変換赤外分光 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) 測定により、K 中間体形成時に 14 位の C-H 基が大きな立体障害を起こすこと[80]、また、光誘起赤外差スペクトルにおいて、K 中間体形成時に強い水素結合の形成を示唆する非重水素置換残基である X-H 基由来の吸収バンドが複合体を形成した条件でのみ 3479 (-)/3369 (+) cm⁻¹ のバンドとして観測され[81]、これが Thr204^{*NpSRII*} 側鎖の O-H 伸縮振動に由来することが明らかにされた[82]。光励起後、*NpSRII* の 13-*cis* レチナールの C14 位が G ヘリックスの Thr204^{*NpSRII*} と干渉するのである。更に結晶構造解析で明らかになった Thr204^{*NpSRII*} と F ヘリックス上の Tyr174^{*NpSRII*} 間の基底状態での水素結合が、レチナール異性化に伴って変化することが分かった[83]。Tyr174^{*NpSRII*} は F ヘリックスの内側でレチナールに向く面に位置し、ここに作用する力の変化で F ヘリックスの動きを生む可能性は十分に考えられる。更に、部位特異的変異解析によれば、センサー・トランスデューサーを欠損する *H. salinarum* Pho81wr-株に *NpSRII-NpHtrII* を発現した菌株において、Thr204^{*NpSRII*} や Tyr174^{*NpSRII*} に変異を導入すると光応答能は消失する[83]。これらは *NpSRII* の光センサー能に関わる重要部位として初めて知られることとなったアミノ酸残基であり、この 2 つの部位がセンサー *NpSRII* からトランスデューサー *NpHtrII* に光シグナルを伝える重要な役割をもつことは、ここまで疑いの余地はない。これらの知見から、レチナールの光励起から F ヘリックスの傾倒に至る分子機

構に1つのストーリーが出来上がる。

センサーSRIIが光を受けると内包するレチナールが異性化 (all-trans 型→13-cis 型) し、異性化レチナールの炭素 14 位の水素が G ヘリックス上の Thr204^{NpSRII} と立体障害を起こす。次に、F ヘリックス上の Tyr174^{NpSRII} と Thr204^{NpSRII} 間の水素結合が変化して F ヘリックスが外側に傾き、隣接する HtrII の TM2 が回転して光情報が伝わる (図 1-6)。「Membrane-embedded steric trigger model (MST モデル)」として提唱された考え方である[84]。驚くべきことに、光駆動プロトンポンプ BR に Thr204^{NpSRII} に対応するアミノ酸を導入し (A215T^{BR})、更にトランスデューサーNpHtrII との結合に必要な 3 箇所の水素結合形成のための二重変異 P200T^{BR}/V210Y^{BR} を導入して NpHtrII と共に Pho81 wr-株に発現させたところ、BR-HtrII 複合体が SRII と同様に忌避応答の光センサーとして機能できることが報告された[85]。実験的に確かめられた分子機構モデルとして、光センサーからトランスデューサーへの情報伝達の分子機構は全て解明されたかに思われた。

1.6 研究背景および目的

光センサーSRII からトランスデューサーHtrII への情報伝達の分子機構が MST モデルにより全て理解出来たようにも思えたが、以下の疑問も残った。1つは、13-cis レチナールが Thr204^{NpSRII} と干渉し、Thr204^{NpSRII}-Tyr174^{NpSRII} 間の水素結合に摂動を与えるとしても、これが起こるのがフォトサイクル初期の K 中間体の時間領域での変化であることである[80,86]。SRII-HtrII 間の情報伝達を担う F ヘリックスの傾倒は、M 中間体の崩壊時での事象であるが、この時間差をどう説明するのか。もう1つの疑問は、Thr204^{NpSRII} の変異体は NpSRII の光応答能を確かに消失したが、これが T204A^{NpSRII} だけでなく T204S^{NpSRII} 変異でも起こったことである[83]。この Thr204^{NpSRII} 位は SRII ファミリーでは保存性が比較的高く、どのメンバーでも極性残基である Thr または Ser として保存されている (図 3-1-1A)。NpSRII における T204S^{NpSRII} 変異がその光応答能を消失するのは、どのように説明されるのか。

筆者はこれらの疑問を解消したく、3章第1節でまずは Thr204^{NpSRII} 位が Ser である光受容体、*H. salinarum* SRII (*HsSRII*) の Ser201^{HsSRII} の機能的重要性を調べることから始めた。S201A^{HsSRII} や S201V^{HsSRII} などの変異体を作製しても驚いたことに光応答能は消失しなかった。また F ヘリックスを動かす鍵とされたもう1つの重要残基である Tyr174^{NpSRII} に相当する Tyr171^{HsSRII} の変異体も光応答能は維持された。*HsSRII*-*HsHtrII* における情報伝達はこれまでに提唱された MST モデルとは異なる分子機構であること、更に、Tyr171^{HsSRII} 部位に M 崩壊および O 崩壊速度を調節する機能的役割を見出し、SRII-HtrII 間における情報伝達の分子機構解明に向けた新たな一步を踏み出す研究となったと考える。(提出論文 1 [87])

前節で *HsSRII*-*HsHtrII* 間のシグナル伝達分子機構が、*NpSRII*-*NpHtrII* のそれとは異なる別のシナリオであることが分かったことを受け、第2節では *NpSRII*-*NpHtrII* のシグナル伝達での知見を整理するため、Thr204^{NpSRII} や Tyr174^{NpSRII} などの変異体の機能解析を行った。その際、従来の解析系[83]とは異なり、より天然の状態に近い形で発現する細胞を用いて *in vivo* 機能解析を行った。その結果、既出の報告に反して Thr204^{NpSRII} や Tyr174^{NpSRII} の種々のアミノ酸置換が光応答能の消失を引き起こさないことを見出し、*NpSRII*-*NpHtrII* においてもこれら2つのアミノ酸残基がシグナル伝達に不可欠な残基とは言えないことを明らか

にした。従来の報告と異なるこれらの結果は、従来の解析でリンカー接続体 *NpSRII*-(linker)-*NpHtrII* が使われて来た[83]のに対し、本研究における解析ではこれを分離した *NpSRII*-(separated)-*NpHtrII* を用いたことに帰結されることも分かった。好塩菌膜上では、走光性センサー・トランスデューサーは分離型として存在するため、自然界の *NpSRII*-*NpHtrII* においては、MST モデルは成り立たないと言える。むしろ、筆者が第 1 節で示した分子機構の様相に近いことが分かった。更に、*NpSRII*-*NpHtrII* 間の水素結合形成に重要と考えられている Thr189^{*NpSRII*} および Tyr199^{*NpSRII*} のアミノ酸置換が複合体間の情報伝達に及ぼす影響についても調べ、*NpSRII*-*NpHtrII* 系での生理的環境に近い条件下での変異体解析の結果としてまとめ直した。これらの成果は、*SRII*-*HtrII* 間における情報伝達の分子機構の理解に新たな視点を提供するものと考えられる。(投稿準備中[88])

最後に、総括として *SRII*-*HtrII* 複合体間でのシグナル伝達における Tyr 残基 (Tyr171^{*HsSRII*} または Tyr174^{*NpSRII*}) の重要性について、今後の展望も交えて論じる。

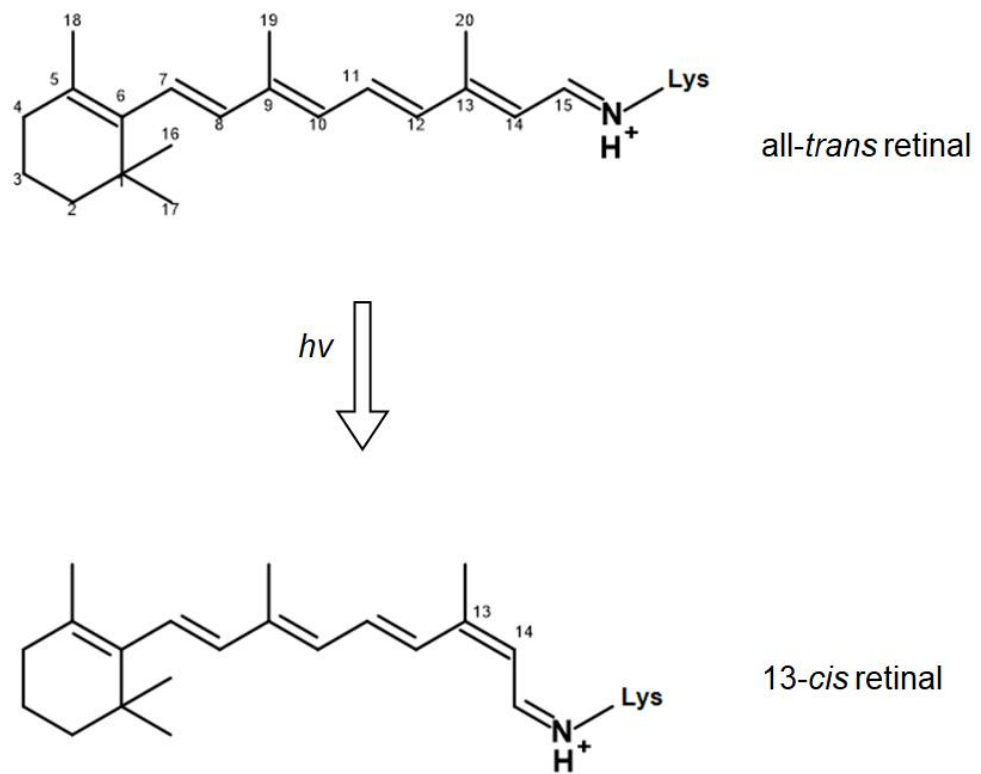


図 1-1 センソリーロドプシン II の発色団レチナールの化学構造

全てのロドプシン類において G ヘリックスに保存されるリジン残基とレチナールがシッフ塩基を形成し共有結合している。微生物型ロドプシンでは、光励起により all-*trans* 型レチナールから 13-*cis* 型レチナールに異性化する。

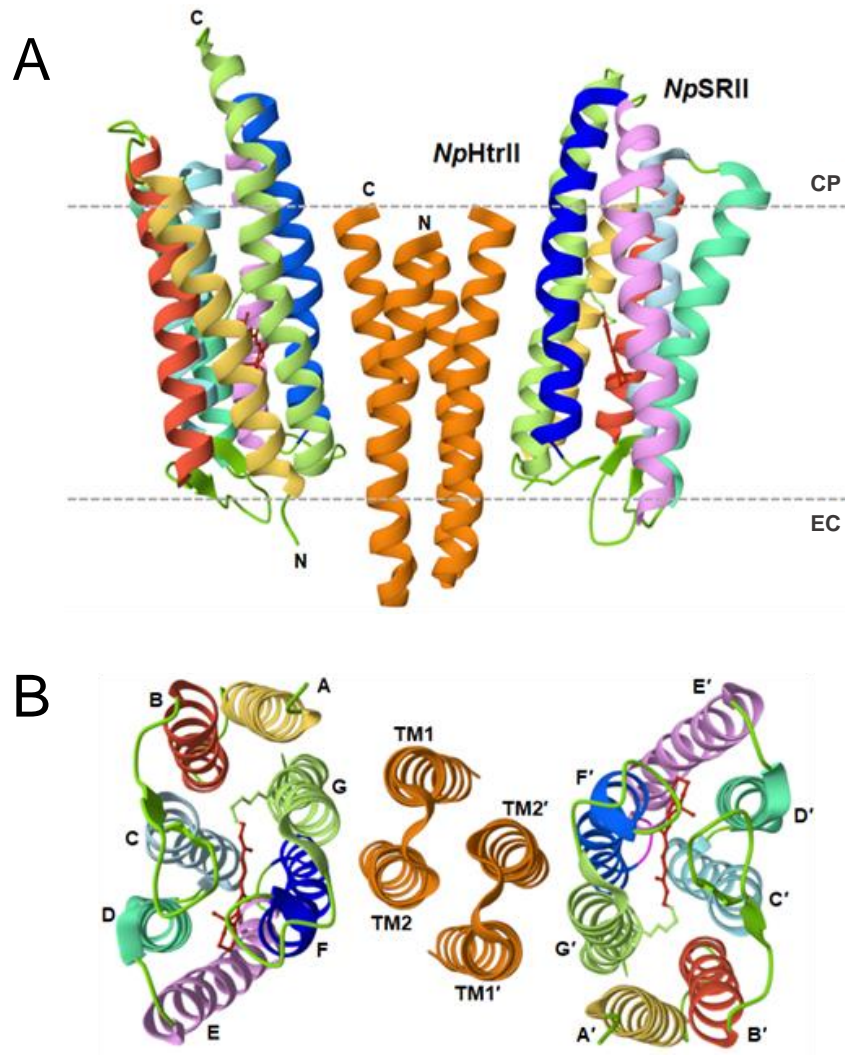


図 1-2 センソリーロドプシン II-トランスデューサータンパク質複合体の結晶構造

A は複合体の側面から見た図であり、EC は細胞外側、CP は細胞質側を示す。NpSRII は A ヘリックス (黄色)、B ヘリックス (赤色)、C ヘリックス (水色)、D ヘリックス (緑色)、E ヘリックス (ピンク色)、F ヘリックス (青色)、G ヘリックス (黄緑色) から構成されている。2 量体の NpHtrII (オレンジ) を 2 分子の NpSRII が挟み込むような構造をとっている (PDB ID code 1H2S [76])。B は細胞外側から見た結晶構造を示す。2 つの NpSRII-NpHtrII 複合分子は対称的な位置関係にあることを示している。

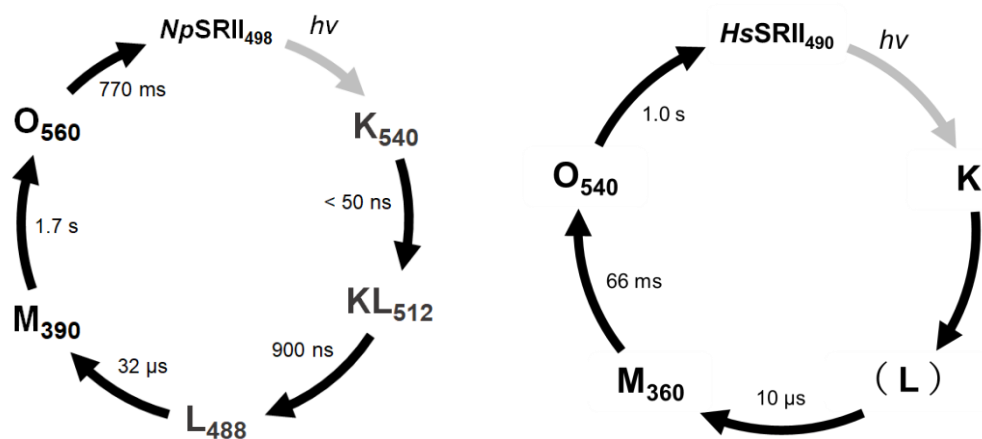


図 1-3 *NpSR II* (左) と *HsSR II* (右) の光化学反応 (フォトサイクル) [48,92]

添え字は極大吸収波長 (λ_{\max}) を示す。灰色の矢印は光による反応過程を示し、黒の矢印は熱反応過程を示す。それぞれの反応過程の矢印に併記した時間は、その反応の生理条件下での半減期を示す。

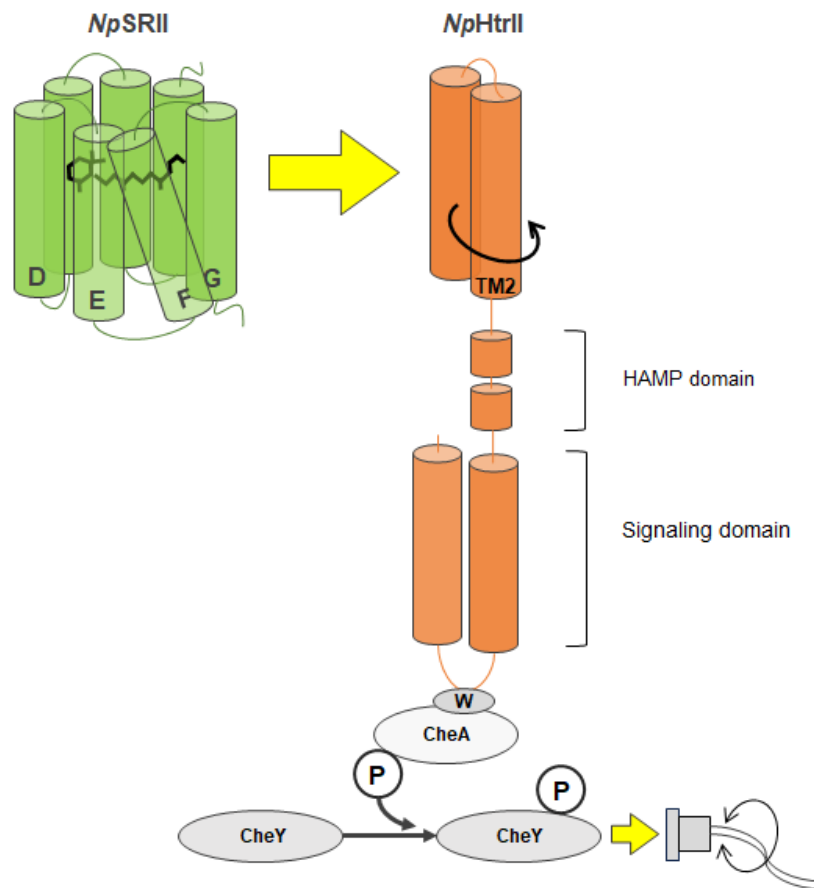


図 1-4 *NpSRII-NpHtrII* 複合体を介した光に対する忌避応答発現プロセスの概略図
NpSRII が光刺激を受けると、フォトサイクルの過程で F ヘルックスの外側への傾倒が起こり、その変化がシグナルとして隣接する *NpHtrII* へと伝わり、TM2 の回転を誘起する。
NpHtrII が受容したシグナルは更に細胞質側の下流へと伝わり、リン酸化カスケードを経て最終的に鞭毛モーターの回転を制御する。これにより *NpSRII-NpHtrII* を発現した細胞は、光に対して忌避応答を示す。

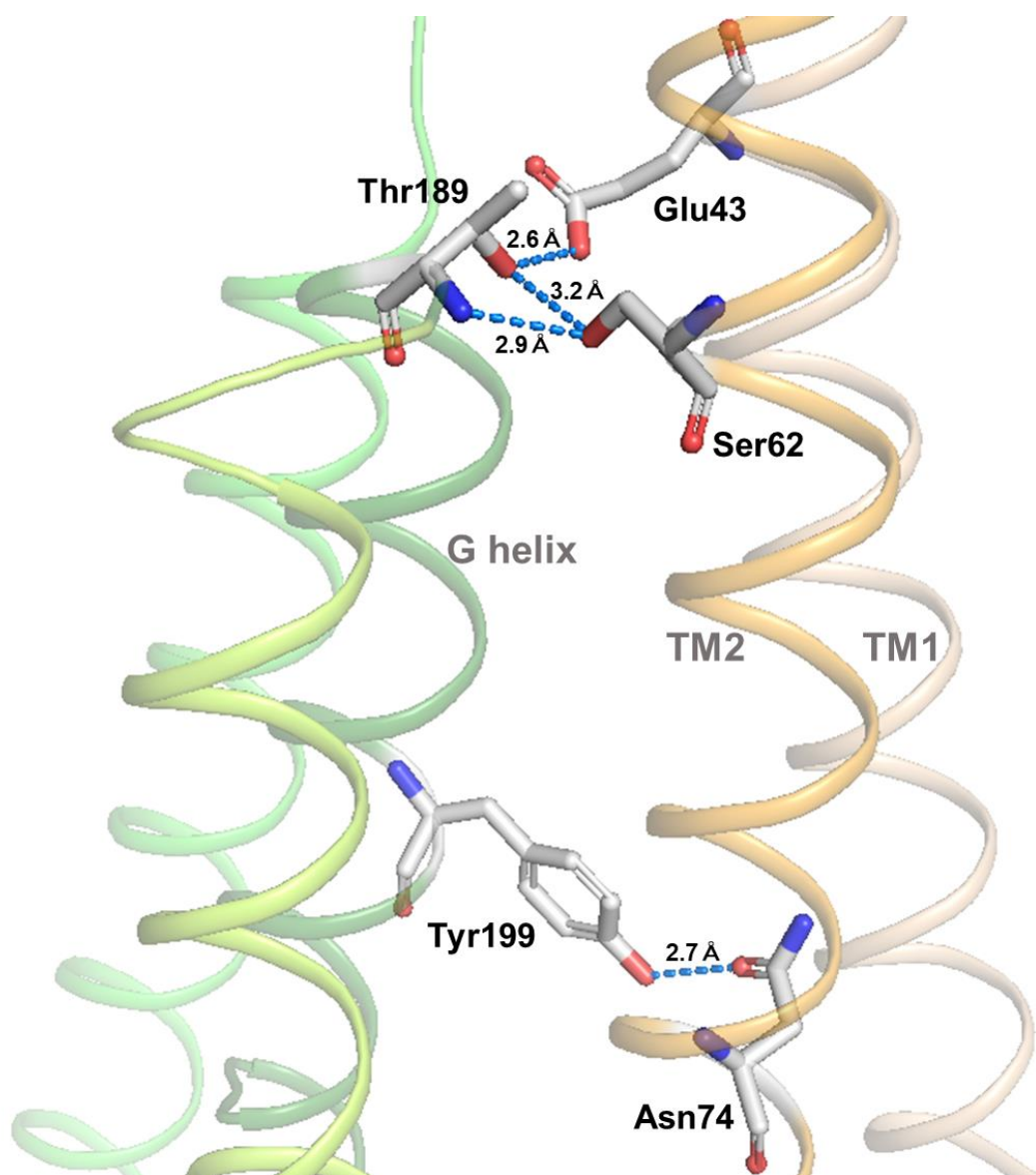


図 1-5 X 線結晶構造より明らかになった *NpSRII-NpHtrII* 間の特異的相互作用
 センサー *NpSRII* とトランスデューサー *NpHtrII* は、G ヘリックス上の Thr189^{*NpSRII*} と TM1
 上の Glu43^{*NpHtrII*}、TM2 上の Ser62^{*NpHtrII*} の間、また G ヘリックス上の Tyr199^{*NpSRII*} と TM2 上
 の Asn74^{*NpHtrII*} の間の 3 箇所水素結合(青色点線)を形成して特異的に相互作用している。

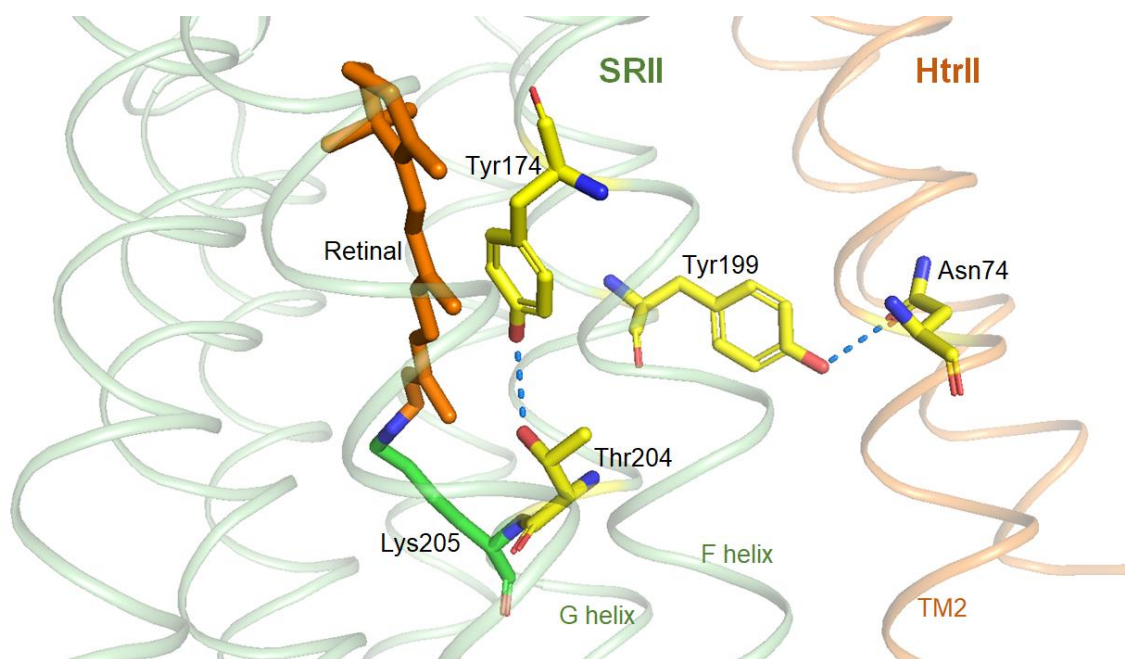


図 1-6 膜内に位置する *NpSRII-NpHtrII* 複合体接触面の構造と機能発現に重要と考えられているアミノ酸残基の空間的位置関係

上側は細胞外、下側は細胞質側を示す。レチナールの光異性化により、13-*cis* 型レチナールの炭素 14 位の水素が Thr204^{NpSRII} と立体障害を起こすことで、 Thr204^{NpSRII} - Tyr174^{NpSRII} 間の水素結合が変化し、その摂動が更に光センサー *SRII* とトランスデューサー *HtrII* 間の接触面で水素結合を形成する Tyr199^{NpSRII} と $\text{Asn74}^{NpHtrII}$ 間の分子間相互作用に摂動を与えることで、シグナルが伝達される。この分子機構モデルは「MST モデル」と呼ばれる[84]。

第 2 章 実験材料および方法

2.1	生物材料および培地	14
2.2	プラスミドおよび形質転換	14
2.3	試料の調製	18
2.4	光照射による反転応答の観察とモーション解析	18
2.5	フラッシュフォトリシス（閃光光分解）法とデータの速度論的解析 ...	19

第2章 実験材料および方法

2.1 生物材料および培地

高度好塩菌におけるタンパク質発現には *H. salinarum* Pho81wr- (*sopII*-, *htrII*-, *sopI*-, *htrI*-, *bop*-, *hop*-) 株 (John L. Spudich 博士 (Univ. Texas, USA) より供与) [37]を用いた。培養には以下に示す複合培地 (complex medium) である CM + Peptone 培地[89]を生育培地として使用した。ただし、形質転換直後の菌体の培養には 15 % sucrose を含む CM + peptone 溶液を用いた。液体培養はメビノリン (Mev. (Sigma)、最終濃度 1 µg/mL) 存在下、37 °Cにおいて、振盪培養 (回転数 135 rpm) により行った。寒天培地での培養は 1.5 % agar、Mev. (最終濃度 4 µg/mL) を含む CM + peptone 培地に植菌後、37 °Cにおいて 7–10 日間保温することで行った。

大腸菌の液体培養は LB 培地を用い、アンピシリン (Amp.、最終濃度 50 µg/mL) 存在下、37 °Cで振盪または旋回培養 (回転数 135 rpm) により行った。寒天培地での培養は 1.5 % agar、Amp. (最終濃度 50 µg/mL) を含む LB 培地に植菌後、37 °Cにおいて一晩保温することで行った。なお、特別に記す以外の試薬はすべて富士フィルム和光純薬 (和光純薬工業) の製品を用いた。

CM + Peptone 培地 (500 mL)

NaCl	125 g	4.28 M
MgSO ₄	10 g	0.01 M
KCl	1 g	0.027 M
CaCl ₂	0.1 g	1.8 × 10 ⁻³ M
Na ₃ citrate	1.5 g	1.02 × 10 ⁻² M
Peptone (Oxoid)	5 g	
FeCl ₂ (3.58 g/L)	500 µL	2.82 × 10 ⁻⁵ M
MnSO ₄ (190 mg/L)	500 µL	1.26 × 10 ⁻⁶ M
(pH 6.9 ± 0.1)		

LB 培地 (500 mL)

Bacto tryptone (Difco)	5 g
Bacto yeast extract (Difco)	2.5 g
NaCl	5 g

2.2 プラスミドおよび形質転換

H. salinarum SRII–HtrII (*Hs*SRII–(separated)–*Hs*HtrII) の好塩菌発現プラスミド pPR5[38] および *N. pharaonis* SRII–(linker)–HtrII (*Np*SRII–(linker)–*Np*HtrII) の好塩菌発現プラスミド pJS010 [90]は、John L. Spudich 博士 (Univ. Texas, USA) より入手した。分離型 *Np*SRII–*Np*HtrII

を発現する pTN710 は pJS010 を基に作製した。構築法を簡潔に記すと、pJS010 上の *sopII*-(linker)-*htrII* の開始コドン部位に *NdeI* サイトを作成し、*NdeI* と *XbaI* で切断した後に *sopII*-(linker)-*htrII* を含まない vector 部分 (large fragment) を精製した。次に、*Np* のゲノム DNA を鋳型にした PCR により *htrII-sopII* 部位を増幅 (この PCR 産物の 5'-側の *htrII* 開始コドン部位に *NdeI* サイト、3'-側に *XbaI* サイトを作成) し、精製した large fragment と繋げた (図 2-1)。

部位特異的変異導入は、QuikChange (Agilent Technologies) を用い、表 2-1 に示す primer を用いて行った。簡潔に示すと、変異プライマー (センス、アンチセンス) を用いてプラスミド全長を PCR 法により増幅し、メチル化されたサイトのみを切断する制限酵素 10 U/ μ L *DpnI* (1 μ L) により鋳型プラスミドのみを切断し、増幅された断片のみを大腸菌に導入し変異プラスミドを得た。PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ) を使用した PCR は、10 ng/ μ L 野生型 SRII 発現 plasmid (pPR5 または pTN710) 1 μ L、100 pmol/ μ L primer 1 μ L を 2 種、10 \times Rxn Buffer 5 μ L、25 μ M dNTP Mix 1 μ L、QuikSolution reagent 3 μ L、2.5 U/ μ L Pfu turbo DNA polymerase 1 μ L を混合し、反応液全量 50 μ L で行った。PCR 反応は 98 $^{\circ}$ C、1 分間の熱変性過程の後、98 $^{\circ}$ C、50 秒 ; x $^{\circ}$ C (アニーリングの温度については表 2-1 を参照)、50 秒 ; 68 $^{\circ}$ C、13 分を 25 サイクル、最後に 68 $^{\circ}$ C、7 分の伸長反応という条件で行った。DNA 配列の確認は、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies (Applied Biosystems)) を用いて行った。

Mutant	Primer sequence		Annealing Temp. [°C]	
	Sense	Antisense		
<i>Hs</i> SRII	S201A	5'-GGATTTTCATC <u>CGG</u> AAGGTCGCG-3'	5'-CGCGACCTT <u>CGC</u> GATGAAATCC-3'	57.3
	S201V	5'-CCTGGATTTCATC <u>GTG</u> AAGGTCGCGTTCG-3'	5'-CGAACGCGACCTT <u>CAC</u> GATGAAATCCAGG-3'	61.2
	S201C	5'-CTGGATTTCATC <u>TGC</u> AAGGTCGCGTTCG-3'	5'-CGAACGCGACCTT <u>GCA</u> GATGAAATCCAGG-3'	61.2
	S201T	5'-CTGGATTTCATC <u>ACG</u> AAGGTCGCGTTC-3'	5'-GAACGCGACCTT <u>CGT</u> GATGAAATCCAG-3'	55.5
	S201Y	5'-CCTGGATTTCATC <u>TAT</u> AAGGTCGCGTTCG-3'	5'-CGAACGCGACCTT <u>ATA</u> GATGAAATCCAGG-3'	58.4
	W168A	5'-CATCACGGTCGTCCTC <u>GCG</u> ACGCTGTACCCCGTGG-3'	5'-CCACGGGGTACAGCGT <u>CGC</u> GAGGACGACCGTGATG-3'	65.0
	W168V	5'-CACGGTCGTCCTC <u>GTG</u> ACGCTGTACCCC-3'	5'-GGGGTACAGCGT <u>CAC</u> GAGGACGACCGTG-3'	65.8
	W168N	5'-CACGGTCGTCCTC <u>AAC</u> ACGCTGTACCCCGT-3'	5'-CGGGTACAGCGT <u>GTT</u> GAGGACGACCGTGA-3'	65.1
	W168F	5'-CATCACGGTCGTCCTC <u>TTC</u> ACGCTGTACCCCGTGG-3'	5'-CCACGGGGTACAGCGT <u>GAA</u> GAGGACGACCGTGATG-3'	65.0
	Y171A	5'-TCTGGACGCTG <u>GCA</u> CCCGTGGTCT-3'	5'-AGACCACGGG <u>TGC</u> CAGCGTCCAGA-3'	62.3
	Y171V	5'-CCTCTGGACGCTG <u>GTC</u> CCCGTGGTCTG-3'	5'-CCAGACCACGGG <u>GAC</u> CAGCGTCCAGAGG-3'	65.0
	Y171N	5'-CTCTGGACGCTG <u>AAC</u> CCCGTGGTCTG-3'	5'-CAGACCACGGG <u>GTT</u> CAGCGTCCAGAG-3'	64.6
	Y171F	5'-CTCTGGACGCTG <u>TTC</u> CCCGTGGTCTG-3'	5'-CAGACCACGGG <u>GAA</u> CAGCGTCCAGAG-3'	63.4
	<i>Np</i> SRII	T204A	5'-CCTTGACCTCGTC <u>GCG</u> AAGGTCGGGTTTCG-3'	5'-CGAACCCGACCTT <u>CGC</u> GACGAGGTC AAGG-3'
Y174A		5'-CTCTGGGCGATT <u>GCT</u> CCGTTTCATC-3'	5'-GATGAACGG <u>AGC</u> AATCGCCCAGAG-3'	55.5
Y174V		5'-CTCTGGGCGATT <u>GTT</u> CCGTTTCATC-3'	5'-GATGAACGG <u>AAC</u> AATCGCCCAGAG-3'	55.5
Y174N		5'-CTCTGGGCGATT <u>AAT</u> CCGTTTCATC-3'	5'-GATGAACGG <u>ATT</u> AATCGCCCAGAG-3'	55.5
Y174F		5'-CTCTGGGCGATT <u>TTT</u> CCGTTTCATC-3'	5'-GATGAACGG <u>AAA</u> AATCGCCCAGAG-3'	55.5
T189V		5'-TGGCGCTGCTG <u>GTA</u> CCGACTGTGCA-3'	5'-TCGACAGTCGGT <u>TAC</u> CAGCAGCGCCA-3'	61.0
Y199F		5'-GCTTATCGTC <u>TTC</u> CTTGACCTCG-3'	5'-CGAGGTCAAG <u>GAA</u> GACGATAAGC-3'	55.0
<i>Np</i> HtrII	G83F	5'-GTTGTGCCACGCTG <u>TTC</u> GGTGACAC-3'	5'-GTGTCACC <u>GAA</u> CAGCGTGGCAGCAAC-3'	61.8

表 2-1 変異体発現プラスミド構築に用いたプライマーの配列と PCR 反応時のアニーリング温度

下線部は目的変異部位を示す。

大腸菌の形質転換（ヒートショック法）

大腸菌 DH5 α 株のコンピテントセルを使用直前に氷中で融解した。融解した後、穏やかに混和して均一にし、50 μ L のコンピテントセルを 1.5 mL エッペンチューブに移した。それに形質転換する plasmid DNA を 1 μ L 加え、ピペッティングで混和した後、氷中に 30 分間静置した。更に 45 $^{\circ}$ C で 30 秒間インキュベートし、氷中で 10 分間静置した。次に LB 液体培地を 1 mL 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪した。最後に LB + Amp. 寒天培地に 70 μ L 捲き、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。

好塩菌の形質転換

高度好塩菌の形質転換は、スフェロプラスト化した菌体にプラスミドおよび polyethylene glycol (PEG) を添加する方法で行った[36]。宿主細胞は *H. salinarum* Pho81wr-株[37]を用いた。

先ず 300 mL 枝付き三角フラスコを用い、70 mL CM + peptone 液体培地に冷凍ストックの Pho81wr-を 2 mL 加え、シェーカー（Bio Shaker BR-43FL、タイテック）内で 37 $^{\circ}$ C にて振盪培養（回転数 135 rpm）した。660 nm における光学濃度（OD 値）が 0.3–0.4（分光光度計は U-3900H（日立ハイテック）を使用）になるまで 3 日間培養後、培養液 12 mL を 4 $^{\circ}$ C、3,500 rpm（1,200 \times g）で 5 分間遠心分離（CF16RXII、T15A42 ローター、日立工機）し、集菌した。その上清を完全に除去し、Spheroplasting solution 溶液を 620 μ L 加え、更に 5 分間室温放置した後に穏やかに混和した。次に 0.5 M EDTA in Spheroplasting solution 溶液を 10 μ L 加えた 15 mL 遠沈管にこの混和溶液を 200 μ L 加え、続けて plasmid DNA（10 μ L）in Spheroplasting solution（20 μ L）溶液を 30 μ L 加えた後、5 分間室温放置した。この溶液に対し同体積の PEG in Spheroplasting solution 溶液を 240 μ L 加え、瞬時に完全に混和した。この溶液を 30 分間室温放置し、15 % sucrose in CM + peptone 溶液（75 % sucrose、CM + peptone 溶液）を 3 mL 加え、5,000 rpm（2,100 \times g）で 4 $^{\circ}$ C、15 分間遠心分離（CF16RXII、T15A42 ローター、日立工機）を行った。上清を完全に除去し、得られたペレットに 15 % sucrose in CM + peptone 溶液を 3 mL 加え、シェーカー内で 37 $^{\circ}$ C にて一晩振盪培養（回転数 135 rpm）した。

形質転換後の翌日、各培養液に Mev.（終濃度 1 μ g/mL）を加え CM + peptone + Mev. 寒天培地に 100 μ L 捲いた。残りの培養液は、およそ 30 度の角度をつけてシェーカー内で 37 $^{\circ}$ C において振盪培養（回転数 135 rpm）し、光反転応答の観察に使用した。

Spheroplasting solution 溶液（100 mL）

NaCl	11.7 g	2 M
sucrose	15 g	15 %
KCl	0.2 g	27 mM
Tris base	0.6 g	50 mM
(pH 8.5)		

0.5 M EDTA in Spheroplasting solution 溶液 (100 mL)

EDTA	18.6 g	0.5 M
NaCl	11.7 g	2 M
sucrose	15 g	15 %
KCl	2 g	27 mM
Tris base	0.6 g	50 mM

(pH 8.75)

Spheroplasting solution 溶液、0.5 M EDTA in Spheroplasting solution 溶液、75 % sucrose はそれぞれ孔径 0.2 μm のフィルター (DISMIC-25cs、アドバンテック) を通すことで滅菌した。

PEG 溶液 (50 mL)

Polyethylene glycol 600 (PEG 600)	30 mL
AG 501-X8 resin (Bio-Rad)	1.5 g

PEG in Spheroplasting solution 溶液 (10 mL)

Spheroplasting solution 溶液	5.15 mL
PEG 溶液 (47.5–49.0 %)	4.85 mL

2.3 試料の調製

好塩菌膜画分の調製

Mev.を含む CM + peptone 培地 100 mL に形質転換した Pho81wr-細胞の培養液を 100 μL 加え培養した後、50 mL 遠沈管に移し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、8,000 rpm (8,400 \times g) で 10 分間遠心分離 (CR20GIII、R12A2 ローター、日立工機) 後、上清を捨てた。次に、50 mM Tris-HCl と 4 M NaCl を含み、pH 7.0 に調整した緩衝溶液 25 mL でペレットを懸濁し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、8,000 rpm (8,400 \times g) で 10 分間遠心分離 (CR20GIII、R12A2 ローター、日立工機) 後に上清を捨て、再度上記の緩衝溶液 25 mL でペレットを懸濁した。細胞懸濁液は、超音波ホモジナイザー (Sonifier 250-Advanced、Branson) を用いて、最大出力の 50 % の振幅に設定し、連続で 1 分間超音波処理 (この操作を 6 回繰り返した) を行うことで、細胞膜を破砕した。超音波処理後の懸濁液は、未破砕細胞を除くために、4 $^{\circ}\text{C}$ 、8,000 rpm (8,400 \times g) で 15 分間遠心分離 (CR20GIII、R12A2 ローター、日立工機) した。この上清を超遠心分離用の遠沈管に移し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、40,000 rpm (170,000 \times g) で 1 時間超遠心分離 (himac CS 100GX、P70AT ローター、日立工機) した後、上清を捨て、上記の緩衝溶液 2 mL でペレットを懸濁後、測定に用いた。

2.4 光照射による反転応答の観察とモーション解析

形質転換後に液体培養した Pho81wr-細胞をスライドガラス上に滴下 (菌体液は視野内に

約 20 個になるように CM+peptone 培地で希釈調製) し、カバーガラスで挟んだ。その際、細胞のスムーズな遊泳を妨げないようにするため 2 枚のカバーガラスをスペーサーとして挟むことで、スライドガラスとカバーガラスとの間におよそ 0.13–0.17 mm の厚みをもたせた (図 2–2A)。このプレパラートを図 2–2B で示した落斜蛍光顕微鏡 (BX50FA、UPlanFL N 40x/0.75、オリンパス) にセットし、菌体の泳ぎを暗視野法で観察した。観察部は自作の亚克力製ケースで覆い、観察時の温度が 45 ± 5 °C となるように、温度調節器 (TR-KN、アズワン) で調節した。刺激光はシャッターコントローラ (SSH-C2B、シグマ光機) で開閉するキセノン光源装置 (Max-302、朝日分光) から照射し、ダイクロイックミラー (480–550/600) を使って 500 nm の励起光とした。菌体の泳ぎは PC に接続された CCD ビデオカメラ (XC-77、ソニー) で捉え、10 fps で 10 秒間録画し、刺激光として 0.125 秒長の青緑光 (500 nm) を 3 秒目で当てた。CCD カメラで 10 秒間録画したデータを PC に取り込み、Cell Trak1.5 ソフトウェア (Motion Analysis Corporation) を用いて菌体の泳ぎを追跡し、泳ぎの軌跡を座標化し、単位時間当たりの泳ぎの向きの変化 (rate of change of direction、RCD [degree/sec]) および泳ぎの速さ (Swimming speed、SPD [pixel/sec]) を算出した (図 2–2C)。0.1 秒間隔で追跡した菌体の泳ぎの軌跡において、RCD はこの 0.1 秒おきにとられた連続する 3 点の xy 座標がなす角度、SPD は 0.1 秒おきにとられた連続する 2 点の xy 座標の距離から算出した (図 2–2D)。

反転した菌体数の経時変化 Fraction of reversal cells は、RCD に代わる反転応答の指標として導入した。光刺激によって反転応答した菌体 (50–60 個) の数を 0.2 秒単位の幅で集計し、その枠毎での反転件数を反転した菌体の総数で割り規格化して示した。

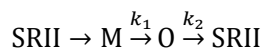
2.5 フラッシュフォトリシス (閃光光分解) 法とデータの速度論的解析

フラッシュフォトリシス (閃光光分解) 法とは、フラッシュ光により試料を励起してその後の経時的な吸光度変化を測定する方法である。測定には、当研究室で構築された図 2–3 に示す装置[91]を用いた。試料には、好塩菌から単離し、4 M NaCl と 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) を含む溶液に懸濁した膜画分試料溶液 (2.3 参照) を用いた。そのため、濁度の高い試料溶液中のタンパク質を励起するために、励起光源には光量の大きなキセノンフラッシュランプ (PE-60SG、パナソニック) を用い、更に光照射時間は 2 ミリ秒とした。励起光の波長は、カットオフフィルター (Y43、東芝) を通して >430 nm に調節した。モニター光源には 50 W ハロゲンランプを用い、光軸が励起光源の光と直交するように配置した。サンプルに特定の波長のモニター光を照射するために、光源からの光を 1 つ目のモノクロメーターで分光し、更に励起光からの散乱光を除くために試料透過後の光をもう 1 つのモノクロメーターを通してから、光電子増倍管により透過光量変化の信号を検出した。検出された透過光量変化の信号は自作の *I-V* 変換器を用いて増幅後、A/D 変換器を介して PC に取り込み、記録した。データは、励起光照射前の値をベースラインとしたその後の吸光度変化量の経時変化として、0.02 ミリ秒ごとに -40 から 10445 ミリ秒の間で記録した。また、S/N 比を向上させるために、30 回の測定の積算値をとった。測定時の温度は恒温槽 (NCB1200、アイラ) を用いて 10–40 °C に調節した。

得られた測定データは Miyazaki らのモデル[49]に従い、Origin ソフトウェア (Origin Lab、

Northampton) を使用して非線形最小二乗法により回帰し、フォトサイクル中の各中間体崩壊速度定数を算出した。解析の手順は簡潔に示すと以下の通りである。

本実験での時間分解能から、検出できる光中間体は M 中間体以降であると考え、SRII のフォトサイクルは、以下のような一方向の反応スキームに従うと仮定した。



ここで、 k_1 と k_2 はそれぞれ M 中間体と O 中間体の崩壊速度定数を示す。このとき、上に示したスキーム中の M 中間体、O 中間体、基底状態量の時間変化は、それぞれ次の式(2.1)–(2.3)で表される。

$$\Delta M = f \cdot \exp(-k_1 t) \quad \dots (2.1)$$

$$\Delta O = f \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)] \quad \dots (2.2)$$

$$\Delta \text{SRII} = -(\Delta M + \Delta O) = f \cdot \frac{1}{k_2 - k_1} [k_1 \exp(-k_2 t) - k_2 \exp(-k_1 t)] \quad \dots (2.3)$$

ここで各式の中に含まれる定数 f は、光励起によりフォトサイクルを示す SRII 分子が初期時間 ($t \cong 0$) ですべて M 中間体になると仮定した場合の時刻 $t \cong 0$ における SRII 分子の量を示している。測定したそれぞれの波長 (380、540 (*Hs*SRII) または 560 (*Np*SRII)、500 nm) での吸光度変化の値には、それぞれの波長でモニターしようとしているメインの吸収バンド (380 nm の場合は M 中間体、540 (または 560) nm の場合は O 中間体、500 nm の場合は基底状態 (SRII)) だけでなく互いの吸収バンドが重複している可能性があるため、その点を考慮し、各測定波長に依存した振幅係数 A_1 – A_3 を導入した。このとき、各測定波長 (λ) における経時的吸収変化量 ΔA は、以下の式(2.4)により表すことができる。

$$\Delta A_\lambda = A_1 \cdot \Delta M + A_2 \cdot \Delta O + A_3 \cdot \Delta \text{SRII} \quad \dots (2.4)$$

式(2.1)–(2.4)を用いて、測定した 3 波長での経時的吸収変化量のデータセットを同時フィッティングすることにより、各中間体の崩壊速度定数を算出した。

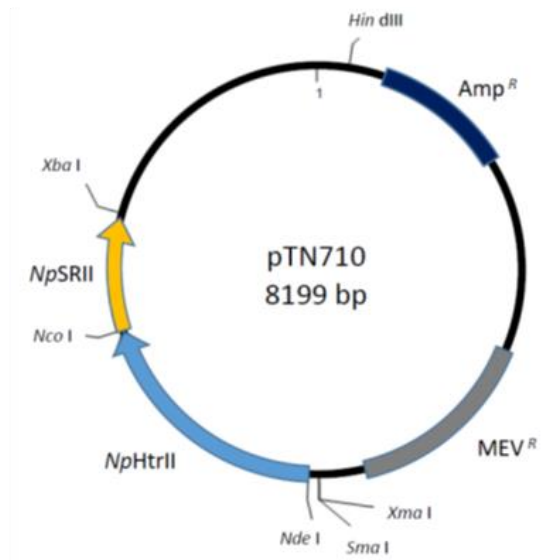
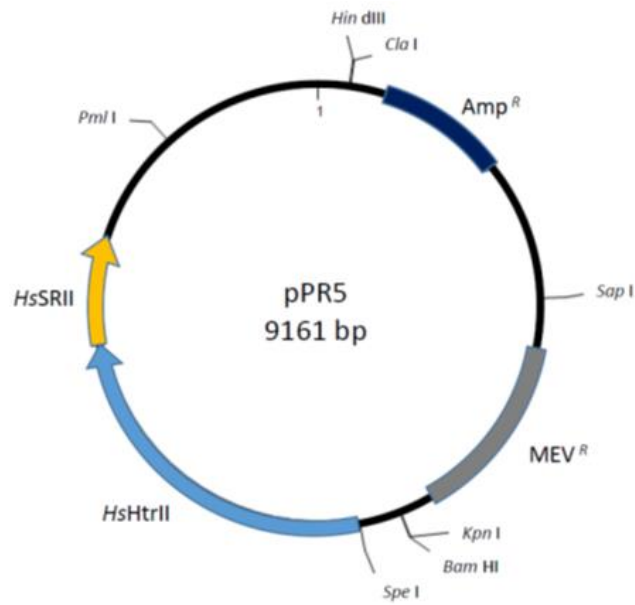


図 2-1 使用した SRII-HtrII 発現プラスミドマップ

pPR5[38]は *HsSRII-HsHtrII* の発現プラスミド (9161 bp)、pTN710 は *NpSRII-NpHtrII* の発現プラスミド (8199 bp)。どちらも、センサー・トランスデューサーを分離型の状態で発現する。

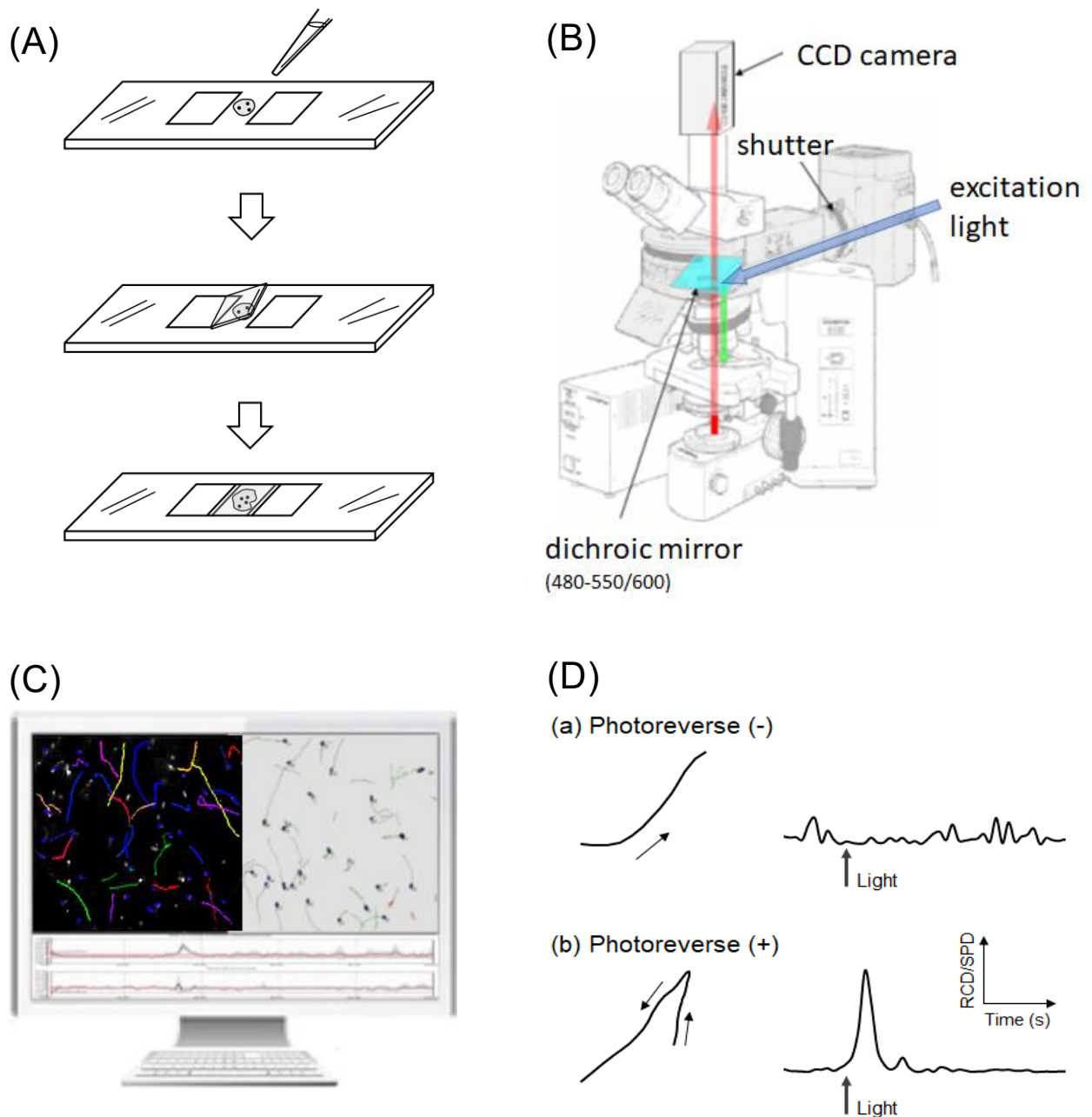


図 2-2 細胞の光刺激に対する反転応答観察法と解析法

観察する細胞懸濁液をアプライし作製したプレパラート (A) を落斜蛍光顕微鏡 (B) にセットし ($45 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$)、暗視野の下で細胞の遊泳の様子を CCD カメラで 10 秒間撮影した。3 秒目に緑色光 (500 nm) を 0.125 秒間試料に照射し、その前後の菌体の泳ぎの変化を記録した。録画データ (10 fps) は PC に取り込み、泳ぎの軌跡を座標化し、光応答した細胞の泳ぎの変化を経時的に解析 (C) した。(D) 光反転応答有り無しの菌体の軌跡図とそれぞれの RCD/SPD のグラフを表す。

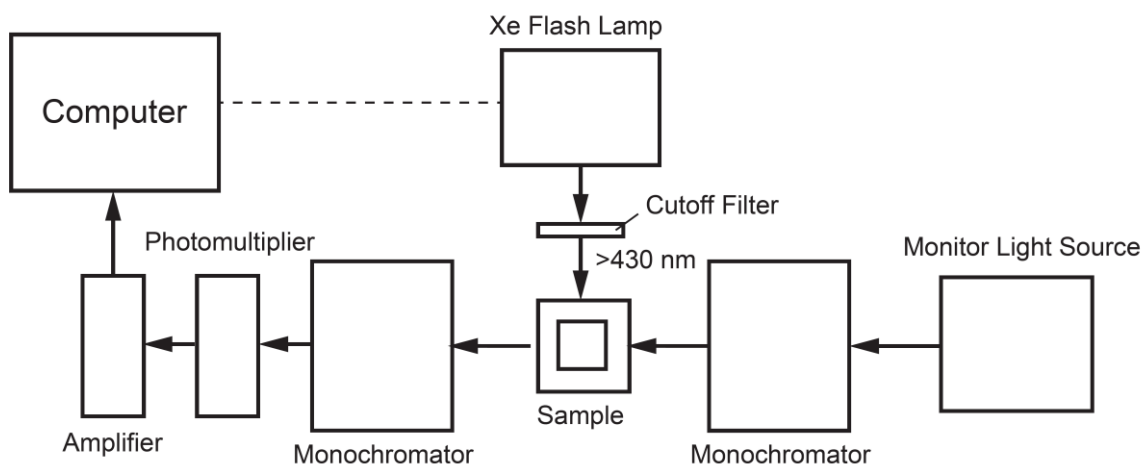


図 2-3 フラッシュフォトリシス測定系の概略図[91]

monochromator は lamp からの全波長の光を受けて分光し、測定する試料には特定の波長の光を当てた。Xe flash lamp からパルス光を sample に照射して、光化学反応を開始させた。次の monochromator は測定波長と同じ波長設定として、Xe flash lamp からの強度の大きな閃光が Detector (Photomultiplier) に入らないようにしている。図のように装置は 1 ビームの分光光度計であり、種々の波長における光励起後の吸光度経時変化を測定した。

第3章 結果および考察

3.1	<i>H. salinarum</i> のセンサーロドプシン II/トランスデューサー間のシグナル伝達における Ser201 ^{HsSRII} および Tyr171 ^{HsSRII} 置換の影響	24
3.1.1	緒言	24
3.1.2	結果	25
3.1.3	考察	29
3.2	<i>Natronomonas pharaonis</i> 由来 SRII-HtrII 間の光応答の情報伝達機構、その部位特異的変異体による機能解析	38
3.2.1	緒言	38
3.2.2	結果	40
3.2.3	考察	45

第3章 結果および考察

3.1 *H. salinarum* のセンサーロドプシン II/トランスデューサー間のシグナル伝達における Ser201^{HsSRII} および Tyr171^{HsSRII} 置換の影響 [87]

3.1.1 緒言

序論で述べた通り、*NpSRII-NpHtrII* 複合体間での情報伝達において、シグナリング中間体である M/O 中間体時に起こる F ヘリックスの外側への傾倒が重要な構造変化であると考えられている。そして、互いに異なるヘリックス上に存在し、基底状態でヘリックス間水素結合を形成する Thr204^{NpSRII} および Tyr174^{NpSRII} が、この動きを引き起こす鍵となるアミノ酸残基として、その重要性が提唱された[83]。この Thr204^{NpSRII}-Tyr174^{NpSRII} 間の相互作用による走光性発現の分子機構 (MST モデル[84]) は、広く SRII-HtrII 間の情報伝達に成り立つのであろうか。SRII ファミリーでは、レチナル分子と結合する Lys の隣に位置するアミノ酸は Ser または Thr のどちらかとして保存されている (図 3-1-1A)。どちらも極性アミノ酸残基であることから、同様の機能的役割をもつと予想される。しかし、この部位の Ser がシグナル伝達に果たす役割は未解明である。

そこで、本節ではこの部位に Ser をもつ代表的な SRII として *N. pharaonis* に近縁の *H. salinarum* 由来の SRII (*HsSRII*) に焦点を当て、更にこの Ser201^{HsSRII} と水素結合すると予想される Tyr171^{HsSRII} (*NpSRII* の Tyr174^{NpSRII} に相当) にも着目し、アミノ酸置換が走光性機能に与える影響について調べた。*HsSRII* は *NpSRII* と 56% の相同性を有する光受容体である。最も早く発見された SRII として初期には良く研究された光センサーでありながら、前述した通り可溶化や塩強度変化に不安定であるためにセンサー・トランスデューサー間の相互作用や構造変化は解明されずにきた。今回、*HsSRII* の Ser201^{HsSRII} および Tyr171^{HsSRII} の様々な変異体を作製して忌避応答能や光反応に影響を与えるかについて検討した。

3.1.2 結果

Ser201^{HsSRII} 変異体の光誘起反転応答およびフォトサイクルに及ぼす影響

本節で検討したすべてのサンプルは暗視野の下、顕微鏡下 ($45 \pm 5^\circ\text{C}$) で 10 秒間の遊泳を観察し、3 秒目で 500 nm の光を 0.125 秒間照射した。菌体の泳ぎの軌跡は xy 座標として抽出し (第 2 章 2.4 節参照)、光照射後のどのタイミングで反転するかを個々の菌体で調べた (図 3-1-2A)。観察した 50-60 個の菌体の反転応答の時刻を 0.2 秒刻みの幅で集計して、その枠毎での反転件数を光反転細胞の総数で割り、データを 0-1 にスケールして示した (図 3-1-2B)。HsSRII-HsHtrII および各種変異体を発現する高度好塩菌 *H. salinarum* Pho81wr-株 (BR⁻、HR⁻、SRI⁻、SRII⁻、HtrI⁻、HtrII⁻) に、光照射した時の菌の泳ぎの変化を示した (図 3-1-3)。宿主である Pho81wr-株は、以前に報告されたように励起光照射の有無に関わらず反転応答を示さなかった (図 3-1-3a)。一方、野生型 HsSRII-HsHtrII を発現する細胞は、NpSRII-NpHtrII 発現株と同様[74]に緑色光刺激に対して忌避応答を示した (図 3-1-3b)。

極性アミノ酸に置換した S201C^{HsSRII}、S201T^{HsSRII}、S201Y^{HsSRII} 変異体の走光性解析においても、光刺激により野生型 SRII と同等の反転応答を示すことが分かった。驚くべきことに、非極性アミノ酸残基で置換した S201A^{HsSRII} および S201V^{HsSRII} でも同様の結果が得られた (図 3-1-3c-g)。従って、Ser201^{HsSRII} を他のアミノ酸残基に置換しても、HsSRII-HsHtrII による負の走光性に全く影響を与えないことが分かった。

観察に用いた野生型 HsSRII および Ser201^{HsSRII} 変異体の HsHtrII 複合体としてのフォトサイクルを調べた (図 3-1-4)。顕微鏡下での光応答観察の温度に合わせて、ストロボ光照射による過渡吸収変化測定を 40 °Cで行った。図 3-1-4 は、光励起後の 500、380 および 540 nm での経時的吸光度変化として示しており、それぞれ基底状態の回復、M 中間体の崩壊、O 中間体の生成と崩壊を表している[92]。センサー・トランスデューサー間のシグナリング中間体と推定される M や O 中間体の生成が、野生型 HsSRII および Ser201^{HsSRII} 変異体のいずれにおいても数十ミリ秒から数秒の時間領域で検出できた (図 3-1-4A)。ここで野生型 HsSRII のデータは、注目する M や O 中間体の生成が 40 °Cで極端に早まることに特に注意を払った。本フラッシュフォトリス実験では励起光に強い光源が必要であり、そこで用いるストロボフラッシュ光源が比較的長く (2 ミリ秒) 発光することから、早い時間領域の測定データに励起ストロボ光が入りかねない。そのため、早い時間帯も含むデータに対して、第 2 章 2.5 節に示したフォトサイクルスキームに基づいた理論式による同時フィッティングから正確にフォトサイクル中間体の速度定数を見積もることは困難であった。そこで、野生型 HsSRII のデータに関しては、測定温度 10-35 °Cでも同様の実験を行い (図 3-1-5A)、それぞれの温度条件下における M と O 中間体の崩壊速度定数 (それぞれ k_1 、 k_2) を導出し、アレニウス・プロットを行った (図 3-1-5B)。このプロットに対する回帰直線の外挿から 40 °Cでの k_1 、 k_2 を予測し、その値を用いて実測データに対して第 2 章 2.5 節に示したモデルスキームに従う理論カーブを描き出したところ、実測データとよく合う結果が得られた。これにより、考えたフォトサイクルスキームの妥当性、また予測より得られた k_1 、 k_2 の値も妥当であると考えられる。これを踏まえ、筆者が観察している HsSRII-HsHtrII 複合体でも N 中間体は見られず、これは HsSRII 単独のフォトサイク

ルとは対照的に、*HsSRII-HsHtrII* 複合体では N 中間体が検出されなかったという以前報告された結果と一致した[92]。

Ser201^{HsSRII} 変異体においても同様に *HsHtrII* と複合体を形成するときのフォトサイクルへの影響を調べた。*Ser201^{HsSRII}* はレチナールの C14 位と相互作用するレチナール近傍にあるためフォトサイクルを変化させる可能性がある。実際に *S201T^{HsSRII}* 変異体では、初期中間体である K 中間体の分岐生成物 P480 の形成が大幅に減少することが Dai らの研究で示されている[93]。図 3-1-4A は走光性解析時の温度に近い 40 °C 下で得られた野生型 *HsSRII-HsHtrII* (図 3-1-4A(a)) と *Ser201^{HsSRII}* 変異体 (図 3-1-4A(b-f)) の光励起後の経時的吸収変化を示す。すべての *Ser201^{HsSRII}* 変異体は野生型同様にフォトサイクルの後半に、M 中間体と O 中間体の生成、および基底状態への回帰が見られたが、その速度定数には野生型との違いが見られた。この結果より、野生型とは異なる光中間体の崩壊や基底状態への回復速度をもつフォトサイクルでありながら、どの *Ser201^{HsSRII}* 変異体も機能的に発現していることが分かった。

続いて同じ解析方法を用いてこれら変異体における M 中間体と O 中間体の崩壊速度定数も推定し、図 3-1-4B にまとめた。算出した値によると、*HsHtrII* と複合体を形成するすべての *Ser201^{HsSRII}* 変異体の M 中間体と O 中間体の崩壊は野生型 *HsSRII-HsHtrII* より小さい速度定数を示した。5 つの変異体のうち、アミノ酸側鎖のサイズが野生型の Ser と最も近い Cys に置換した変異体では最も変異の影響が小さく、M 中間体の崩壊速度定数が野生型とほぼ同等であること、また O 中間体の崩壊速度定数は野生型のわずかに約 20 % 低下したのみであった。これに対し、他の変異体における M 中間体の崩壊速度定数は約 2.1 倍以上低下し、更に O 中間体は約 2.3-15.3 倍遅くなった。これらの結果から 201 番目のアミノ酸残基の極性が影響するのではなく、側鎖サイズの変化がシグナル伝達の光中間体寿命に大きく影響すると考えられる。

以上のように、*Ser201^{HsSRII}* は *HsSRII* のフォトサイクルに影響し、特にシグナリング中間体と考えられる M/O 中間体の寿命を伸ばすものの、シグナル伝達能という点に関しては全く影響しないことが分かった。

Trp168^{HsSRII} 変異体の光誘起反転応答の観察

HsSRII の *Ser201^{HsSRII}* においては *NpSRII* の *Thr204^{NpSRII}* とは異なり、*HsSRII-HsHtrII* 複合体のシグナル伝達における機能的な重要性は見出せなかった。そこで次に、この部位に代わりシグナル伝達に重要な別のアミノ酸残基を特定することを目指した。異性化レチナール (13-*cis* 型) がレチナールポケット内の一部に干渉し、*SRII* の構造変化が生じて *HtrII* にシグナルが伝わることにおそらく疑いの余地はない。例えば *in silico* シミュレーションによれば、*NpSRII* では 13-*cis* 型レチナールが F ヘリックスの内面に位置する嵩高いアミノ酸残基、*Trp171^{NpSRII}* に干渉することが計算されている[94]。また、BR ではラマン分光法により 13-*cis* 型レチナールが *Trp182^{BR}* (*Trp171^{NpSRII}* に対応) および *Trp189^{BR}* と相互作用し、F ヘリックスと立体的に反発することが報告されている[95]。*HsSRII* では *Trp168^{HsSRII}* が同様に異性化レチナールと相互作用する位置にあり、F ヘリックスを外側に押すように干渉する可能性がある。そこで、*W168A^{HsSRII}*、*W168V^{HsSRII}*、*W168N^{HsSRII}*、*W168F^{HsSRII}* 変異体を構築し、その走光性能を調べた。しかし予想に反して、光照射後の細胞ほどの変異体も野

生型と同じように光照射後直ちに泳ぎを反転する光応答を示した（データは示さない）。

Tyr171^{HsSRII} 変異体の光誘起反転応答およびフォトサイクルに及ぼす影響

次に、Tyr171^{HsSRII} について調べた。Tyr171^{HsSRII} は Trp168^{HsSRII} とは一次配列上は離れるが、F ヘリックスを構成する α ヘリックスの次のターン上でこれに隣接して位置し（図 3-1-1B）、13-*cis* 異性化レチナールと相互作用する可能性がある。またこれまでの解析では、NpSRII のこれに対応する Tyr174^{NpSRII} を Phe に置換した変異体は光応答を示さないことが報告され、その重要性が示されている[83]。そこで筆者は、NpSRII の Y174F^{NpSRII} に対応する Y171F^{HsSRII} 変異体を構築し、その光応答を観察した。

顕微鏡実験で確認したところ、青緑色の光照射に対して特徴的な反転応答を示し、野生型や Ser201^{HsSRII} 変異体のように光を受けた 1 秒以内にすべての菌体が生じた反転応答のピークは見られなかった。その代わりに応答のタイミングが曖昧な、広がった分布の反転応答が見られた（図 3-1-3h）。このような結果になった理由は不明だが、野生型とほぼ同じ時間（光照射後 1 秒以内）に反転応答を示す菌体もあれば、応答がランダムに遅れた菌体もあり（図 3-1-3h）、ある一点に集中した反転応答のピークが現れなかったと思われる。また、Tyr171^{HsSRII} を Val、Asn に置換した変異体も同様の結果を示した（図 3-1-3i,j）。これらの結果は、Tyr171^{HsSRII} を F、V、N に置換しても完全に走光性能は失われず、反転応答までにランダムなタイムラグを生じたことを意味する。

ここまで示した野生型や Ser201^{HsSRII} 変異体と同じ実験系で観察したにもかかわらず、光励起後の光応答がランダムに遅延するという興味深い現象となったが（図 3-1-3h-j）、この現象が筆者の観察法によるアーティファクトではないことを以下の方法で確認した。走光性のモーション解析では 1 つのプレパラートを使って 5 分間隔で繰り返し光照射して、5-6 回分のデータを得ているが（図 3-1-3 参照）、何度かの観察を繰り返すうちに感度が低下するなど人為的な結果になっている可能性もある。そこで、1 つのプレパラートの最初の光照射でのデータを、菌体数は少ないながらも集計し比較した。図 3-1-6 に示すように、測定 1 回目のみデータに基づく反転応答した細胞の割合（灰色バー）は、データ全体の反転応答した細胞の割合（赤色のガウス曲線）とほぼ一致している。つまり Tyr171^{HsSRII} 変異体で得られた光応答がランダムに遅延する現象が、時間経過による影響や光刺激の繰り返しによる人為的な操作によるものではないことを示すと同時に観察されたこのランダムな遅延は Tyr171^{HsSRII} 置換の影響に由来していることを示している。ただし、このランダムに遅延した反転応答は、タンパク発現の低下に依存する可能性があるが、これに関しては後述する。

Tyr171^{HsSRII} 変異体においても HsHtrII と複合体形成時にシグナリング中間体である M および O 中間体が生成するかを確認するために、これらを発現する細胞膜を用いてフラッシュフォトリス実験を行った。野生型や Ser201^{HsSRII} 変異体とは異なり、Y171F^{HsSRII} を除く変異体では変異タンパク質の発現が低いためか、十分な吸光度変化が見られなかった。微生物型ロドプシンの大半に保存されるこの Tyr171^{HsSRII} はレチナールポケット内に位置しており、構造的にポケットの形成に重要なアミノ酸残基と考えられる。従って、この位置の Tyr はタンパク質の安定性に影響し、変異体で発現量が大きく低下したと思われる。従って、フォトサイクルへの影響は、発現量が最も高かった Y171F^{HsSRII} のみを用いて検討し

た。図 3-1-4A(g) に Y171F^{HsSRII} のフラッシュフォトリス法による過渡的吸光度変化を示したが、野生型と Ser201^{HsSRII} 変異体のそれとは異なり 200 ミリ秒以降を示している。これは比較的発現量が多いとは言え、Y171F^{HsSRII}-HsHtrII 複合体で見られた吸光度変化は、野生型または Ser201^{HsSRII} 変異体-HsHtrII 複合体と比較して吸光度変化が小さいため、検出器の検出感度を同じレンジで行うと、得られた測定データは非常に分散してノイズを含むものとなったためである。このため、Y171F^{HsSRII} 変異体では、シグナルとノイズ比 (S/N 比) を改善するために実験に用いた増幅器の感度 (増幅度) と応答時間の両方の設定を野生型および Ser201^{HsSRII} 変異体とは異なる、S/N 比が高まる設定に変更した。この変更によりデータの収束は良くなったものの、光源による散乱がノイズとして被る時間領域が拡大した。図 3-1-7 は野生型 HsSRII-HsHtrII 複合体のフラッシュフォトリスの結果を例に示したものであるが、野生型などの測定と同じ設定でのデータは灰色で、感度を高めた設定でのデータは黒色で示した。光励起後 200 ミリ秒程度までは両者が一致しないため、分析には 200 ミリ秒以降のデータを使用した。このようなデータ処理にも関わらず、Y171F^{HsSRII}-HsHtrII 複合体の吸光度変化のスケールを野生型や Ser201^{HsSRII} 変異体のそれと合わせて示すとノイズが大きいデータであることは否めないが、M や O 中間体の生成が確認できる。前出のフォトサイクルスキームで理論曲線を描くと良く一致し、Y171F^{HsSRII} 変異体も野生型と同じスキームのフォトサイクルであると言える (図 3-1-4A(g))。このフィッティング結果より、M および O 中間体の崩壊速度定数が野生型のそれぞれ約 3.2 倍、および 18 倍低下したことが分かった。Tyr171^{HsSRII} も M 中間体および O 中間体寿命の調節に関与すると考えられる。

HsHtrII と複合体を形成する Y171V^{HsSRII} と Y171N^{HsSRII} 変異体のフラッシュフォトリス実験の結果 (データは示さない) からこれらのタンパク質の発現量が少ないと予想され、これらが曖昧な反転応答を示した可能性がある (図 3-1-3i,j)。しかし、Y171F^{HsSRII} (図 3-1-3h) で見られたある種不明瞭な光応答は、十分な発現量でも生じることを明確に示す (図 3-1-4A(g))。HsSRII の Tyr171^{HsSRII} は NpSRII とは異なる作用で光シグナル伝達に関与していることが明らかになった。

3.1.3 考察

本研究では、*Np*SRII の Thr204^{*Np*SRII} に相当する *Hs*SRII Ser201^{*Hs*SRII} の様々な変異体は、*Hs*SRII-*Hs*HtrII 複合体の光応答能にほとんど変化を与えないことを示した (図 3-1-3c-g)。Ser201^{*Hs*SRII} の変異体では、S201C^{*Hs*SRII} を除く種々の変異体においてフォトサイクルは影響を受けた。これはレチナールが共有結合する Lys 残基に隣接する Ser およびそれと似たサイズのアミノ酸残基が、少なくとも光化学反応の速度調節の役割をもつ可能性を示す。一方、光応答能に関しては検証したどの置換体でも影響は見られず、特に Ala や Val に置換した変異体でも反転応答したことから、*Hs*SRII-*Hs*HtrII 複合体のシグナル伝達機構は、*Np*SRII-*Np*HtrII で提唱される MST モデルでは説明できないことが明らかになった。この発見は、これまで見出されていない機構、すなわち、Thr204^{*Np*SRII} と発色団レチナールの干渉や、光照射時の Thr204^{*Np*SRII}-Tyr174^{*Np*SRII} 間の水素結合の変化が生み出すシグナル産生 [83,86]以外の何らかの分子機構の存在を示す。更に筆者は Tyr171^{*Hs*SRII} を Phe に置換してもシグナル伝達機能が完全に消失しないが、その変異が素早い光応答を妨げることを発見した。

N. pharaonis と *H. salinarum* それぞれの SRII-HtrII 複合体は共通の構造と機能をもつと考えられるが、次のような異なる点もいくつか挙げられる。*Np*SRII-*Np*HtrII 複合体の結晶構造では、SRII の F、G ヘリックスと HtrII の接触面に Thr189^{*Np*SRII} (F helix)-Glu43^{*Np*HtrII} (TM1)、Thr189^{*Np*SRII}-Ser62^{*Np*HtrII} (TM2)、Tyr199^{*Np*SRII} (G helix)-Asn74^{*Np*HtrII} (TM2) 間の特徴的な 3 つの水素結合が検出されている [76]。*Hs*SRII-*Hs*HtrII 複合体においても同様に、Gln186^{*Hs*SRII} (F helix)-Asp38^{*Hs*HtrII} (TM1)、Gln186^{*Hs*SRII}-Ser282^{*Hs*HtrII} (TM2)、Tyr196^{*Hs*SRII} (G helix)-Ser294^{*Hs*HtrII} (TM2) 間で類似の水素結合を形成すると予想される。ただし、この結合に関与するアミノ酸が *Np*SRII-*Np*HtrII 複合体のそれと完全に同一でないため、形成された水素結合の方向や距離が正確に一致しないと考えられる。実際、トランスデューサータンパク質は相互に交換可能と報告されるが、センサーとトランスデューサータンパク質の複合体形成には一種の相性も示されている。例えば、D73N^{*Hs*SRII}-*Hs*HtrII 複合体で観察される定常的な活性化は、*Np*HtrII と複合体を形成した場合は見られない [96]。また、プロトンポンプ BR に Thr204^{*Np*SRII} に相当するアミノ酸を導入して光センサー化に成功した非常に興味深い報告でも、トランスデューサーとの複合体形成に必要な Thr189^{*Np*SRII} と Tyr199^{*Np*SRII} に相当するアミノ酸残基を導入してトランスデューサーとの複合体形成を狙ったが、トランスデューサーとして *Np*HtrII を使う方が *Hs*HtrII より良い光応答を示す [85]。これらの結果は、センサーからトランスデューサーへの情報伝達には F ヘリックスと TM2 の最良の相互作用、例えば動く角度、動く距離、動きの強度などの要素がおそらく重要と考えられる。筆者は、*Hs*SRII-*Hs*HtrII 間で起こるシグナル伝達で予想される F ヘリックスの外側への傾きと TM2 の回転は、*Np*SRII-*Np*HtrII で起こる機構とは少し異なるのではないかと考えている。

この見方をすると、光を受けた時の *Hs*SRII のヒドロキシルアミン (発色団レチナールのブリーチ剤として使用され、光活性化状態での F ヘリックス傾倒時に反応性が上昇) の反応性が *Np*SRII より約 3 倍大きいと以前に報告された結果 [97] は、*Hs*SRII の F ヘリックスの方がより大きな動きを引き起こすことを意味しており大変興味深い。同様に、*Hs*SRII D73N^{*Hs*SRII} 変異体で見られた定常的なシグナル産生は、*Np*SRII でそれに相当する D75N^{*Np*SRII} では見られなかった [96] ことも、*Np*SRII より *Hs*SRII の方が M 中間体 (またはカウンター

イオンの中性残基置換に伴う PSB との塩橋切断) 時に起こる F ヘリックスの傾倒が大きいと見て取ることが出来る。また、*HsSRII-HsHtrII* 複合体の O 中間体崩壊速度は *HsSRII* 単独よりはるかに速いことが明らかにされているが[92]、*NpSRII-NpHtrII* 複合体と *NpSRII* 単独は同じ速さのフォトサイクルを示した[57]。これは、*HsSRII* が *HsHtrII* と複合体を形成することが *NpSRII-NpHtrII* 複合体に比べて F ヘリックスの動きをより大きく制限する可能性を示している。これらの異なる動きは、本研究で可能性が示された F ヘリックスの傾きを誘発する別の機構から帰結される可能性がある。

HsSRII では、M、O 中間体時に F ヘリックスを動かす力はどのような分子機構でもたらされるのであろうか？今回、Tyr171^{*HsSRII*} 変異体の走光性解析からいくつかの興味深い結果が得られた。断定的なことは未だ言えないが、Y171F、V、N^{*HsSRII*} 変異体はどれも光を受けると反転応答を示したが、変異させたことで光応答に遅延が見られた(図 3-1-3h-j)。また、この応答の遅延に呼応するように、Y171F^{*HsSRII*} 変異体では O 中間体崩壊が長引いた(図 3-1-4A(g))。この結果は、シグナル伝達の活性中間体は M および O であるという以前の報告[43]を裏付けている可能性がある。従って、Tyr171^{*HsSRII*} は M および O 中間体で F ヘリックスが外側に開いている時間を調節して、光応答の速さを制御している可能性がある。

Tyr171^{*HsSRII*} 変異のより大きな効果を期待して Y171A^{*HsSRII*} 変異体で更に走光性能を調べたところ、光応答を示さないことが分かった(データは示さない)。しかし残念なことに、この細胞膜をフラッシュフォトリス法で調べても明白な吸光度変化は得られなかった(データは示さない)。同様に吸光度変化が小さい Y171V、N^{*HsSRII*} 変異体が光応答を示したことを考えると(図 3-1-3i,j)、Y171A^{*HsSRII*} で走光性応答が見られなかったのは、この変異体が発現しないからではなく、変異による光応答能の消失である可能性も十分に考えられる。もちろんタンパク質が発現していない事も完全には否定できない。しかし、もし光応答能の消失がタンパク質発現の消失によるものではないとするならば、Tyr171^{*HsSRII*} 部位における側鎖のサイズの変化、特により小さいアミノ酸残基への変化は、シグナル伝達に十分な影響を与えることになる。今後、Y171A^{*HsSRII*} については更なる検証が必要である。

NpSRII-NpHtrII 複合体で提唱されたシグナル伝達機構「MST モデル」は、7 回膜貫通型の受容体タンパク質 GPCR を含む膜タンパク質伝達の一般的な理解に大きな手掛かりを与えた。しかし、シグナル伝達機構の一部分は共通の分子機構によるが、そのほかの部分は多様で固有の機構をもっているということと考える。本節における研究では、*HsSRII-HsHtrII* 間のシグナル伝達が *NpSRII-NpHtrII* 複合体における分子機構とは異なることを見出した。*HsSRII-HsHtrII* 複合体において F ヘリックスの動きを引き起こす別の分子機構については更なる研究が必要であるだろう。

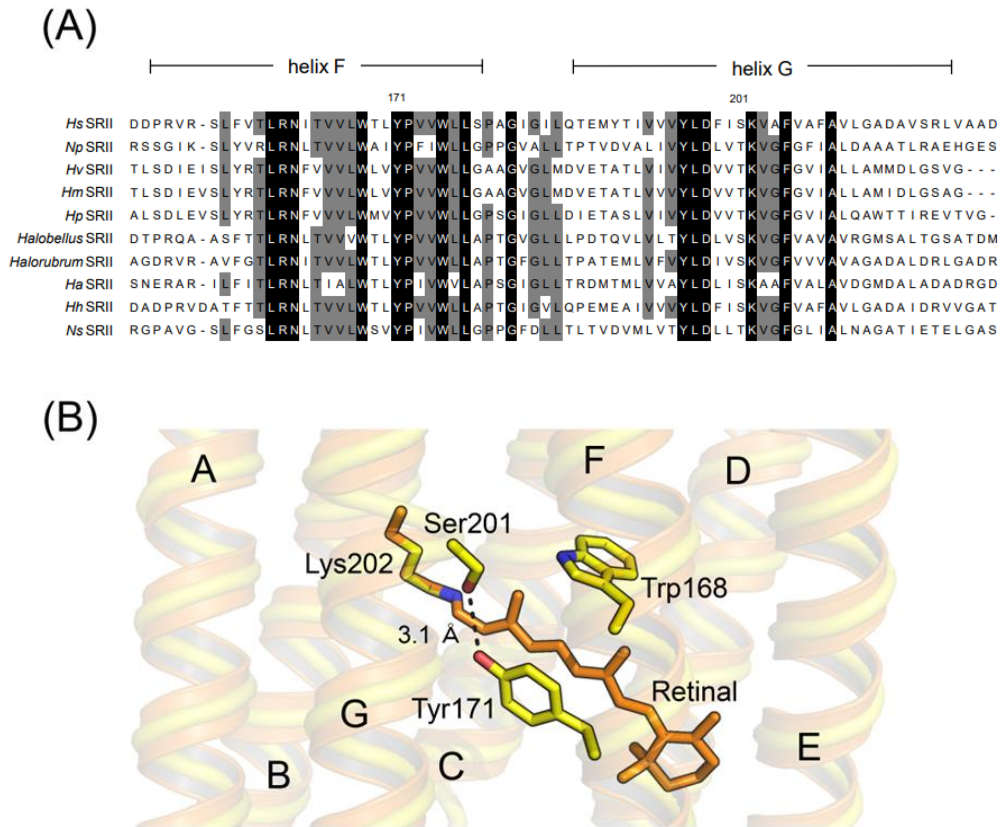


図 3-1-1 様々な SRII における Ser201^{HsSRII} および Tyr171^{HsSRII} 残基の位置のアミノ酸配列の比較およびそれらの空間的位置関係

(A) *Hs*SRII (GenBank accession number U62676)、*Np*SRII (P42196)、*Hv*SRII (AB779762)、*Hm*SRII (Q5V5V3)、*Hp*SRII (GGN87110)、*Halobellus* sp. (RLM88932)、*Halorubrum* sp. (TKX87147)、*Ha*SRII (AZH24237)、*Hh*SRII (CQH59952) および *Ns*SRII (TYT61213) から抽出された F-G ヘリックス領域のアラインメントを示す。これらの中で 100%または 70%同一の残基は、それぞれ黒または濃い灰色で色付けした。略語: *Hv*, *Haloarcula vallismortis*; *Hm*, *Haloarcula marismortui*; *Hp*, *Halomicroarcula pellucida*; *Ha*, *Haloplanus aerogenes*; *Hh*, *Halobacterium hubeiense*; *Ns*, *Natrialba swarupiae*. (B) *Hs*SRII の推定される立体構造。*Hs*SRII (黄色) の推定構造を *Np*SRII (オレンジ色) のペプチド主鎖の立体構造と重ねたかたちの図として示した。*Hs*SRII の 3D 構造は、*Np*SRII-*Np*HtrII 複合体の結晶構造 (PDB code: 1H2S) [76] を鋳型に、タンパク質立体構造の相同性モデリングプログラム (SWISS-MODEL) を用いて構築した [98,99]。Ser201^{HsSRII} と Tyr171^{HsSRII} 間の予想される水素結合は、破線で示す (推定距離約 3.1 Å)。

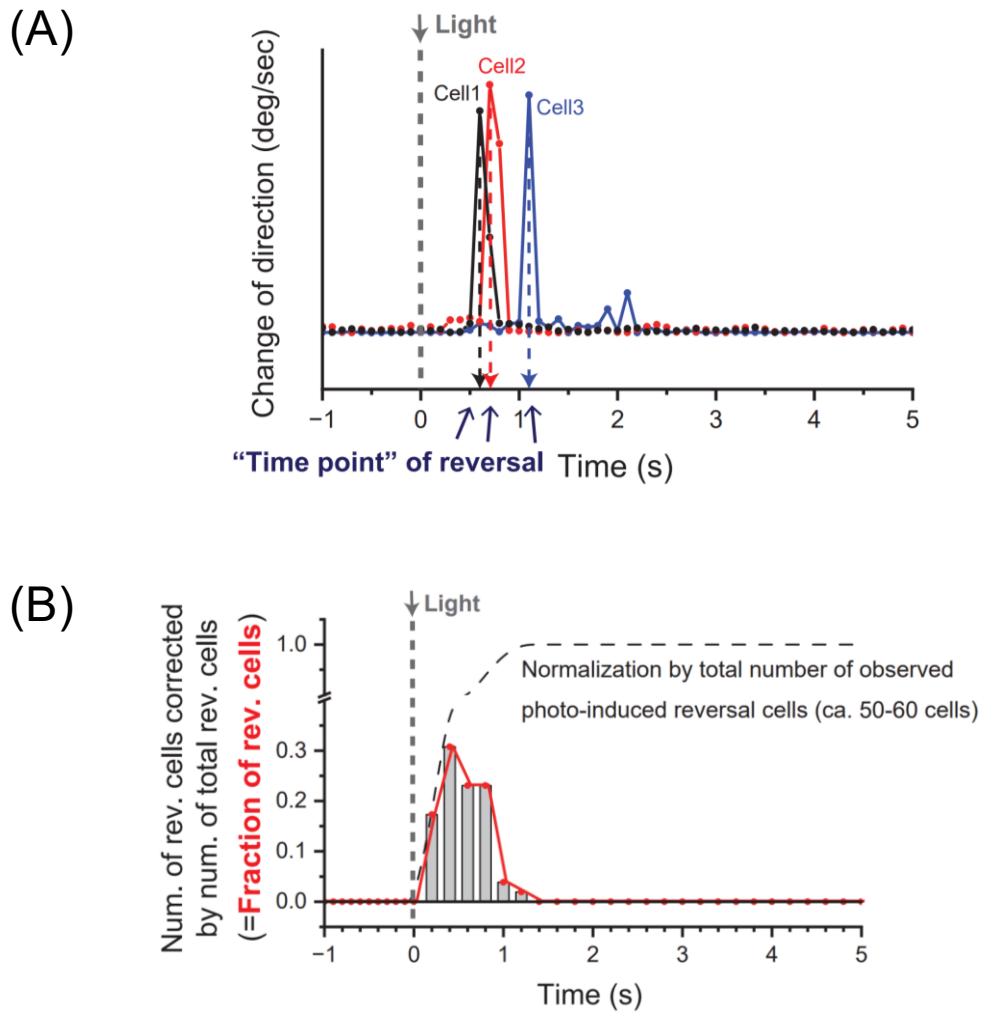


図 3-1-2 細胞の光刺激による運動解析の模式図

(A) 細胞毎の泳ぎの軌跡から反転応答の時刻を 0.1 秒のスケールで特定した。縦軸は細胞の泳ぎの向きの変化、横軸は時間 (秒) を示す。(B) 光応答を示した 50-60 個の細胞の反転時刻を 0.2 秒ごとにその件数を集計しグラフに表した。縦軸は細胞が反転した割合、横軸は時間 (秒) を示す。各時刻までの反転細胞数の累積値を示す曲線を黒の破線で示している。また、光照射のタイミングは灰色の破線で示している。

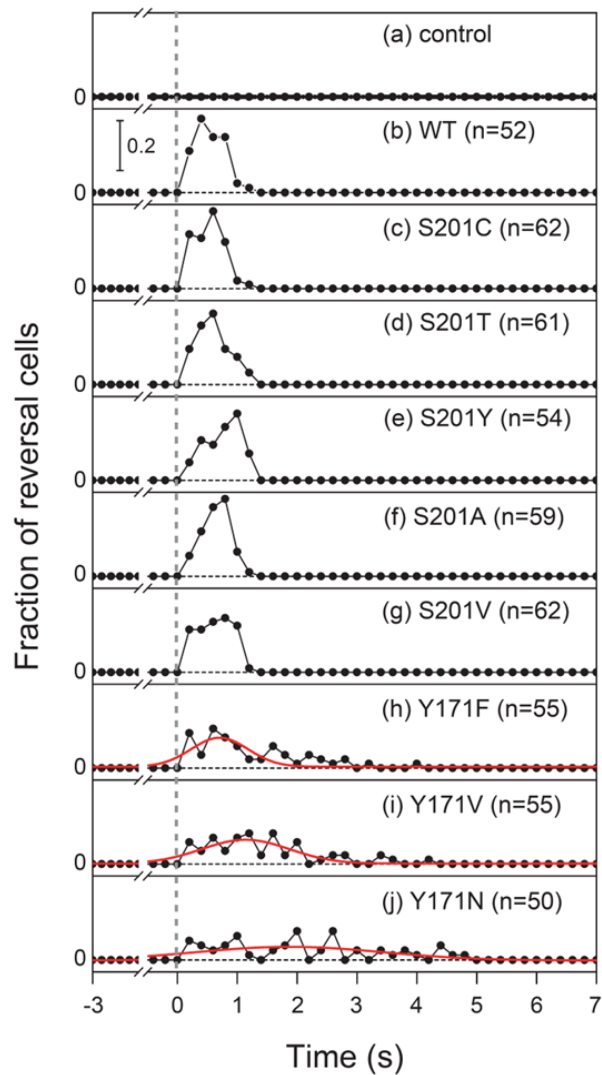


図 3-1-3 光反転応答解析の結果

ネガティブコントロールとしての *Pho81wr*-細胞 (a)、野生型 *HsSR II* (b)、*Ser201^{HsSR II}* 変異体 (c-g)、*Tyr171^{HsSR II}* 変異体 (h-j) を発現した細胞における光刺激後の反転応答の時間分布図を示す。グラフの説明は図 3-1-2B に準ずる。測定開始から 3 秒目で 500 nm の光を 0.125 秒間照射した (光照射のタイミングを灰色の破線で表示)。5 つの独立した観察データから、光反転応答を示した約 50–60 個 (n: 光反転細胞の総数) の軌跡を収集した。*Tyr171^{HsSR II}* 変異体では、遅延した光誘起反転応答を示す細胞がランダムに出現したため、時間分布の傾向がわかりやすいように各変異体のデータに典型的なガウス関数によるフィッティング曲線 (赤色の実線) を重ねて表示した。

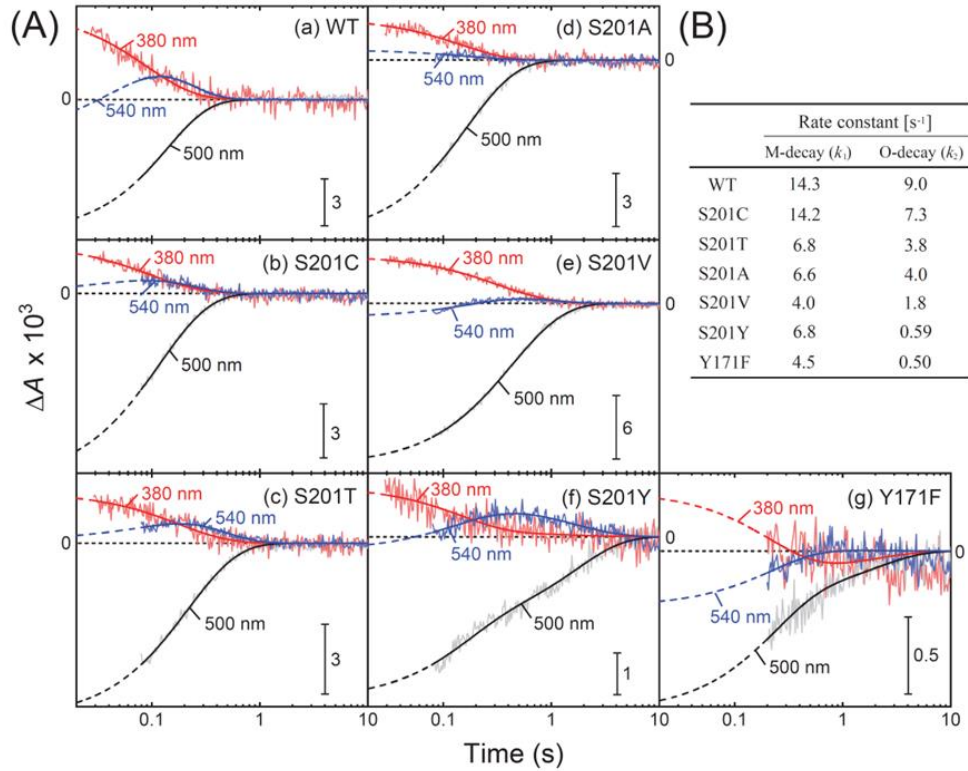


図 3-1-4 野生型 *HsSRII* および各種変異体-*HsHtrII* 複合体のフラッシュフォトリスデータ

(A) 野生型 *HsSRII* (a) と様々な Ser201^{*HsSRII*} 変異体 ((b) S201C^{*HsSRII*}、(c) S201T^{*HsSRII*}、(d) S201A^{*HsSRII*}、(e) S201V^{*HsSRII*}、(f) S201Y^{*HsSRII*}) および Y171F^{*HsSRII*} 変異体 (g)-*HsHtrII* 複合体の特徴的な 3 波長 (500 nm、黒線；380 nm、赤線；540 nm、青線) における経時的吸光度変化 (40 °C) を示す。ノイズの大きな線は実測値、滑らかな曲線は速度論的解析 (第 2 章 2.5 節参照) によるフィッティングカーブを表す。測定は、pH 7.0 に調整した 4 M NaCl および 50 mM Tris-HCl 緩衝剤を含む溶液で行った。(B) *HsHtrII* と複合体を形成する野生型 *HsSRII* および各種変異体における M および O 中間体の崩壊速度定数。

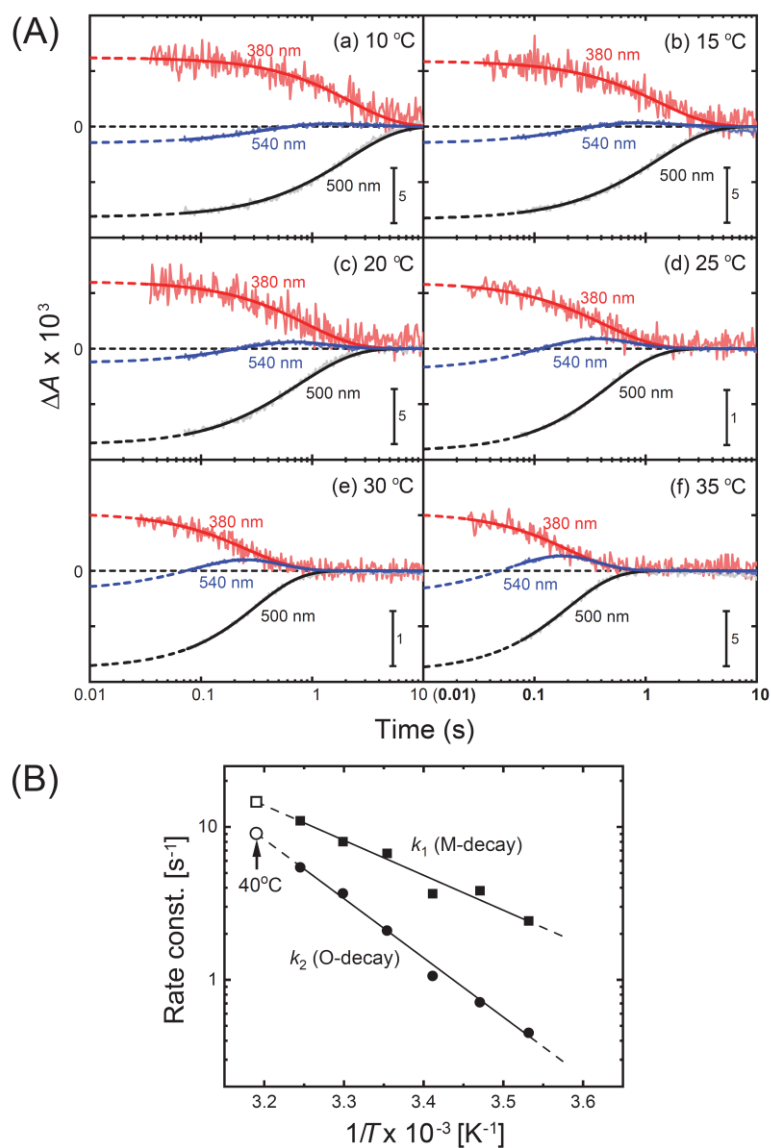


図 3-1-5 野生型 *HsSRII-HsHtrII* 複合体における光励起後の経時的吸光度変化の温度依存性

(A) 10–35 °Cの温度範囲におけるフラッシュフォトリシスデータ。特徴的な3波長(500 nm、黒線; 380 nm、赤線; 540 nm、青線)での吸光度変化を示した。これらのデータからMおよびO中間体の崩壊速度定数を算出するために、本文(第2章2.5節参照)で説明されている速度論的解析に基づいたデータ・フィッティングを行った。測定条件は図3-1-4に準ずる。(B) MおよびO中間体の崩壊速度定数のアレニウス・プロット。40 °Cにおける崩壊速度定数の数値は、アレニウスの式($k=A \cdot \exp(-E_a/RT)$ 、 A は頻度因子、 E_a は活性化エネルギーを表す)による回帰直線の外挿から求めた。この方法により求めた予測値は、速度論的フィッティングによって得られた他の数値(黒塗りのプロットで表示)と区別するために白抜きのプロットで示した。

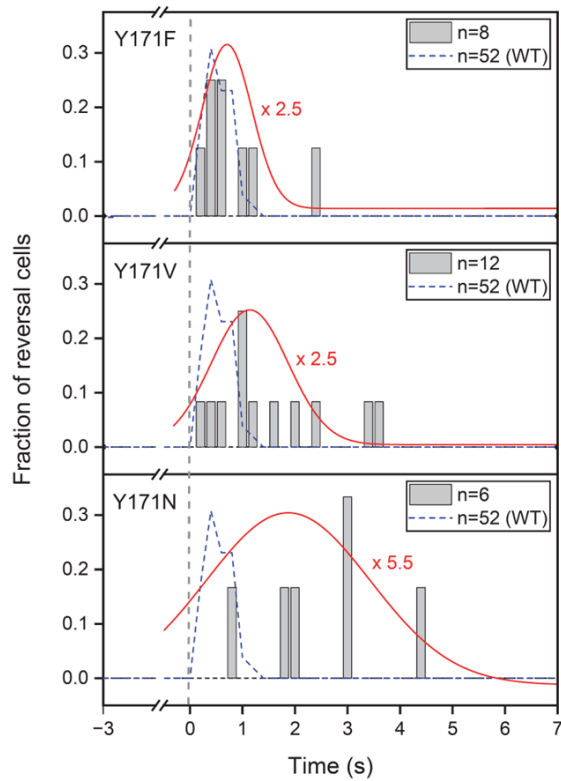


図 3-1-6 測定 1 回目だけのデータから得られた光誘起反転細胞と全体のデータ（1 試料あたり 5-6 回の測定）から得られた光誘起反転細胞間での応答時間分布の比較

Y171F^{HsSRII}（上）、Y171V^{HsSRII}（中）および Y171N^{HsSRII}（下）のデータ（Y171F^{HsSRII} n=8、Y171V^{HsSRII} n=12、Y171N^{HsSRII} n=6）をそれぞれのパネル内に灰色のバーで示す。各パネルにおける青色の破線は、野生型 *HsSRII-HsHtrII* 複合体を発現した細胞での光誘起反転細胞の応答時間分布を示している（図 3-1-3b 参照）。各パネルの赤色の実線は、全体のデータ（Y171F^{HsSRII} n=55、Y171V^{HsSRII} n=55、Y171N^{HsSRII} n=50）から得られた光誘起反転細胞の応答時間分布をガウス関数の形で表した曲線を示す（図 3-1-3h-j 参照）。1 回目だけのデータと全体のデータを比較しやすくするため、それぞれのガウス曲線の大きさと棒グラフで示した応答時間分布図の大きさが同じぐらいになるように調節した。

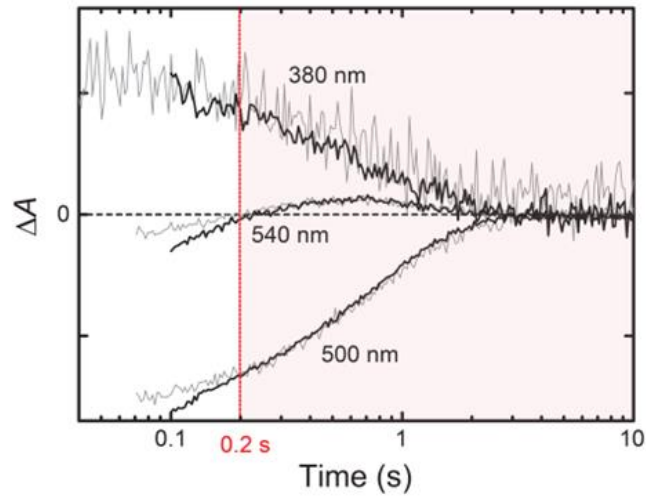


図 3-1-7 使用した増幅器の設定変更前（灰色の線）と変更後（黒色の線）のフラッシュフォトリシスデータの比較（20 °C）

野生型 *HsSR^{II}*-*HsHtr^{II}* 複合体を比較サンプルとして使用した。2つのデータの一致する時間領域を比較しやすくするため、両方のデータの縦軸値が同程度の大きさになるように調節して表示した。2つのデータの時間変化が 0.2 秒以降の時間領域でよく一致していることが見て取れるため、Y171F^{*HsSR^{II}*} 試料の測定ではこの時間領域（赤色の網掛けで表示）におけるデータを採用した。

3.2 *Natronomonas pharaonis* 由来 SRII-HtrII 間の光応答の情報伝達機構、その部位特異的変異体による機能解析 [88]

3.2.1 緒言

高度好塩菌の負の走光性センサーSRII と共役するトランスデューサーHtrII の情報伝達の分子機構は、*N. pharaonis* の *NpSRII-NpHtrII* の解析により導かれた MST モデル[84]によって理解できるように思われた。多くの研究者にそう思わせた最大の理由は、光センサーとしては機能しないプロトンポンプ BR に部位特異的変異を導入して意図した通りに光センサー化に成功[85]したからに他ならない。その鍵となった部位は、*NpSRII* 分子内で 13-*cis* 異性化レチナールと相互作用する Thr204^{*NpSRII*}、Thr204^{*NpSRII*} と水素結合を形成する Tyr174^{*NpSRII*}[83]、またトランスデューサーとの特異的相互作用を可能にする 3 箇所の分子間水素結合形成に関与する Thr189^{*NpSRII*}、Tyr199^{*NpSRII*}[79]であった。これにより、光励起された SRII はフォトサイクル後期の M/O 中間体で F ヘリックスを傾倒し、トランスデューサーの TM2 が捻れ、センサーからトランスデューサーへのシグナル伝達を達成すると考えられることとなった（第 1 章序論）。

前節では、この分子機構の一般的な成立を確かめるために近縁の *H. salinarum* SRII (*HsSRII*)でのそれらの重要性を調べた。しかし驚いたことに、Thr204^{*NpSRII*} や Tyr174^{*NpSRII*} に相当する Ser201^{*HsSRII*} や Tyr171^{*HsSRII*} の変異体も光応答を示し、この 2 箇所の残基が *HsSRII* の光応答の分子機構に本質的な役割は果たさず、シグナル伝達の分子機構解明には新たな視点が必要であることが分かった。また、相同性の高い *NpSRII* と *HsSRII* 間で分子機構が異なる結果になったことにも、わずかに疑問が残った。そこで本節では *NpSRII-NpHtrII* 間のシグナル伝達で提唱される MST モデルを再検証し、また *NpSRII-NpHtrII* のシグナル伝達での知見を整理することを目的に、改めて *N. pharaonis* SRII (*NpSRII*) の Thr204^{*NpSRII*} や Tyr174^{*NpSRII*}、2 つの分子間の特異的相互作用形成に重要な Thr189^{*NpSRII*} および Tyr199^{*NpSRII*} などの変異体の機能解析を行った。その際、これまでセンサーとトランスデューサーをリンカーで繋いだ系で行われた T204A^{*NpSRII*} 変異体などの機能解析[83]とは異なる、より自然に近い形である *NpSRII-NpHtrII* を別個に発現する菌体を用いて *in vivo* 機能解析を行った。その結果、思いもしなかった結果を得た。

NpSRII-NpHtrII の機能解析は、この機能単位が前述のように 2 : 2 の複合体であることから、*in vitro* 解析においてはそれぞれのユニットを別個に単離精製した標品を等モル混合して再構成した系で行うか[61,76,79]、または両者をリンカー接続して一体化したフュージョン体 SRII-(linker)-HtrII 試料で行う[83,100]かの何れかがされてきた。この人為的なフュージョン体は、*NpSRII* 遺伝子の終止コドンに 9 アミノ酸 (Ala-Ser-Ala-Ser-Asn-Gly-Ala-Ser-Ala) からなる水溶性ペプチドリンカーの配列に置換し、更に *NpHtrII* 遺伝子を繋いだ形が代表的な形として報告されている[83]。そしてこのリンカー接続型は、複合体の構成比の解明で用いられ[101]、また *NpSRII* と大腸菌走化性レセプターTsr とのヘテロなリンカー接続体が大腸菌内で走光性センサーとして機能することを示した際に用いられる[90,102]など、少なからず有益な知見をもたらした。またセンサー・トランスデューサーを欠損する高度好塩菌 *H. salinarum* Pho81wr-株にリンカー接続型として *NpSRII*-(linker)-*NpHtrII* を発現しても野生型と比較して遜色のない光応答を示す[90]ことから、分離型の機

能解析とリンカー接続体の機能解析は同等とみなされてきた背景がある。ここで注意したいのは、MST モデルで重要と示された Thr204^{NpSR_{II}} や Tyr174^{NpSR_{II}} 変異体の機能解析、つまり T204A^{NpSR_{II}} や Y174F^{NpSR_{II}} 変異体が光応答能を失う結果が、このリンカー接続型の発現系での解析で得られていることである[83]。他方、筆者が第 1 節で行った *HsSR_{II}-HsHtr_{II}* の変異体解析は、分離型で得られた結果である。両者の解析結果の差異は、この発現の型の違いによるものであろうか。

本節では、分離型 *NpSR_{II}-NpHtr_{II}* を発現するプラスミドを導入した高度好塩菌 *H. salinarum* Pho81wr-株を用いて *NpSR_{II}-NpHtr_{II}* の機能解析を行った。また、部位特異的変異導入法を用いて MST モデルにおいて重要なアミノ酸残基である Thr204^{NpSR_{II}} や Tyr174^{NpSR_{II}} の変異体、また *NpSR_{II}-NpHtr_{II}* 間で形成される水素結合に関与する Thr189^{NpSR_{II}} や Tyr199^{NpSR_{II}} の変異体発現株を構築し、これらを用いてアミノ酸置換がもたらす *NpSR_{II}-NpHtr_{II}* の機能変化について解析した。

3.2.2 結果

T204A^{NpSR_{II}} 変異体と Y174F^{NpSR_{II}} 変異体の光応答

第1節と同じように、本節でもレチナールタンパク質とそのトランスデューサーを欠損する高度好塩菌 *H. salinarum* Pho81wr-株に *NpSR_{II}* と *NpHtrII* の発現プラスミドを導入して光応答を解析した。用いたプラスミド pTN710 は pJS010[90]由来で、*NpSR_{II}* と *NpHtrII* を分離した形(分離型)で発現する。本節では、野生型と変異体共に全てこの発現系を用い、光応答能の有無に関しては顕微鏡下における泳動軌跡の解析(モーション解析)を行った。

光励起による反転応答の様子を表す指標として、Sudo らの解析[83]と同じように、泳動方向の変化率(RCD)を泳動速度(SPD)で除した RCD/SPD を表した(図 3-2-1)。このデータ処理においては、反転応答の際に RCD 値は大きく、また SPD 値は小さくなることから、反転応答を示す時間帯に RCD/SPD 値が大きくなり、走光性を示したことが検知しやすくなる。野生型 *NpSR_{II}-NpHtrII*(分離型)の泳ぎを、40 倍(×40)の暗視野顕微鏡下で観察すると、暗状態ではスムーズに泳ぐが、波長 500 nm の緑色光を 0.125 秒間照射すると菌体が反転応答する様子が観察された。およそ 50 個の菌体の遊泳記録をモーション解析して RCD/SPD の経時変化を表すと、光照射後 1 秒で RCD/SPD のピークが表れ、筆者の解析系でも Sudo らの報告[83]と同じく野生型 *NpSR_{II}-NpHtrII* の典型的な光応答が見られた(図 3-2-1a)。*NpSR_{II}-NpHtrII* を発現しない宿主細胞は同様の光照射では反転応答を示さない(図 3-1-3a)。また光応答を消失すると報告されているトランスデューサー *NpHtrII* G83F 変異体は[74]、本実験系でも同様に光刺激の有無に関わらず一方向のスムーズな遊泳を示し、光応答は見られなかった(図 3-2-1b)。

次に Thr204^{NpSR_{II}} 部位の役割について調べた。Sudo らによれば、T204A^{NpSR_{II}} 変異体は光励起による反転応答が消失する[83]。筆者の発現系でこの T204A^{NpSR_{II}} 変異体を顕微鏡下で観察すると、暗状態ではスムーズに泳ぐが、驚いたことに光を受けるとすぐに進行方向を転換して逆方向に泳ぐスイッチバックが観察された。モーション解析の結果、光照射後、約 1 秒に RCD/SPD のピークが現れ、光応答をすることが分かった(図 3-2-1c)。この結果は、第1節において S201A^{HsSR_{II}} が反転応答を示した結果に類似する。また、Tyr174^{NpSR_{II}} 部位の役割についても調べた。Y174F^{NpSR_{II}} 変異体を顕微鏡下で観察すると、暗状態ではスムーズに泳ぐが、これにおいても刺激光照射により反転が観察された。モーション解析の結果、光照射を受けた直後、野生型と同じように RCD/SPD のピークが現れ、細胞の泳ぎが反転することが分かった(図 3-2-1d)。

以上の結果から、Thr204^{NpSR_{II}} 部位も Tyr174^{NpSR_{II}} 部位も、光応答機能に大きく関与するとは筆者の *NpSR_{II}-NpHtrII* (分離型) 解析系では言い難い。MST モデル成立の根拠となった T204A^{NpSR_{II}} と Y174F^{NpSR_{II}} の変異体が光応答能を消失する結果とは明らかに異なる。この差異の原因は、考察で論じる。

Tyr174^{NpSR_{II}} 変異体の光応答とフォトサイクル

Y174F^{NpSR_{II}} 変異体が光照射直後に反転応答する結果が得られたが(図 3-2-1d)、顕微鏡下での光応答観察では遅延して反転する菌体も見られた。第3章1節で観察した *HsSR_{II}* の対応する Tyr171^{HsSR_{II}} 部位の解析においても、この部位の変異が光励起による反転応答の

ばらつきを生じ、また *HsSRII* の M/O 中間体崩壊を遅らせるなど、シグナル伝達への機能的関与が示された。そこで、前節で行った解析のように、*Y174F^{NpSRII}* 変異体において反転した菌体数の経時変化を調べた。このデータ処理では、モーション解析から得た泳動の軌跡データから、反転応答の時刻を抽出し、0.2 秒刻みで反転数を集計した。値は解析に用いた全菌体数で正規化している。その結果、野生型 *NpSRII-NpHtrII* 発現株は、光照射直後の菌体の反転応答時間が集中したシャープなピークを示し、光照射後 1 秒以降の反転は見られなかった (図 3-2-2a)。一方、反転応答にばらつきが感じられた *Y174F^{NpSRII}-NpHtrII* の発現株では、光照射後に直ちに反転する菌体もあるものの、その個体数は野生型に比べて半減し、また反転応答がランダムに数秒遅延する菌体が現れた (図 3-2-2b)。*Y174F^{NpSRII}* 変異のこの影響は、前節で示した *Tyr171^{HsSRII}* 変異体の結果と類似する。また前節でこの部位がシグナル伝達の調節に関わる可能性が示されたので、更に別の置換体を作製してモーション解析を行った。その結果、*Y174N^{NpSRII}* と *Y174V^{NpSRII}* の両変異体においても光照射により反転応答が起こること、そしてその反転応答は直ちに全ての菌体で起こるのではなく、その一部は数秒間に渡って遅れて現れることが分かった (図 3-2-2c,d)。いずれも *Y174F^{NpSRII}* 変異体の反転応答と差異はなかった。更に興味深いことに、*Y174A^{NpSRII}* 変異体において、光照射による反転応答が完全に消失することが分かった (図 3-2-2e)。

これらの変異体において分子レベルで何が起きているかを知るために、フラッシュフォトリス解析による M/O 中間体の生成・崩壊の検出を行った。*Tyr174^{NpSRII}-NpHtrII* 変異体を発現する好塩菌膜を単離調製し、ストロボ光による光励起後の 500、380 および 560 nm での吸収変化を経時的に測定した。それぞれ、基底状態、M 中間体、O 中間体の吸収波長である。野生型 *NpSRII-NpHtrII* は光励起により基底状態 (500 nm) が減少し 1 秒程度で元に戻る。このサイクリックな変化中に、生成した M 中間体 (380 nm) の崩壊と O 中間体 (560 nm) の生成・崩壊、そして基底状態の回復が見られた (図 3-2-3a)。第 2 章 2.5 節に示したフォトサイクルのスキームに従った速度論的解析により、M と O 中間体の崩壊速度定数は、それぞれ $k_1=4.78\text{ s}^{-1}$ 、 $k_2=7.73\text{ s}^{-1}$ と算出された。一方、*Tyr174^{NpSRII}* 部位の変異体は *NpSRII* に特徴的なフォトサイクルを示したが、何れも M/O 中間体の崩壊が遅くなり、基底状態へ戻る過程が野生型のおよそ 10 倍も長引くことが分かった。また置換後のアミノ酸側鎖により、中間体の生成に関してはそれぞれ異なる特徴を示した。それらの中で、極性の *Asn* 側鎖に置換した *Y174N^{NpSRII}* 変異体は野生型のフォトサイクルに良く類似し、M 中間体の崩壊、O 中間体生成・崩壊が検出できた。しかし M と O 中間体の崩壊速度定数は、それぞれ $k_1=0.73\text{ s}^{-1}$ 、 $k_2=0.36\text{ s}^{-1}$ と野生型に比べて大幅に遅くなった (図 3-2-3b)。これに対し *Y174F^{NpSRII}* と *Y174V^{NpSRII}* 変異体、また *Y174A^{NpSRII}* 変異体に関しては M 中間体の生成が見られず、O 中間体の崩壊のみが見られた。これらの変異体で M 中間体の生成が見られなかったのは、変異導入により PSB のカウンターイオンであると同時にプロトンアクセプターでもある *Asp75^{NpSRII}* の基底状態での pK_a が野生型よりも上昇した等の可能性が考えられ、第 2 章 2.5 節に示したフォトサイクルとは異なるスキームとなる。この内 *Y174F^{NpSRII}* と *Y174V^{NpSRII}* 変異体の吸光度変化は類似し、速度論的にも類似したフォトサイクルと考えられる (図 3-2-3c、*Y174V^{NpSRII}* のデータは示さない)。また作製した変異体の中で最小の側鎖への置換である *Y174A^{NpSRII}* 変異体は O 中間体崩壊が最も遅く、1 サイクル 60 秒ほどの長いフォトサイクルであった (図 3-2-3d)。

以上のように、作製したどの Tyr174^{NpSRII} 変異体も NpSRII に特徴的なフォトサイクルを示し、十分な発現が確認できた。Y174F^{NpSRII} や Y174N^{NpSRII}、Y174V^{NpSRII} 変異体が光応答を示したことから、情報伝達能の発揮という意味では Tyr174^{NpSRII} 部位は必ずしも Tyr である必要はない。しかし、野生型に匹敵する素早い光応答のためには Tyr174^{NpSRII} 部位が重要な役割をもつと言える。Phe や Asn、Val への置換体の半数が野生型と比べて遅延した光応答を示し、それらの O 中間体崩壊時間が長引いたことから、Tyr174^{NpSRII} 部位はシグナル伝達に寄与する F ヘリックスの動きのタイミングの調節に関わると考えられる。更に、Ala 置換体が光応答を完全に消失することの発見は、この部位のアミノ酸側鎖がシグナル伝達機能の本質に関わる可能性をも示すと考える。具体的な役割に関しては、今後の研究を待ちたい。

T189V^{NpSRII}、Y199F^{NpSRII} 変異体の光応答

ここまでの結果から、NpSRII-NpHtrII の分離型発現系では Thr204^{NpSRII} 置換はシグナル伝達の消失を引き起こすには至らないこと、また Tyr174^{NpSRII} も Phe や Val、Asn といった比較的側鎖の大きなアミノ酸置換ではシグナリングの消失は引き起こさないが、Ala のような側鎖の小さなアミノ酸置換によりシグナリング機能を消失するという新たな知見を見出すことに成功した。ここまで調査してきたアミノ酸残基は、いずれもタンパク質内部、すなわち発色団レチナルの近傍でシグナリングに必要な構造変化を生み出すための残基としての役割が推定されるが、一方、NpSRII の表層面に位置し、NpHtrII との結合に関与するアミノ酸は光応答能においてどのような役割を果たすのか？ 実際、前述した光センサー化 BR では、レチナルとの立体障害を生む Thr 残基の導入に加えて、HtrII との水素結合形成に必要な 2 箇所のアミノ酸残基の導入により、光反転応答能が上昇することが報告されている[85]。そこで、従来の実験系において NpSRII-NpHtrII 間の複合体形成に重要と考えられているアミノ酸残基 Thr189^{NpSRII} と Tyr199^{NpSRII} に着目した。第 1 章 序論 (1.4 トランスデューサータンパク質) で述べたように、センサー NpSRII と共役するトランスデューサー NpHtrII の複合体形成は、結合する境界面でのファンデルワールス相互作用の他、特異的な 3 箇所の水素結合の形成が関与すると考えられている[76]。この水素結合を形成する NpSRII 側の部位 Thr189^{NpSRII} と Tyr199^{NpSRII} は F ヘリックスの膜貫通部となる疎水性面に位置し、トランスデューサー NpHtrII 側の共役するアミノ酸残基と水素結合を形成して細胞膜中で安定化する。NpSRII と NpHtrII のミセル可溶化した試料を用い、両者の結合を等温滴定型熱量計 (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) で定量した結果によれば、両者の解離定数 K_D 値は野生型、T189V^{NpSRII}、Y199F^{NpSRII}、T189V^{NpSRII}/Y199F^{NpSRII} 二重変異体でそれぞれ 0.16、0.73、0.35、9.9 μM と見積もられ[79]、NpSRII-NpHtrII 間の水素結合の形成が両者の特異的結合に寄与すると考えられている。これらの変異は NpSRII-NpHtrII による情報伝達にどのように影響するであろうか。

分離型での発現プラスミド pTN710 を鋳型に作製した T189V^{NpSRII}、Y199F^{NpSRII} 変異体および T189V^{NpSRII}/Y199F^{NpSRII} 二重変異体を Pho81wr-株に発現し、細胞膜画分を単離調製した。後述の顕微鏡下でのモーション解析に合わせ、40 °Cにおいてフラッシュフォトリス解析を行った。基底状態、M 中間体、O 中間体は、それぞれ 500、380、560 nm での吸収変化として検出できる。野生型は、時間領域が 10 ミリ秒から 0.1 秒程度に M 中間体の崩壊、

0.1 秒以降に O 中間体の崩壊、そして 0.5 秒程度で元の基底状態に戻るフォトサイクルを示した。室温でのフラッシュフォトリシス解析に比べて測定温度が高い影響で変化は早い、*NpSRII* の典型的なフォトサイクルを示した (図 3-2-4A(a)) [48,49]。T189V^{*NpSRII*}、Y199F^{*NpSRII*} 変異体および T189V^{*NpSRII*}/Y199F^{*NpSRII*} 二重変異体を発現する菌体膜で同じ解析をすると、何れも野生型と似た速度と中間体構成のフォトサイクルを示した。そこで更に詳細に調べるために、この測定温度を 30、20、10 °C と変化させ、その温度依存性を測定した (図 3-2-4A)。中間体生成の解析スキーム (第 2 章 2.5 節参照) に従い、M 中間体と O 中間体の崩壊速度定数 (それぞれ k_1 、 k_2) を算出し、アレニウス・プロットを示した。M 中間体の崩壊速度定数 k_1 は野生型、変異体ともに温度依存的に変化し、片対数プロットに対して直線性を示したため、以下に示す Eyring の式 (3.1) および式 (3.2) を用いた解析により [103]、活性化エントロピー (ΔS^\ddagger)、活性化エンタルピー (ΔH^\ddagger)、活性化エネルギー (E_a) といった各種熱力学的パラメータを算出した (算出された値は表 3-2-1 に示す)。

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \quad \dots (3.1)$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad \dots (3.2)$$

上式における h 、 k_B 、 R 、 T はそれぞれプランク定数 (6.6262×10^{-34} Js)、ボルツマン定数 (1.38066×10^{-23} J/K)、気体定数 (8.3144 J/kmol)、絶対温度 (K) を表す [92]。また、変異体におけるパラメータの野生型の値からの変化量として $\Delta\Delta H^\ddagger = \Delta H^\ddagger(\text{変異型}) - H^\ddagger(\text{野生型})$ 、 $\Delta\Delta S^\ddagger = \Delta S^\ddagger(\text{変異型}) - \Delta S^\ddagger(\text{野生型})$ を算出した (算出された値についての考察は後述する)。

40 °C における M および O 中間体の崩壊速度定数は、前節図 3-1-5 で述べたのと同様に回帰直線からの外挿によって推定した。その結果、40 °C における M 中間体の崩壊速度定数 k_1^{WT} 、 k_1^{T189V} 、 k_1^{Y199F} 、 $k_1^{\text{T189V/Y199F}}$ はそれぞれ 13.0、7.6、21.7、27.0 s⁻¹ と見積もられ、野生型に比べて Y199F^{*NpSRII*} 変異体と T189V^{*NpSRII*}/Y199F^{*NpSRII*} 二重変異体は速く、T189V^{*NpSRII*} は遅くなった (図 3-2-4B)。NpSRII は NpHtrII との複合体形成では、結合によりその M 中間体崩壊が遅延することが知られる [61]。Y199F^{*NpSRII*} 変異体と T189V/Y199F^{*NpSRII*} 二重変異体では、センサー・トランスデューサーの複合体形成が低下していると考えられる。一方、O 中間体の崩壊速度定数 k_2 は、野生型、変異体ともに温度依存的に変化したものの、野生型と変異体で大差は無かった (図 3-2-4B)。

この結果から、Y199F^{*NpSRII*} 変異体と T189V^{*NpSRII*}/Y199F^{*NpSRII*} 二重変異体では、複合体形成が低下し、光応答能の低下が期待される。そこで T189V^{*NpSRII*}、Y199F^{*NpSRII*} 変異体、またその二重変異体をもつ NpHtrII 複合体を発現した Pho81wr-株の走光性能への影響を調べた。暗視野顕微鏡下 (45 ± 5 °C) の観察では、暗状態でどの変異体も野生型と同じようにスムーズに泳ぐ。ここに 500 nm の青緑光を 0.125 秒間照射したところ、野生型 (図 3-2-5a) と同様に直ちに反転する応答を示した。モーション解析すると、この反転応答は光照射後 0.5 秒程度で一斉に起こることが分かった。T189V^{*NpSRII*}、Y199F^{*NpSRII*} 変異体および T189V^{*NpSRII*}/Y199F^{*NpSRII*} 二重変異体でも同様に観察すると、野生型とほぼ同一の反転応答が起こることが分かった (図 3-2-5b-d)。NpSRII-NpHtrII の *in vitro* 結合実験の結果 [79] からは意外であるが、NpSRII-NpHtrII 間の水素結合は反転応答の情報伝達にはほとんど関与

しないと考えられる。この様な結果となった理由の詳細は不明であるが、感覚受容体としての情報伝達に感度や閾値の概念が含まれる可能性もあり、考察で詳しく論じる。

3.2.3 考察

光センサーSRII とトランスデューサーHtrII 間の情報伝達機構の分子モデルとして示された MST モデル[84]においては、Thr204^{NpSRII} と Tyr174^{NpSRII} 部位の役割が重要とされ、T204A^{NpSRII} と Y174F^{NpSRII} 変異体が光励起による反転応答の機能を消失する結果が示されている[83]。また、この Thr204^{NpSRII} に相当する残基をプロトンポンプ BR に A215T^{BR} として導入し、更にトランスデューサーと共役させることにより、BR-HtrII が光センサーとして機能したことも、Thr204^{NpSRII} と Tyr174^{NpSRII} 部位が重要であることの強い根拠となっている[85]。しかし本研究において、T204A^{NpSRII} および Y174F^{NpSRII} 変異体を *H. salinarum* Pho81wr-株に発現して光応答の有無を調べると、どちらの変異体も波長 500 nm の光刺激に対して反転応答を示すことが分かった (図 3-2-1c,d)。ここで示されたこれら 2 箇所の部位の置換体が光応答能の消失を引き起こさない結果と、既出の報告の差異は、どのように解釈されるのであろうか。

本節の緒言で触れたように、T204A^{NpSRII} と Y174F^{NpSRII} 変異体が光励起による反転応答の機能を消失する結果は、Pho81wr-株にリンカー接続型 NpSRII-(linker)-NpHtrII を発現した系で得られたものであるのに対し、筆者の解析は同じ宿主細胞に NpSRII-NpHtrII (分離型) を発現した系で行った。今回得られた変異体解析の結果が、筆者の実験特有の何らかの欠陥を含まないことを確かめるために、従来のリンカー接続型の発現系において T204A^{NpSRII} と Y174F^{NpSRII} 変異体の光応答の追実験を行った。既報の論文[83]と同じようにリンカー接続型発現のプラスミド pJS010 を鋳型に T204A^{NpSRII} および Y174F^{NpSRII} を作製し、Pho81wr-株で発現させ、光応答について調べた。その結果、どちらの変異体も励起光を照射してもスムーズに泳ぐ、光反転応答の消失が観察できた (データは示さない)。筆者の実験においても、リンカー接続型の発現系を用いれば T204A^{NpSRII} および Y174F^{NpSRII} 変異体は光応答を消失するのである。即ち、従来の報告も、筆者の今回の観察も、観察結果自体は間違いではないと言える。両者の結果の差異は、リンカー接続体 NpSRII-(linker)-NpHtrII を用いた解析と、分離型 NpSRII-(separated)-NpHtrII を用いた解析の差異に帰結される。

このことから、MST モデルとして提案された分子機構は、天然の SRII-HtrII 間のシグナル伝達においてはおそらく成り立たない。これに対し、本節において分離型 NpSRII-NpHtrII の光励起反転応答を解析した筆者の結果は、より自然界に近い状態での SRII-HtrII の分子メカニズムを解析した結果であると考えられる。3 章第 1 節での結果と併せ、相同性の高い NpSRII-NpHtrII と HsSRII-HsHtrII での変異体解析が類似の結果を示したことから、それぞれのシグナル伝達も共通の分子機構に司られると考えられる。この意味で、本節において Tyr174^{NpSRII} の変異体で得られた結果は、光応答に関わるセンサー・トランスデューサー間の分子機構を解明する上で非常に興味深い結果であるといえる。

第一に、Tyr174^{NpSRII} が Phe や Asn、Val に置換されると、刺激光照射直後の一斉の素早い反転応答ができないことが示された (図 3-2-2b-d)。この変化は T204A^{NpSRII} 変異体では見られないため、Thr204^{NpSRII}-Tyr174^{NpSRII} 間の水素結合からの関与ではない。置換したアミノ酸側鎖のサイズが関係すると考えられる。また O 中間体の崩壊が長引くことが示されたことから (図 3-2-3b,c)、SRII-HtrII 間の情報伝達に関わる SRII の F ヘリックス傾倒、あるいは傾倒からの回復に大きな役割を果たすと考えられる。そして第二に、更に小さな側鎖である Ala への置換体において光応答の完全な消失が示された (図 3-2-2e)。

この表現型は、*HsSRII* においても 3 章第 1 節で同じように Y171A^{*HsSRII*} で観察されたものの、そのフラッシュフォトリシス解析で十分な吸光度変化が得られず、タンパク発現の有効な証拠が得られなかったため、筆者にとっては課題の残った部位である。今回、*NpSRII* の Y174A^{*NpSRII*} 変異体として、フラッシュフォトリシス実験よりタンパク発現も十分であることが確認でき (図 3-2-3d)、光応答を完全に消失する部位として同定に至った。*SRII-HtrII* 分子間の情報伝達機構を解明する上で、極めて重要な部位となる。Tyr174^{*NpSRII*} 部位の Ala 置換が光応答の分子機構にどう影響するのか、今後の検討を待ちたい。

NpSRII-NpHtrII 間で形成される水素結合に関しては、可溶化状態の *NpSRII* と *NpHtrII* (1-154) を用いた ITC 測定により、水素結合消失の変異導入で親和性が低下し、特異的な結合が低下すると予想されてきた[79]。今回、*NpSRII-NpHtrII* を発現する好塩菌膜でフラッシュフォトリシス解析を行い、M 中間体の崩壊速度定数 k_1 を見積もることにより、生理条件下である菌体膜中においても Y199F^{*NpSRII*} 変異体と T189V/Y199F^{*NpSRII*} 二重変異体ではトランスデューサー *NpHtrII* の結合が減少する方向にあることが確認できた。このことは、活性化エネルギー E_a 、活性化エンタルピー ΔH^\ddagger 、活性化エントロピー ΔS^\ddagger の算出値からも推察できる。

第 1 章序論に述べたように、単体の *NpSRII* はフォトサイクル中に、M から O 中間体への遷移過程で F ヘリックスの細胞質 (CP) 側を開く。1 回の光反応で 1 個のプロトンを細胞外 (EC) 側に輸送するが、内側からのプロトン取り込みはこの開いた CP 側の経路でなされると考えられている[57,58]。しかし、プロトンポンプ BR とは異なり、CP 側経路の疎水性が高いことからプロトンの取り込みは遅く[59]、また容易ではない。*NpSRII-NpHtrII* 複合体では、細胞膜の内から外へのプロトン輸送は止まり、EC 側だけで起こるプロトンの循環に切り替わる[57,58]。複合体形成後は F ヘリックスの傾倒も弱まり、CP 側からのプロトン取り込み経路も閉じると考えられている。これを踏まえると、T189V^{*NpSRII*} 変異は、 $\Delta\Delta H^{T189V} = -16.4 \text{ kJ/mol}$ のエンタルピックな変化であり、CP 側と比べてより親水的な EC 側でのプロトン循環がより容易に起こることで、活性化エネルギー E_a も低くなったと考えられる。つまり、*NpSRII-NpHtrII* 複合体形成は、T189V^{*NpSRII*} の変異導入によりむしろ強まると考えられる。これに対し、Y199F^{*NpSRII*} 変異体と T189V^{*NpSRII*}/Y199F^{*NpSRII*} 二重変異体では、それぞれ $\Delta\Delta S^{Y199F} = 26.3 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$ 、 $\Delta\Delta S^{T189V/Y199F} = 48.4 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$ のエントロピックな変化であった。F ヘリックスの傾倒が進み、CP 側に生じる疎水的経路からの容易ではないプロトン取り込みにより、活性化エネルギー E_a が高くなったと考えられる。つまりこの時、*NpSRII-NpHtrII* 複合体の形成は弱まる。この変異導入に伴う結合親和性の変化は、以前に報告されている *in vitro* での実験結果[79]とも一致し、Tyr199^{*NpSRII*} と Asn74^{*NpHtrII*} 間の水素結合の方が Thr189^{*NpSRII*} と Glu43^{*NpHtrII*} および Ser62^{*NpHtrII*} 間の水素結合よりも *NpSRII-NpHtrII* 複合体の形成により大きく寄与していることを示している。

変異導入によりセンサー・トランスデューサーの解離が進むと思われた Y199F^{*NpSRII*} 変異体と T189V^{*NpSRII*}/Y199F^{*NpSRII*} 二重変異体であるが、光照射後のモーション解析では驚いたことに野生型と比べて遜色ない光応答が見られた。この説明の 1 つは、Y199F^{*NpSRII*} 変異体や T189V^{*NpSRII*}/Y199F^{*NpSRII*} 二重変異体で両者間の結合は確かに弱まるが、その差はあまり小さくなく、菌体膜中では複合体形成が一定量は保たれるであろうという考え方である。しかし形成する機能単位としての複合体の数は減るであろう。光応答の感度が低下する可能性

はあり、今後確かめてみたい。そしてもう1つ、これらの変異体が正常に光応答を示した理由として、トランスデューサーによる反転応答のシグナル増幅の機構があるのではないかと考えている。良く知られる大腸菌走化性受容体 (MCP) では、2量体構造が更に3つまとまった **trimer of dimer** 構造や、あるいはもっと高次の複合体構造を形成することが分かっている。そして、受容体間での協働的振舞いがあり、集合体の1分子が走化性シグナルを産生すると隣の分子もシグナル産生状態になることが示されている[104]。高度好塩菌の *NpSRII-NpHtrII* においてトランスデューサーがどのような高次構造を形作るかの詳細は不明だが、数分子という最小限の *NpSRII-NpHtrII* 複合体の存在で光応答の情報伝達をし、トランスデューサー-*NpHtrII* において MCP と似たシグナル増幅の機構を経て菌体レベルでの反転応答を実現することも十分に考えられる[105,106]。そこに必要な最小限の分子数の閾値はどの程度なのか、今後の解析を待ちたい。

分離型で発現する *NpSRII-NpHtrII* において、T204A^{*NpSRII*} および Y174F^{*NpSRII*} 変異体の *in vivo* 光応答を解析した。そして Tyr174^{*NpSRII*} 部位がもつ光応答の調節や、Ala 置換体での光応答の完全な消失を発見した。F ヘリックスの動きを伴うシグナル伝達の機構は、これまで筆者が解析してきた変異体の表現型から判断すると、前節の *HsSRII-HsHtrII* と本節の *NpSRII-NpHtrII* においてどちらも同じと考えられる。それがどのような分子機構に因るものなのか、今後の研究を待ちたい。

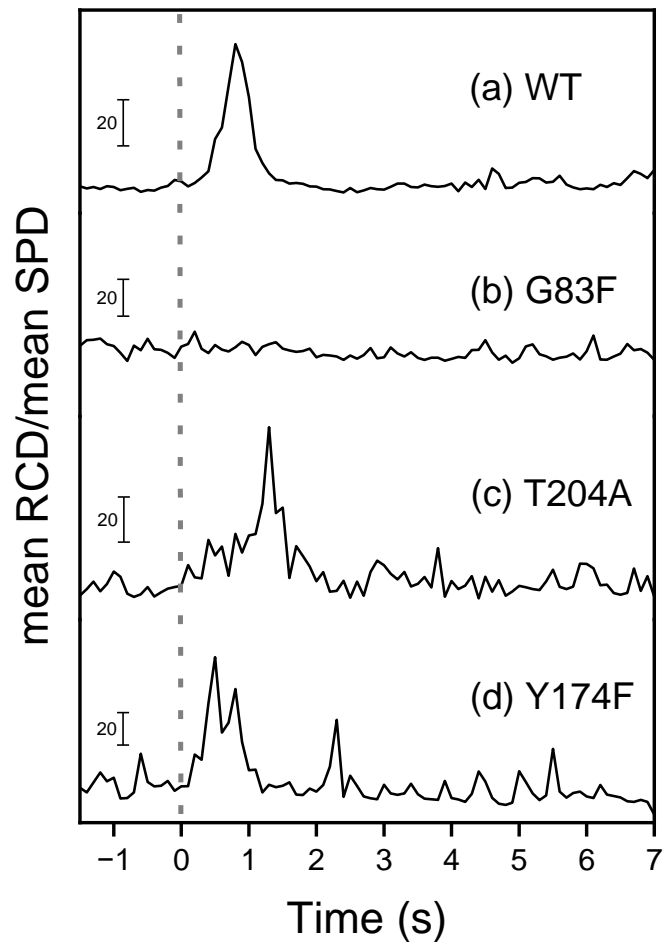


図 3-2-1 分離型 *NpSRII-NpHtrII* 複合体発現細胞の光応答

(a) 野生型、(b) G83F^{*NpHtrII*}、(c) T204A^{*NpSRII*}、(d) Y174F^{*NpSRII*} の測定結果を示す。およそ 30 個の細胞の泳ぎの変化を 10 秒間測定し、その積算値を示した。測定開始後、3 秒目で 500 nm の青緑光を 0.125 秒間照射した (灰色の点線で表示)。細胞の泳ぎの追跡と座標化は解析ソフトウェアにより行った。縦軸は泳ぎの向きの変化率(RCD)の平均値と速度(SPD)の平均値の比、横軸は光照射 (灰色の破線) からの時間 (秒) を示す。

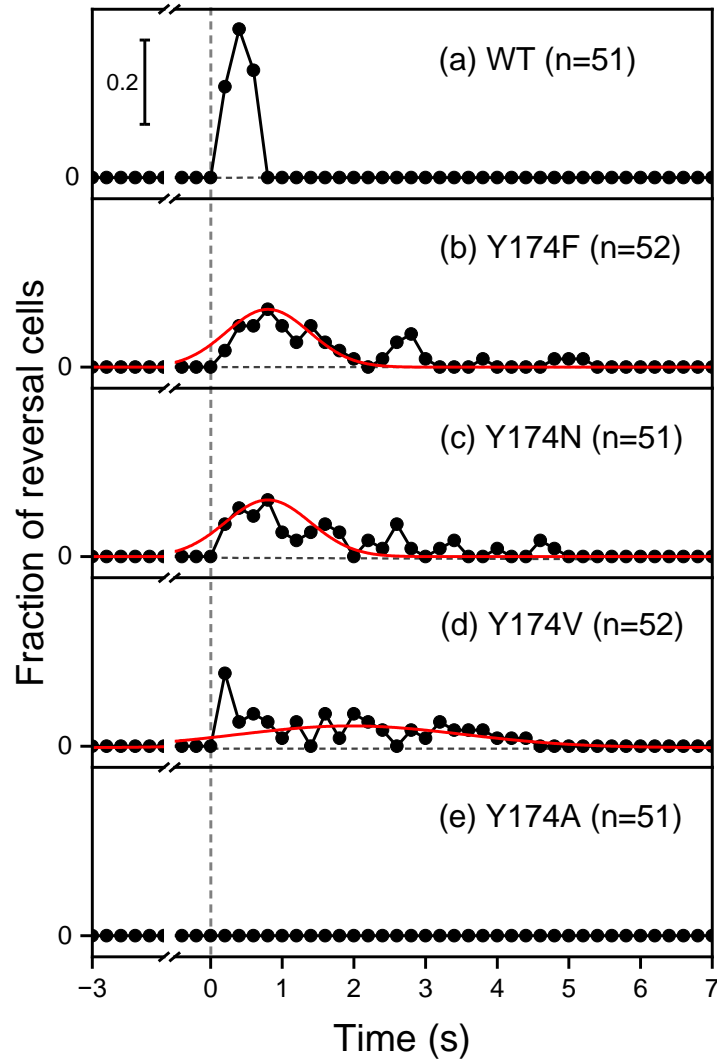


図 3-2-2 野生型 $NpSRII$ (a) および $Y174F^{NpSRII}$ (b)、 $Y174V^{NpSRII}$ (c)、 $Y174N^{NpSRII}$ (d)、 $Y174A^{NpSRII}$ (e) 発現細胞の光刺激による反転応答の時間分布

光反転応答を示した菌体の反転時刻を 0.2 秒刻みで集計し、各時間における光反転細胞数をプロットした。測定開始から 3 秒目で 500 nm の光を 0.125 秒間照射した (灰色の破線)。少なくとも 5 つの独立した観察から、約 50 個 (n : 光反転細胞の総数) の軌跡を収集した。 $Tyr174^{NpSRII}$ 変異体では、遅延した光誘起反転応答を示す細胞がランダムに出現したため、時間分布の傾向がわかりやすいように各変異体のデータに典型的なガウス関数によるフィッティング曲線 (赤色の実線) を重ねて表示した。

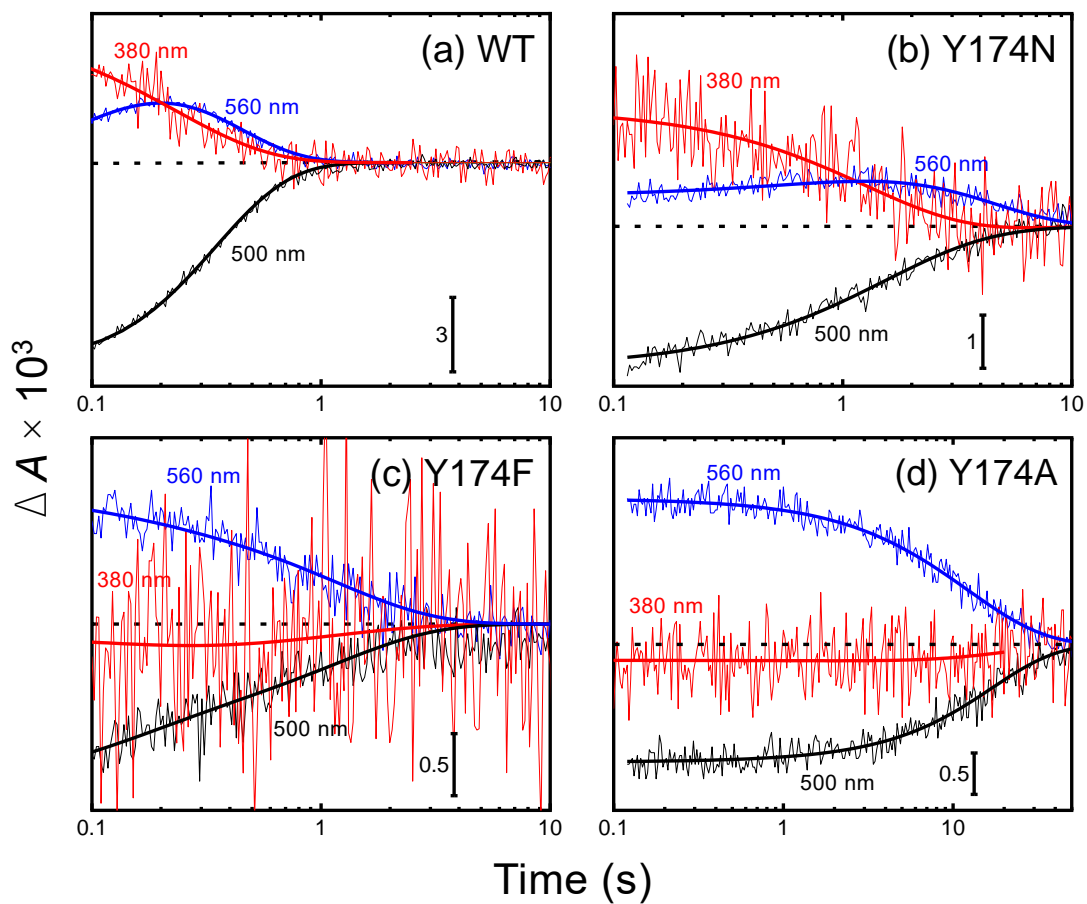


図 3-2-3 *NpHtrII* と複合体を形成する (a) WT、(b) Y174N^{NpSRII}、(c) Y174F^{NpSRII}、(d) Y174A^{NpSRII} 変異体のフラッシュフォトリスデータ

各サンプルにおける光励起後の経時的吸収変化を 380 (赤線)、500 (黒線) および 560 (青線) nm で測定した。測定は、pH 7.0 に調整した 4 M NaCl および 50 mM Tris-HCl 緩衝剤を含む溶液中で実施した (30 °C)。

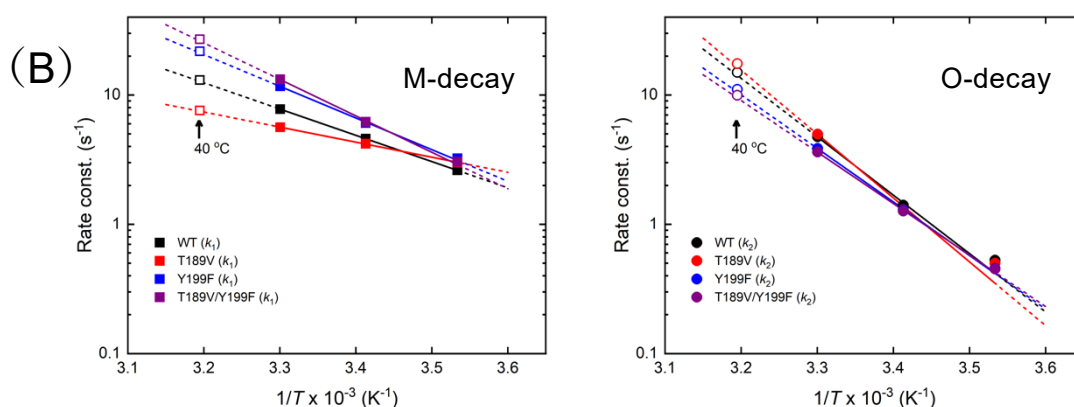
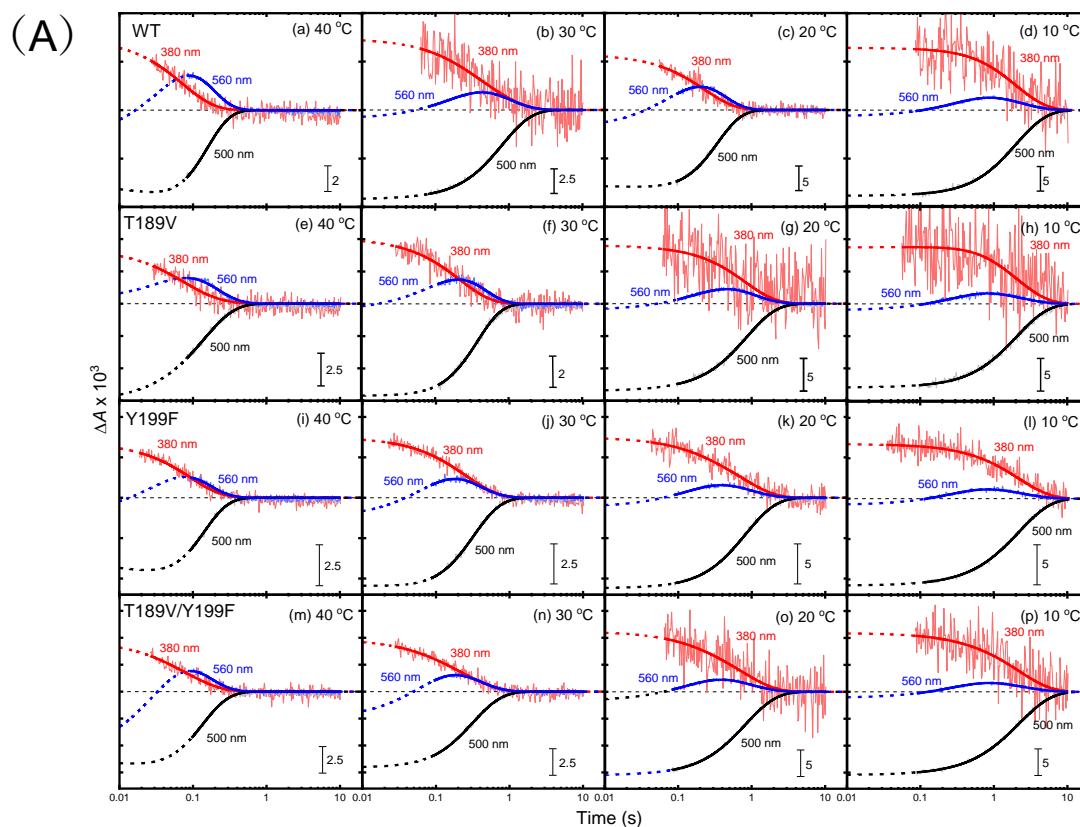


図 3-2-4 野生型 $NpSRII-NpHtrII$ と $T189V^{NpSRII}$ 、 $Y199F^{NpSRII}$ および $T189V^{NpSRII}/Y199F^{NpSRII}$ 変異体- $NpHtrII$ 複合体におけるフォトサイクルの温度依存性

(A) 10、20、30、40 °Cの温度条件下におけるフラッシュフォトリスデータの温度依存性。(B) MおよびO中間体の崩壊速度定数のアレニウス・プロット。40 °Cにおける崩壊速度定数の数値は、10–30 °Cのデータに対して、アレニウスの式 ($k=A \cdot \exp(-E_a/RT)$ 、 A は頻度因子、 E_a は活性化エネルギーを表す) を用いたフィッティングを行い、その回帰直線の外挿から値を予測した。速度論的解析によって求めた値 (黒塗りのプロット) と区別するために、これらのプロットは白抜きのプロットとして表示した。

	k_1 (M-decay)				k_2 (O-decay)			
	WT	T189V	Y199F	T189V/Y199F	WT	T189V	Y199F	T189V/Y199F
E_a (kJ/mol)	38.9	22.3	46.9	54.0	86.5	94.6	79.3	76.3
ΔH (kJ/mol)	36.4	20.0	43.3	49.8	75.8	79.3	73.7	71.7
ΔS (J/mol · K)	-107.9	-164.6	-81.6	-59.5	17.6	29.4	9.2	2.1
$\Delta\Delta H$ (kJ/mol)		-16.4	6.9	13.4		3.5	-2.1	-4.1
$\Delta\Delta S$ (J/mol · K)		-56.7	26.3	48.4		11.8	-8.4	-15.5

表 3-2-1 野生型および T189V^{NpSRII}、Y199F^{NpSRII}、T189V^{NpSRII}/Y199F^{NpSRII} 変異体-NpHtrII 複合体における M 中間体崩壊と O 中間体崩壊過程での各種熱力学パラメータ

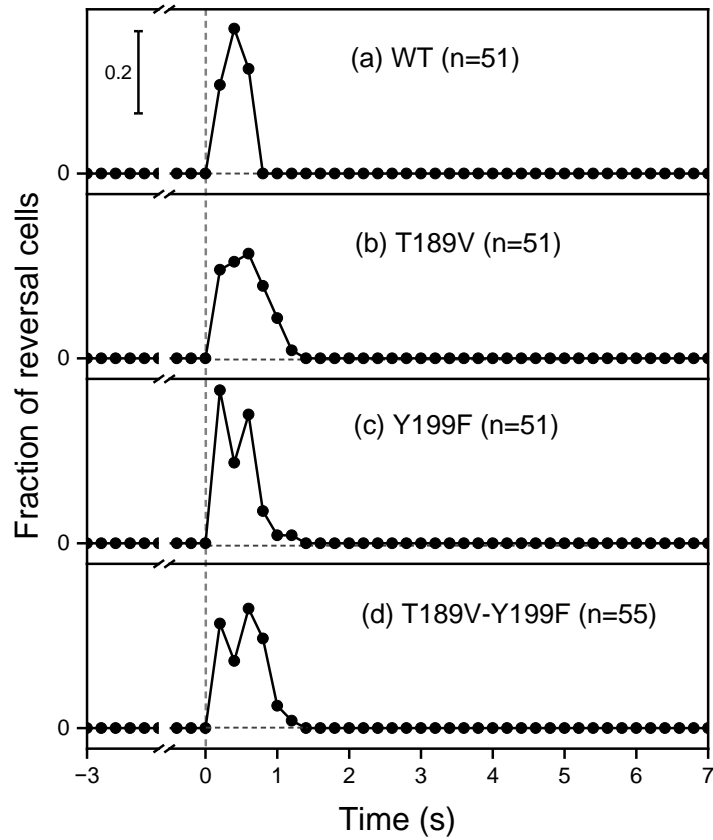


図 3-2-5 野生型 $NpSRII-NpHtrII$ (a) と $T189V^{NpSRII}$ (b)、 $Y199F^{NpSRII}$ (c)、 $T189V^{NpSRII}/Y199F^{NpSRII}$ (d) $-NpHtrII$ 発現細胞の光刺激による反転応答グラフの説明は、図 3-2-2 に準ずる。

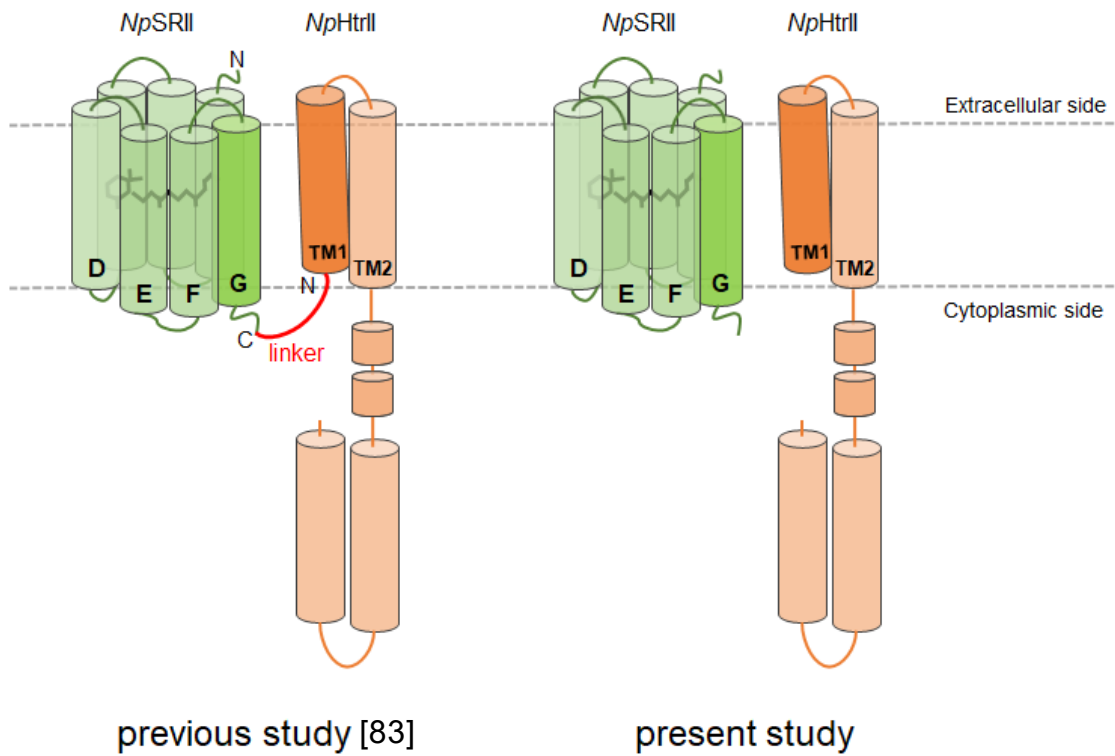


図 3-2-6 以前の研究と本研究における *NpSRII-NpHtrII* 発現系の違い

以前の研究では、*NpSRII* の C 末端と *NpHtrII* の N 末端を Ala-Ser-Ala-Ser-Asn-Gly-Ala-Ser-Ala の 9 アミノ酸から成るフレキシブルリンカー[96]を用いて繋いでいる（左図）のに対し、本研究では自然界に存在する状態に近い分離型の状態（右図）で両者を発現させている。

第4章 研究総括

本研究によって得られた知見を以下にまとめる。

1. 高度好塩菌 *H. salinarum* 由来の *HsSRII-HsHtrII* 複合体における情報伝達において、以前に提唱された *SRII-HtrII* 間でのシグナル伝達の本質的分子機構として捉えられている MST モデルは成立しないことを明らかにした。それは以下の結果より示される。(3章1節)
 - a. *NpSRII* の Thr204^{*NpSRII*} に対応する極性残基 Ser201^{*HsSRII*} を親水性、疎水性問わず様々なアミノ酸に置換しても光反転応答は消失しない。
 - b. *NpSRII* の Tyr174^{*NpSRII*} に対応する Tyr171^{*HsSRII*} を Phe や Val、Asn などのアミノ酸残基に置換しても光反転応答能は失われない。しかし、光反転応答の遅延やシグナリング中間体 (M および O 中間体) の崩壊速度の減少を引き起こすなど、シグナリング状態の時間的調節には関与している可能性があり、単に主要残基 (Thr204^{*NpSRII*} の位置の残基) の水素結合パートナーとしての役割以上の役割をもつ残基であると考えられる。
2. 高度好塩好アルカリ性菌 *N. pharaonis* の *NpSRII-NpHtrII* 複合体を生理条件に近い分離型の表現型として細胞に発現させた場合は、MST モデルは成立しないことを明らかにした。(3章2節)
3. *NpHtrII* との相互作用形成に重要だと考えられている Thr189^{*NpSRII*} および Tyr199^{*NpSRII*} のどちらかもしくは両方を相互作用が消失する残基へと置換しても光反転応答能は失われないことを明らかにした。(3章2節)

本研究では異なる好塩菌種由来の2つの *SRII-HtrII* 複合体発現系を用いた解析により、シグナリングに重要な因子の解明を目指した。2つの実験を通じて得られた共通の見解としては、*SRII-HtrII* 間のシグナル伝達の分子機構を説明するために過去に構築された MST モデルは、リンカー接続体としての発現系という限定された条件下でのみ成立するものであり、自然界ではそれとは別の分子機構によってシグナリングが行われているということである。その分子機構の全容は未だ見えてこないが、本研究の結果から、発色団レチナールの結合ポケット内に位置する Tyr 残基 (Tyr171^{*HsSRII*} または Tyr174^{*NpSRII*}) が重要な役割の一端を担っている可能性を見出した。この位置の Tyr 残基は微生物型ロドプシン間で高度に保存されており、レチナール結合部位周辺に位置することから、各々のロドプシンの機能において重要な残基であることが予測される。実際、光駆動プロトンポンプである BR では、この位置のアミノ酸置換 (Y185F^{BR}) は、発色団レチナールの異性体組成に影響を及ぼし[107,108]、更にプロトンポンプ活性も低下させることが報告されている[109]。本論文

では詳細について触れないが、筆者は光センサーである *HsSRII* においても Y171F^{*HsSRII*} 置換により、発色団レチナールの異性体組成が変わることを予備的な実験で突き止めている。また、同置換体は PSB のカウンターイオンである Asp73^{*HsSRII*} の基底状態における pKa を上昇させることで、シグナリング中間体の 1 つと考えられている M 中間体の形成量にも影響を与えることを見出している（データは示さない）。それらの結果に加えて、筆者は Y171F^{*HsSRII*} における光反転応答の活性が野生型よりも低下することを定性的に見出している。これについては、今後、定量的な検討が必要であるが、筆者が見出したこれらの知見は、F ヘリックス上に高度に保存された Tyr 残基の光センサー型ロドプシンの機能における具体的役割について初めて言及するものであり、大変意義深い。今後、更なる研究により、この Tyr 残基のもつ役割が詳細に明らかになることを期待したい。

冒頭でも触れた通り、微生物型ロドプシンはその利便性から、BR を中心に膜タンパク質の分子機構を理解するための有益なモデル系として多くの有意義な知見をもたらしてきた。微生物型ロドプシンと同様の 7 回膜貫通型構造をとる GPCR は、創薬ターゲットとして重要なタンパク質であるが、その分子機構の解析は未だ発展途上である。GPCR と構造的特徴ならびに活性化状態での構造変化という点で多くの類似点を共有する SRII は、シグナル伝達の普遍的分子機構の解明や新たな解析系確立のためのキーパーソンとなり得るかもしれない。本研究で得られた SRII-HtrII 間のシグナル伝達に関与するアミノ酸残基についての知見を足掛かりに今後、異種タンパク質間のシグナル伝達の分子機構の理解が進むことを期待したい。

参考文献

1. Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Rev. Drug Discov.* 2017; **16**: 829–842.
2. Spudich, J. L. The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends Microbiol.* 2006; **14**: 480–487.
3. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 2000; **289**: 739–745.
4. Falke, J. J., Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A., Danielson, M. A. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; **13**: 457–512.
5. Rudolph, J., Oesterhelt, D. Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.* 1995; **14**: 667–673.
6. Hildebrand, E., Dencher, N. Two photosystems controlling behavioural responses of *Halobacterium halobium*. *Nature.* 1975; **257**: 46–48.
7. Spudich, J. L., Yang, C.-S., Jung, K.-H., Spudich, E. N. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000; **16**: 365–392.
8. Ernst, O. P., Lodowski, D. T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L. S., Kandori, H. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem. Rev.* 2014; **114**: 126–163.
9. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., Kobilka, B. K. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature.* 2011; **477**: 549–555.
10. Shihoya, W., Nishizawa, T., Okuta, A., Tani, K., Dohmae, N., Fujiyoshi, Y., Nureki, O., Doi T. Activation mechanism of endothelin ET_B receptor by endothelin-1. *Nature.* 2016; **537**: 363–

11. Sanchez-Reyes, O. B., Zilberg, G., McCorvy, J. D., Wacker, D. Molecular insights into GPCR mechanisms for drugs of abuse. *J. Biol. Chem.* 2023; **299**: 105176.
12. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol.* 1971; **233**: 149–152.
13. Henderson, R., Unwin, P. N. T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature.* 1975; **257**: 28–32.
14. Matsuno-Yagi, A., Mukohata, Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977; **78**: 237–243.
15. Mukohata, Y., Ihara, K., Tamura, T., Sugiyama, Y. Halobacterial rhodopsins. *J. Biochem.* 1999; **125**: 649–657.
16. Váró, G. Analogies between halorhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; **1460**: 220–229.
17. Bogomolni, R. A., Spudich, J. L. Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982; **79**: 6250–6254.
18. Hazemoto, N., Kamo, N., Terayama, Y., Kobatake, Y., Tsuda, M. Photochemistry of 2 rhodopsinlike pigments in bacteriorhodopsin-free mutant of *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* 1983; **44**: 59–64.
19. Spudich, J. L., Bogomolni, R. A. Mechanism of color discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature.* 1984; **312**: 509–513.
20. Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N., Kobatake, Y. A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1985; **28**: 161–164.
21. Tomioka, H., Takahashi, T., Kamo, N., Kobatake, Y. Flash spectrophotometric identification of a fourth rhodopsin-like pigment in *Halobacterium halobium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; **39**: 389–395.
22. Wolff, E. K, Bogomolni, R. A, Scherrer, P, Hess, B, Stoeckenius, W. Color discrimination in

- halobacteria: spectroscopic characterization of a second sensory receptor covering the blue-green region of the spectrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; **83**: 7272–7276.
23. Spudich, E. N, Sundberg, S. A, Manor, D, Spudich, J. L. Properties of a second sensory receptor protein in *Halobacterium halobium* phototaxis. *Proteins*. 1986; **1**: 239–246.
 24. Kandori, H. Ion-pumping microbial rhodopsins. *Front. Mol. Biosci*. 2015; **2**: 52.
 25. Sasaki, J., Spudich, J. L. Proton transport by sensory rhodopsins and its modulation by transducer-binding. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000; **1460**: 230–239.
 26. Shen, Y., Safinya, C. R., Liang, K. S., Ruppert, A. F., Rothschild, K. J. Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140 °C in two-dimensional films. *Nature*. 1993; **366**: 48–50.
 27. Lukashov, E. P., Robertson, B. Bacteriorhodopsin retains its light-induced proton-pumping function after being heated to 140 °C. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1995; **37**: 157–160.
 28. Luecke, H. Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000; **1460**: 133–156.
 29. Lanyi, J. K. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol*. 2004; **66**: 665–688.
 30. Morgan, J. E., Gennis, R. B., Maeda, A. A role for internal water molecules in proton affinity changes in the Schiff base and Asp85 for one-way proton transfer in bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol*. 2008; **84**: 1038–1045.
 31. Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., Arima, T., Yamashita, A., Kobayashi, J., Hosaka, T., Mizohata, E., Nogly, P., Sugahara, M., Nam, D., Nomura, T., Shimamura, T., Im, D., Fujiwara, T., Yamanaka, Y., Jeon, B., Nishizawa, T., Oda, K., Fukuda, M., Andersson, R., Båth, P., Dods, R., Davidsson, J., Matsuoka, S., Kawatake, S., Murata, M., Nureki, O., Owada, S., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Schertler, G., Yabashi, M., Bondar, A.-N., Standfuss, J., Neutze, R., Iwata, S. A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science*. 2016; **354**: 1552–1557.
 32. Belrhali, H., Nollert, P., Royant, A., Menzel, C., Rosenbusch, J. P., Landau, E. M., Pebay-Peyroula, E. Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution. *Structure*. 1999; **7**: 909–917.

33. Lanyi, J. K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; **1757**: 1012–1018.
34. Seidel, R., Scharf, B., Gautel, M., Kleine, K., Oesterhelt, D., Engelhard, M. The primary structure of sensory rhodopsin II: a member of an additional retinal protein subgroup is coexpressed with its transducer, the halobacterial transducer of rhodopsin II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; **92**: 3036–3040.
35. Zhang, W., Brooun, A., Müller, M. M., Alam, M. The primary structures of the Archaeon *Halobacterium salinarium* blue light receptor sensory rhodopsin II and its transducer, a methyl-accepting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; **93**: 8230–8235.
36. Yao, V. J., Spudich, E. N., Spudich, J. L. Identification of distinct domains for signaling and receptor interaction of the sensory rhodopsin I transducer, HtrI. *J. Bacteriol.* 1994; **176**: 6931–6935.
37. Perazzona, B., Spudich, E. N., Spudich, J. L. Deletion mapping of the sites on the HtrI transducer for sensory rhodopsin I interaction. *J. Bacteriol.* 1996; **178**: 6475–6478.
38. Spudich, E. N., Zhang, W., Alam, M., Spudich, J. L. Constitutive signaling by the phototaxis receptor sensory rhodopsin II from disruption of its protonated Schiff base-Asp-73 interhelical salt bridge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; **94**: 4960–4965.
39. Scharf, B, Hess, B, Engelhard, M. Chromophore of sensory rhodopsin II from *Halobacterium halobium*. *Biochemistry.* 1992; **31**: 12486–12492.
40. Shichida, Y., Imamoto, Y., Yoshizawa, T., Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N., Kobatake, Y. Low-temperature spectrophotometry of phoborhodopsin. *FEBS Lett.* 1988; **236**: 333–336.
41. Imamoto, Y., Shichida, Y., Yoshizawa, T., Tomioka, H., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kamo, N., Kobatake, Y. 1991. Photoreaction cycle of phoborhodopsin studied by low-temperature spectrophotometry. *Biochemistry.* 1991; **30**: 7416–7424.
42. Spudich, E. N., Takahashi, T., Spudich, J. L. Sensory rhodopsins I and II modulate a methylation/demethylation system in *Halobacterium halobium* phototaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; **86**: 7746–7750.
43. Yan, B., Takahashi, T., Johnson, R., Spudich, J. L. Identification of signaling states of a sensory receptor by modulation of lifetimes of stimulus-induced conformations: the case of sensory rhodopsin II. *Biochemistry.* 1991; **30**: 10686–10692.

44. Scharf, B., Pevec, B., Hess, B., Engelhard, M. Biochemical and photochemical properties of the photophobic receptors from *Halobacterium halobium* and *Natronobacterium pharaonis*. *Eur. J. Biochem.* 1992; **206**: 359–366.
45. Bivin, D. B., Stoeckenius, W. Photoactive retinal pigments in haloalkaliphilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1986; **132**: 2167–2177.
46. Hirayama, J., Imamoto, Y., Shichida, Y., Kamo, N., Tomioka, H., Yoshizawa, T. Photocycle of phoborhodopsin from haloalkaliphilic bacterium (*Natronobacterium pharaonis*) studied by low-temperature spectrophotometry. *Biochemistry.* 1992; **31**: 2093–2098.
47. Imamoto, Y., Shichida, Y., Hirayama, J., Tomioka, H., Kamo, N., Yoshizawa, T. Chromophore configuration of *pharaonis* phoborhodopsin and its isomerization on photon absorption. *Biochemistry.* 1992; **31**: 2523–2528.
48. Imamoto, Y., Shichida, Y., Hirayama, J., Tomioka, H., Kamo, N., Yoshizawa, T. Nanosecond laser photolysis of phoborhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: appearance of KL and L intermediates in the photocycle at room temperature. *Photochem. Photobiol.* 1992; **56**: 1129–1134.
49. Miyazaki, M., Hirayama, J., Hayakawa, M., Kamo, N. Flash photolysis study on *pharaonis* phoborhodopsin from a haloalkaliphilic bacterium (*Natronobacterium pharaonis*) . *Biochim. Biophys. Acta.* 1992; **1140**: 22–29.
50. Hirayama, J., Imamoto, Y., Shichida, Y., Yoshizawa, T., Asato, A. E., Liu, R. S. H., Kamo, N. Shape of the chromophore binding site in *pharaonis* phoborhodopsin from a study using retinal analogs. *Photochem. Photobiol.* 1994; **60**: 388–393.
51. Hirayama, J., Kamo, N., Imamoto, Y., Shichida, Y., Yoshizawa, T. Reason for the lack of light-dark adaptation in *pharaonis* phoborhodopsin: reconstitution with 13-*cis*-retinal. *FEBS Lett.* 1995; **364**: 168–170.
52. Chizhov, I., Schmies, G., Seidel, R., Sydor, J. R., Lüttenberg, B., Engelhard, M. The photophobic receptor from *Natronobacterium pharaonis*: temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II. *Biophys. J.* 1998; **75**: 999–1009.
53. Shimono, K., Iwamoto, M., Sumi, M., Kamo, N. Functional expression of *pharaonis* phoborhodopsin in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1997; **420**: 54–56.

54. Luecke, H., Schobert, B., Lanyi, J. K., Spudich, E. N., Spudich, J. L. Crystal Structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: Insights into color tuning and transducer interaction. *Science*. 2001; **293**: 1499–1503.
55. Royant, A., Nollert, P., Edmani, K., Neutze, R., Landau, E. M., Pebay-Peyroula, E., Navarro, J. X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; **98**: 10131–10136.
56. Balashov, S. P., Sumi, M., Kamo, N. The M intermediate of *Pharaonis* phoborhodopsin is photoactive. *Biophys. J.* 2000; **78**: 3150–3159.
57. Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K., Sumi, M., Kamo, N. Photo-induced proton transport of *pharaonis* phoborhodopsin (sensory rhodopsin II) is ceased by association with the transducer. *Biophys. J.* 2001; **80**: 916–922.
58. Schmies, G., Engelhard, M., Wood, P. G., Nagel, G., Bamberg, E. Electrophysiological characterization of specific interactions between bacterial sensory rhodopsins and their transducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; **98**: 1555–1559.
59. Iwamoto, M., Shimono, K., Sumi, M., Kamo, N. Positioning proton-donating residues to the Schiff-base accelerates the M-decay of *pharaonis* phoborhodopsin expressed in *Escherichia Coli*. *Biophys. Chem.* 1999; **79**: 187–192.
60. Spudich, J. L., Luecke, H. Sensory rhodopsin II: Functional insights from structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002; **12**: 540–546.
61. Wegener, A. A., Chizhov, I., Engelhard, M., Steinhoff, H. J. Time-resolved detection of transient movement of helix F in spin-labelled *pharaonis* sensory rhodopsin II. *J. Mol. Biol.* 2000; **301**: 881–891.
62. Wegener, A. A., Klare, J. P., Engelhard, M., Steinhoff, H. J. Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J.* 2001; **20**: 5312–5319.
63. Klare, J.P., Bordignon, E., Engelhard, M., Steinhoff, H. J. Sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin: light activated helix F movement. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; **3**: 543–547.
64. Bordignon, E., Klare, J. P., Holterhues, J., Martell, S., Krasnaberski, A., Engelhard, M., Steinhoff, H. J. Analysis of light-induced conformational changes of *Natronomonas pharaonis*

- sensory rhodopsin II by time resolved electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 2007; **83**: 263–272.
65. Taniguchi, Y., Ikehara, T., Kamo, N., Watanabe, Y., Yamasaki, H., Toyoshima, Y. Application of fluorescence resonance energy transfer (FRET) to investigation of light-induced conformational changes of the phoborhodopsin / transducer complex. *Photochem. Photobiol.* 2007; **83**: 311–316.
 66. Taniguchi, Y., Ikehara, T., Kamo, N., Yamasaki, H., Toyoshima, Y. Dynamics of light-induced conformational changes of the phoborhodopsin/transducer complex formed in the *n*-dodecyl β -D-maltoside micelle. *Biochemistry.* 2007; **46**: 5349–5357.
 67. Yoshida, H., Sudo, Y., Shimono, K., Iwamoto, M., Kamo, N. Transient movement of helix F revealed by photo-induced inactivation by reaction of a bulky SH-reagent to cysteine-introduced *pharaonis* phoborhodopsin (sensory rhodopsin II) . *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; **3**: 537–542.
 68. Rink, T., Pfeiffer, M., Oesterhelt, D., Gerwert, K., Steinhoff, H J. Unraveling photoexcited conformational changes of bacteriorhodopsin by time resolved electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biophys. J.* 2000; **78**: 1519–1530.
 69. Rudolph, J., Nordmann, B., Storch, K. F., Gruenberg, H., Rodewald, K., Oesterhelt, D. A family of halobacterial transducer proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996; **139**: 161–168.
 70. Klare, J. P., Gordeliy, V. I., Labahn, J., Büldt, G., Steinhoff, H. J., Engelhard, M. The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer. *FEBS Lett.* 2004; **564**: 219–224.
 71. Baker, M. D., Wolanin, P. M., Stock, J. B. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays.* 2006; **28**: 9–22.
 72. Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N., Coles, M. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell.* 2006; **126**: 929–940.
 73. Orekhov, P. S., Klose, D., Mulikidjanian, A. Y., Shaitan, K. V., Engelhard, M., Klare, J. P., Steinhoff, H.-J. Signaling and adaptation modulate the dynamics of the photosensory complex of *Natronomonas pharaonis*. *PLoS Comput. Biol.* 2015; **11**: e1004561.
 74. Yang, C. S., Spudich, J. L. Light-induced structural changes occur in the transmembrane helices

- of the *Natronobacterium pharaonis* HtrII transducer. *Biochemistry*. 2001; **40**: 14207–14214.
75. Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K., Kamo, N. *Pharaonis* phoborhodopsin binds to its cognate truncated transducer even in the presence of a detergent with a 1:1 stoichiometry. *Photochem. Photobiol.* 2001; **74**: 489–494.
76. Gordeliy, V. I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Büldt, G., Savopol, T., Scheidig, A. J., Klare, J. P., Engelhard, M. Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II–transducer complex. *Nature*. 2002; **419**: 484–487.
77. Moe, G. R., Bollag, G. E., Koshland, Jr. D. E. Transmembrane signaling by a chimera of the *Escherichia coli* aspartate receptor and the human insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989; **86**: 5683–5687.
78. Chiu, S. L., Cline, H. T. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev.* 2010; **5**: 7.
79. Sudo, Y., Yamabi, M., Kato, S., Hasegawa, C., Iwamoto, M., Shimono, K., Kamo, N. Importance of specific hydrogen bonds of archaeal rhodopsins for the binding to the transducer protein. *J. Mol. Biol.* 2006; **357**: 1274–1282.
80. Sudo, Y., Furutani, Y., Wada, A., Ito, M., Kamo, N., Kandori, H. Steric constraint in the primary photoproduct of an archaeal rhodopsin from regiospecific perturbation of C-D stretching vibration of the retinyl chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; **127**: 16036–16037.
81. Furutani, Y., Sudo, Y., Kamo, N., Kandori, H. FTIR spectroscopy of the complex between *pharaonis* phoborhodopsin and its transducer protein. *Biochemistry* 2003; **42**: 4837–4842.
82. Sudo, Y., Furutani, Y., Shimono, K., Kamo, N., Kandori, H. Hydrogen bonding alteration of Thr-204 in the complex between *pharaonis* phoborhodopsin and its transducer protein. *Biochemistry*. 2003; **42**: 14166–14172.
83. Sudo, Y., Furutani, Y., Kandori, H., Spudich, J. L. Functional Importance of the interhelical hydrogen bond between Thr204 and Tyr174 of sensory rhodopsin II and its alteration during the signaling process. *J. Biol. Chem.* 2006; **281**: 34239–34245.
84. Sasaki, J., Spudich, J. L. Signal transfer in haloarchaeal sensory rhodopsin–transducer complexes. *Photochem. Photobiol.* 2008; **84**: 863–868.

85. Sudo, Y., Spudich, J. L. Three strategically placed hydrogen-bonding residues convert a proton pump into a sensory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; **103**: 16129–16134.
86. Ito, M., Sudo, Y., Furutani, Y., Okitsu, T., Wada, A., Homma, M., Spudich, J. L., Kandori, H. Steric constraint in the primary photoproduct of sensory rhodopsin II is a prerequisite for light-signal transfer to HtrII. *Biochemistry*. 2008; **47**: 6208–6215.
87. Matsunami-Nakamura, R., Tamogami, J., Takeguchi, M., Ishikawa, J., Kikukawa, T., Kamo, N., Nara, T. Key determinants for signaling in the sensory rhodopsin II/transducer complex are different between *Halobacterium salinarum* and *Natronomonas pharaonis*. *FEBS Lett*. 2023; **597**: 2334–2344.
88. Matsunami-Nakamura, R., Tamogami, J., Ishikawa, J., Kamo, N., Nara, T. Phototaxis study of mutant SRII and HtrII from *Natronomonas pharaonis* separately expressed in archaeal cell Pho81wr-. in preparation.
89. Oesterhelt, D., Meentzen, M., Schuhmann, L. Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-*cis* and all-*trans*-retinal as its chromophores. *Eur. J. Biochem*. 1973; **40**: 453–463.
90. Jung, K.-H., Spudich, E. N., Trivedi, V. D., Spudich, J. L. An archaeal photosignal-transducing module mediates phototaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 2001; **183**: 6365–6371.
91. Sato, M., Kikukawa, T., Araiso, T., Okita, H., Shimono, K., Kamo, N., Demura, M., Nitta, K. Roles of Ser130 and Thr126 in chloride binding and photocycle of *pharaonis* halorhodopsin. *J. Biochem*. 2003; **134**: 151–158.
92. Sasaki, J., Spudich, J. L. The transducer protein HtrII modulates the lifetimes of sensory rhodopsin II photointermediates. *Biophys. J*. 1998; **75**: 2435–2440.
93. Dai, G., Zhang, Y., Tamogami, J., Demura, M., Kamo, N., Kandori, H., Iwasa, T. An amino acid residue (S201) in the retinal binding pocket regulates the photoreaction pathway of phoborhodopsin. *Biochemistry*. 2011; **50**: 7177–7183.
94. Sato, Y., Hata, M., Neya, S., Hoshino, T. Computational analysis of the transient movement of helices in sensory rhodopsin II. *Protein Sci*. 2005; **14**: 183–192.
95. Hashimoto, S., Obata, K., Takeuchi, H., Needleman, R., Lanyi, J. K. Ultraviolet resonance Raman spectra of Trp-182 and Trp-189 in bacteriorhodopsin: novel information on the structure of Trp-182 and its steric interaction with retinal. *Biochemistry*. 1997; **36**: 11583–11590.

96. Sasaki, J., Nara, T., Spudich, E. N., Spudich, J. L. Constitutive activity in chimeras and deletions localize sensory rhodopsin II/HtrII signal relay to the membrane-inserted domain. *Mol. Microbiol.* 2007; **66**: 1321–1330.
97. Tamogami, J., Kikukawa, T., Ikeda, Y., Demura, M., Nara, T., Kamo, N. Photo-induced bleaching of sensory rhodopsin II (phoborhodopsin) from *Halobacterium salinarum* by hydroxylamine: identification of the responsible intermediates. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2012; **106**: 87–94.
98. Kopp, J., Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Res.* 2004; **32**: D230–D234.
99. Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 2009; **37**: D387–D392.
100. Inoue, K., Sasaki, J., Spudich, J. L., Terazima, M. Laser-induced transient grating analysis of dynamics of interaction between sensory rhodopsin II D75N and the HtrII transducer. *Biophys. J.* 2007; **92**: 2028–2040.
101. Chen, X., Spudich, J. L. Demonstration of 2:2 stoichiometry in the functional SRI-HtrI signaling complex in *Halobacterium* membranes by gene fusion analysis. *Biochemistry.* 2002; **41**: 3891–3896.
102. Trivedi, V. D., Spudich, J. L. Photostimulation of a sensory rhodopsin II/HtrII/Tsr fusion chimera activates CheA-autophosphorylation and CheY-phosphotransfer *in vitro*. *Biochemistry.* 2003; **42**: 13887–13892.
103. Takao, K., Kikukawa, T., Arais, T., Kamo, N. Azide accelerates the decay of M-intermediate of *pharaonis* phoborhodopsin. *Biophys. Chem.* 1998; **73**: 145–153.
104. Tatsuno, I., Homma, M., Oosawa, K., Kawagishi, I. Signaling by the *Escherichia coli* aspartate chemoreceptor Tar with a single cytoplasmic domain per dimer. *Science.* 1996; **274**: 423–425.
105. Orban-Glaß, I., Voskoboynikova, N., Busch, K. B., Klose, D., Rickert, C., Mosslehy, W., Roder, F., Wilkens, V., Piehler, J., Engelhard, M., Steinhoff, H. J., Klare, J. P. Clustering and Dynamics of Phototransducer Signaling Domains Revealed by Site-Directed Spin Labeling Electron Paramagnetic Resonance on SRII/HtrII in Membranes and Nanodiscs. *Biochemistry.* 2015; **54**: 349–362.

106. Ryzhykau, Y. L., Orekhov, P. S., Rulev, M. I., Vlasov, A. V., Melnikov, I. A., Volkov, D. A., Nikolaev, M. Y., Zabelskii, D. V., Murugova, T. N., Chupin, V. V., Rogachev, A. V., Gruzinov, A. Y., Svergun, D. I., Brennich, M. E., Gushchin, I. Y., Soler-Lopez, M., Bothe, A., Büldt, G., Leonard, G., Engelhard, M., Kuklin, A. I., Gordeliy, V. I. Molecular model of a sensor of two-component signaling system. *Sci. Rep.* 2021; **11**: 10774.
107. Duñach, M., Marti, T., Khorana, H. G., Rothschild, K. J. UV-visible spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: Substitution of Arg-82, Asp-85, Tyr-185, and Asp-212 results in abnormal light-dark adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; **87**: 9873–9877.
108. Song, L., Yang, D., El-Sayed, M. A., Lanyi, J. K. Retinal isomer composition in some bacteriorhodopsin mutants under light and dark adaptation condition. *J. Phys. Chem.* 1995; **99**: 10052–10055.
109. Ding, X., Sun, C., Cui, H., Chen, S., Gao, Y., Yang, Y., Wang, J., He, X., Iuga, D., Tian, F., Watts, A., Zhao, X. Functional roles of tyrosine 185 during the bacteriorhodopsin photocycle as revealed by *in situ* spectroscopic studies. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2018; **1859**: 1006–1014.

謝辞

本研究は2016年4月から2021年3月まで松山大学大学院医療薬学研究科生物物理化学研究室において行ったものである。

研究に費やす時間が絶対的に少ないにも関わらず、社会人入学という状況を許容していただき、また、本研究の遂行にあたり、指導教員として多大なご指導ご鞭撻を賜りました松山大学大学院医療薬学研究科生物物理化学分野奈良敏文准教授に深謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、主査として適切なお助言やご指導を賜りました松山大学大学院医療薬学研究科薬理学分野中島光業教授、ならびに副査としてきめ細かくご指導して下さいました松山大学大学院医療薬学研究科衛生薬学分野田邊知孝准教授には、感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、終始適切なお助言と丁寧なご指導を下された松山大学大学院医療薬学研究科生物物理化学分野田母神淳准教授に感謝申し上げます。

また、共同研究者としてフラッシュフォトリシスによる分析をご教授いただきました北海道大学大学院先端生命科学研究院菊川峰志博士には、心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご多忙にも関わらず快くディスカッションに応じ、細部に渡るご助言を下された松山大学大学院医療薬学研究科加茂直樹前教授に誠意の意を表します。

更に、投稿論文をまとめるにあたって、ご協力を頂きました松山大学薬学部生物物理化学研究室の石川隼也学士ならびに竹口未来氏に御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり多大なご協力を頂きました松山大学薬学部生物物理化学研究室に所属する皆様には心より感謝申し上げます。

最後に、学位取得へ挑戦する機会を快く了承し、常に支えとなってくれた家族に心より感謝いたします。

2024年 3月

中村 梨佐