JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	Halobacterium sp.aus-1株のpR様タンパク質の遺伝子のクローニングと塩基配列の決定
Author(s)	蓑輪，尚実
Citation	
Issue Date	1999-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2592
Rights	
Description	Supervisor:高橋 哲郎，材料科学研究科，修士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

Halobacterium sp. aus-１株の pR 様タンパク質の遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

蓑輪 尚実　(高橋研究室)

オーストラリアで採取された新種の好塩菌 aus-1 株には、アーキロドプシン (aR) 、センサリーロドプシン (sR) と呼ばれる 2 種類のロドプシン様タンパク質の存在が確認されている。この株が持つ aR をコードする DNA 塩基配列はイスラエルで採取された好塩菌 SG1 株のバクテリオロドプシン (SG1BR) のものと全く同じであり、aus-1 株と SG1 株、双方あわせて確認されていない古細菌ロドプシン類は、唯一フォボロドプシン (pR) だけである。

pR は種間で相同性が乏しい為、相同性を利用して新規の pR 遺伝子をクローニングすることは困難である。しかし光感覚受容体である pR および sR をコードする遺伝子の場合、それぞれの上流には対応するトランスデューサータンパク質 (Htr) の遺伝子が極く近接して存在する。しかも Htr には非常に相同性の高い領域 (HCD) が含まれている。したがって、HCD を指標として Htr の遺伝子を探索すれば、すぐ下流にある光感覚受容体の遺伝子をクローニングできると考えられる。

そこで、本研究ではロドプシン様タンパク質の間で比較的保存されている領域と、HCD のそれぞれに相補的なプライマーを設計し、2 種の遺伝子にまたがった PCR を行うことにより、aus-1 株の pR 遺伝子を探しだし、その塩基配列を決定することを目的とした。

【結果】数回の PCR では、期待していた長さの産物が得られず、目的とする塩基配列は GC 含量の高いことが予想された。そこで数段階に分けてアニール温度の設定をし、さらに deaza dNTP の使用により目的とする産物の増幅が行えた。これをプローブとして Southern Hybridyzation を行い、ゲノム DNA から、光感覚受容体の全長をコードする DNA 断片を得、その塩基配列を決定した。

この遺伝子の読み枠は 250 残基からなるタンパク質をコードしており、上流の Htr の読み枠と「G」1 塩基を挟んで隣接していた。Hydropathy prot からは、このタンパク質が７本の膜貫通ヘリックスをもつことがわかる。すでに知られている 3 種類の pR と比較してみると、今回得られた塩基配列の GC 含量は 72.6 %とどの pR のものよりも高かった。また、既知の古細菌ロドプシン類のアミノ酸配列との相同性は pR に対しては 37 %から 49 %あり、sR や bR に対しては 30 %以下であった。

【考察】古細菌ロドプシン類では発色団レチナールと接触している部位のアミノ酸残基にそれぞれ相同性が見られる。それらのうち bR で 118 番目の残基に相当するアミノ酸は、pR 以外の古細菌ロドプシン類ではすべて Met となっており、現在までに知られている 3 種類の pR では Val または Thr である。今回得られたアミノ酸配列では、その部位に相当する 118 番目の残基は Val であり、さらに pR 類に特徴的な E ヘリックスの N 末端領域の相同性もみられた。これらから、今回得られた塩基配列は aus-1 の pR をコードするものであると考え、このタンパク質を Aus-1pR と名付けた。このように２つの遺伝子にまたがる PCR で、古細菌の光感覚受容体遺伝子のクローニングが効率良く行えることがわかった。

```
MLVDTTVWAW IGALAMGAGT VPPLWAWLSG
SSATDESHGV YYGTLAGVTG VAALAYLAMA
LGVGTLSTAA GELEVVRYVD WLVTTPLILL
YLGLLARPSR RVLTGLIGVD VVVIAGGVTG
AATGGAVSWA AFAVGGGAYL ALVYGLLVAL
PRSASAEGDR VRAVFGTLRN ITVVLWTLYP
VVRLLAPTGF GLLTSATEML VFVYLDIVSK
VGFVVIAVAG ADALDRLGAD EFAAADSAAE
ERTAALGDD
```

Fig.1 aus-1 pR アミノ酸配列

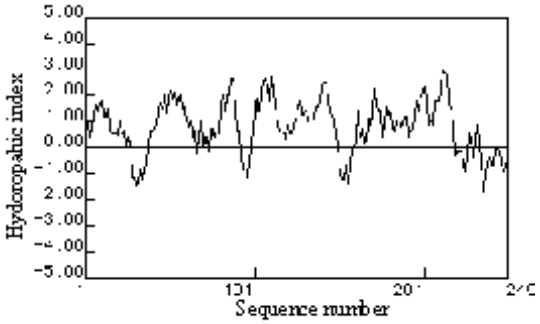

Fig.2 Hydropathy prot

Sugiyama, Y., M.Maeda, M.Futai, and Y.Mukohata., J.Biol.Chem., 264, 20,859-20862, (1989)

中森裕子 1989 年度 北海道大学修士論文

Soppa,J., J.Duschel, and D.Oesterhelt., J.Bacteriol., 175, 2720-2726, (1993)

keywords　**phoborhodopsin、*H.salinarum*、aus-１、PCR、HCD**

Copyright © 1999 by Naomi Minowa