1E1000

レチナル蛋白質のネットフロー反応

○水上 卓, 武森 信暁, 辻本 和雄 (北陸先端大)

レチナル蛋白質の、光反応および熱反応を解析する場合に、そのキネティクスを詳細に調べると、おおくの場合、複数のエクスポネンシャル関数の重ね合わせで表現される。その関数の個数が、実際の反応スキームに依存していることは広く知られているが、実際のデータにあたる際、それらを厳密に決定するのは困難であった。

我々は、特異値分解 (SVD) などのスペクトル解析法を用いてこれらの研究を行ってきたが、今回、実データから得られる反応定数の分布関数を考慮し、それぞれの反応中間体が近傍のステートに分布していることを仮定することによって、これらの現象を説明しようと試みた。

まず、スルメイカから採取した、レチナル光異性化酵素・レチノクロムを用い、液体窒素温度で光平衡状態に至る過程を時間分解の可視吸収スペクトル測定をおこなった。この条件では、Retinochrome, Lumi. X の 3 つの産物が現れる。次に得られたスペクトルデータを SVD して、得られたキネティクスデータを解析した結果、反応定数が 2 つのピークを持つ分布関数で近似できることが解った。

次に 10 個以上のステートを持つ中間体の反応過程を Runge-Kutta 法などによりモデル化し、反応解析を行った。講演では、反応定数の分布状態から、中間体の状態分布を考察する予定である。

Taku Mizukami, Nobuaki Takemori, Kazuo Tsujimoto : Net flow reaction of retinal protein

1E1030

システインの赤外吸収によるロドプシン膜貫通領域の構造変化過程の解析

○山崎 洋一¹、永田 智子¹、寺北 明久^{1,2}、神取 秀樹¹、七田 芳則¹ (¹京大・院理・生物物理、²CREST)

ロドプシンが光を受容してから、G タンパク質・トランスデューシンを活性化する過程で、光情報は、レチナルの異性化に始まり、細胞質側の相互作用部位へ伝わっていく。しかし、円盤膜内腔側表面に近いレチナル結合部位と、細胞質側表面のトランスデューシンとの相互作用部位の間を結ぶ構造変化過程の詳細は依然分かっていない。そこで、本研究では、赤外吸収上に現れるシステイン残基の SH 伸縮振動を指標に、レチナル異性化直後のバソ中間体と活性化型のメタ II 中間体の測定を行い、光受容からトランスデューシン活性化へとつながる膜貫通領域の構造変化過程を解析した。

野生型のシステインをそれぞれセリンに置換した 6 個の変異体の測定の結果、異性化直後はいずれのシステインも変化せず、活性化型で、Cys185 のみが変化した。このことから、活性化型ではヘリックス 4 と 5 のループ部位に構造変化が起こることがわかった。

次に、ヘリックス 3 の膜貫通領域の構造変化を捉えるためにヘリックス 3 にシステインを導入した変異体の測定を行った。その結果、レチナル近傍に存在すると考えられる Ala117、Thr118 は、異性化直後に変化を示し、活性化型でこの変化を減少させた。また膜貫通領域の細胞質側 Glu122 から Gln134 に至る 13 個の変異体では、122 位が異性化直後と活性化型で変化を示し、123 位は活性化型のみで変化を示した。しかし、より細胞質側の部位は異性化直後と活性化型で変化を示さなかった。これらのことから、ヘリックス 3 では、異性化直後に 117、118、122 位の残基部分で構造変化が起き、活性化型では 117、118 位の部位が緩和し、122、123 位に変化が伝わることで、細胞質側膜貫通領域では構造変化が起こされないことが示唆された。

以上のことから、スピラベル法より提唱されている剛体運動モデルの評価も含め、ロドプシンの活性化機構について議論したい。

Y.Yamazaki, T.Nagata, A.Terakita, H.Kandori, Y.Shichida : Structural changes of rhodopsin inner membrane region detected by cysteine SH stretching: An FTIR spectroscopic study.

1E1015

アイオドプシン (ニワトリ赤) 初期中間体の熱的戻り反応とアニオン結合部位及び発色団の構造の相関

○平野 貴弘、今井 啓雄、神取 秀樹、七田 芳則 (京大・院理・生物物理)

脊椎動物の視物質は光受容に伴い発色団の 11-*cis*-retinal が all-*trans*-retinal に光異性化し、バソ中間体 (バソ) を生成する。バソは室温では直ちに次の中間体に遷移するが、77 K では安定で温度の上昇に伴い次の中間体に遷移する。しかし、ニワトリの赤色感受性視物質であるアイオドプシン (iod) は、77 K で生成したバソが温度の上昇により元の状態に戻る (戻り反応)。この反応は発色団の熱異性化を伴うため、特異な発色団-蛋白質相互作用の存在が示唆された。一方 iod はアニオンを結合して吸収波長を変化するが、これは発色団-蛋白質相互作用の変化を表すことから、戻り反応への影響が考えられる。実際、天然の iod (Cl⁻ 型) のアニオンを NO₃⁻ に置換すると (NO₃⁻ 型) 戻り反応を示さない。

そこで我々は戻り反応と発色団及びイオン結合部位の構造との相関を調べるために、上記 2 種に加えイオン非結合型 (free 型) の赤外吸収スペクトルを比較した。その結果、Cl⁻ 型のバソでは発色団の C₁₄ 周辺がねじれた構造をとるが、NO₃⁻ 型と free 型ではねじれていないことがわかった。また、蛋白質内部の水分子がイオン結合部位の構造形成に関わることがわかった。このことから、バソにおいて Cl⁻ 型のねじれた発色団構造が戻り反応を誘起しており、NO₃⁻ 型、free 型ではその構造がないために戻り反応が起こらないと結論した。ところが以前の界面活性剤存在下で行われた実験では、free 型も戻り反応を示すことが報告されている。そこで我々は次に free 型の戻り反応を詳細に検討したところ、free 型の反応はアニオンが結合している場合と異なり試料の環境 (界面活性剤、脂質) に大きく依存することがわかった。蛋白質構造のゆらぎを表す吸収波長の温度依存性を検討した結果とも併せ、発色団及びイオン結合部位の構造とバソの戻り反応、試料の環境の関係について考察する。

T. Hirano, H. Imai, H. Kandori and Y. Shichida : The Structure of the Anion Binding Site and the Chromophore Affect the Thermal Reversion of Bathiodopsin.

1E1045

錐体光受容蛋白質で保存されているプロリン残基の役割とその分子機構

○今井 啓雄、桑山 成樹、平野 貴弘、神取 秀樹、七田 芳則 (京大・院理・生物物理)

脊椎動物の網膜に含まれる視細胞、桿体と錐体は、それぞれ薄明視及び昼間視を担う。その外節に含まれる光受容蛋白質は七回膜貫通型受容体群に属し、視細胞の応答特性に深く関わっていると考えられる。これまで我々は、錐体光受容蛋白質の性質を桿体の光受容蛋白質ロドプシンと比較検討し、視細胞の応答特性との関わりを考察してきた。その結果、(1) 錐体光受容蛋白質が発色団である 11-*cis*-retinal と結合する速度は、ロドプシンよりも数百倍速い (2) 錐体光受容蛋白質のトランスデューシンを活性化する中間体 (メタ II) の寿命は、ロドプシンのメタ II よりも数十倍短い (3) 錐体光受容蛋白質の安定性はロドプシンよりも低いなどの分子特性の差異が明らかになった。このうち、(1)、(2) については、N 末端から 1 2 2 番目に位置するアミノ酸残基がその主要な要因であることを、部位特異的な変異体を用いた解析により示した。この部位は、ロドプシンではグルタミン酸 (E122) が保存されているが、錐体視物質では様々な非解離性残基に置換されていることから、ロドプシンが桿体光受容蛋白質としての性質を示すために必須であると考えられる。しかし、この残基の置換によって両者の性質が完全には入れ替わらないことから、他の残基の存在が示唆される。そこで我々は、既知の全ての錐体光受容蛋白質で保存されているアミノ酸残基を選び出し、その部位特異的な変異体を作製してその性質を検討した。これらのうち、錐体光受容蛋白質の 4、5 番目の膜貫通領域を結ぶ細胞外ループ領域に存在するプロリン残基を置換した変異体は、(2)、(3) の性質に変化を示した。また、赤外分光法によりこの残基は発色団の近傍に位置することが示唆された。これらの結果をもとに、錐体光受容蛋白質の性質を制御する分子機構や、分子進化的意味について考察する。

H. Imai, S. Kuwayama, T. Hirano, H. Kandori and Y. Shichida : Role of Conserved Proline Residue in Cone Visual Pigments.