1P141

ホヤアレスチンは、脊椎動物の visual arrestin と β -arrestin の共通祖先か？

○中川 将司、織井 秀文、堀江 健生、吉田 麗子、津田 基之（姫工大・理）

アレスチンは、リン酸化された活性型受容体に結合して、Gタンパク質との相互作用を阻害することにより、Gタンパク質連関型細胞内シグナル伝達のオフ機構に関わる蛋白質である。脊椎動物には、2つのタイプが知られている。一つは、網膜や松果体の光受容細胞に特異的に発現している visual arrestin で、もう一つは、ubiquitous に発現している β -arrestin (non-visual arrestin) である。後者は、上記の機能の他に、細胞表面から受容体を細胞質内へ移行する internalization 機構に関与することが知られている。

我々は、脊椎動物の祖先型と考えられている脊索動物尾索類のホヤ (*Ciona intestinalis*) から arrestin をコードする cDNA (*Ci-arr*) を単離した。推定されるアミノ酸配列は、両タイプのアレスチンと類似性を示すものの、visual arrestin type では欠損している Clathrin binding domain (internalization 機能に重要な部位) を有していた。一方、*in situ* hybridization の結果は、その mRNA がホヤ幼生の眼点近傍に特異的に発現していることを示した。種々の動物のアレスチンのアミノ酸配列から分子系統樹を作成したところ、Ci-Arr は、visual arrestin と β -arrestin が分岐する以前の共通祖先から生じたことが示唆された。

Ci-Arr の C 末部に対する抗体を作成して、ホヤ幼生の免疫染色を行った。その抗血清によって、眼点の光受容細胞特異的にしかも細胞全体が染色され、その細胞の構造が明らかになった。30 個の光受容細胞の細胞体が、色素細胞を 2 枚の葉のように取り囲み、その外節が色素細胞に突き出していた。各々細胞からの軸索が一本の軸索束に束ねられ、より後方の感覚胞と運動神経節の間まで伸び、そこで扇状に広がりシナプスを形成しているように見られる。本講演では、発生過程における光受容細胞の形態変化についても発表する予定である。

M.Nakagawa, H.Orii, T.Horie, R.Yoshida and M.Tsuda : Is the arrestin of a primitive chordates, ascidian a common ancestor of vertebrate visual arrestin and β -arrestin?

1P143

レチナル蛋白質のネットフロー反応 II

○水上 卓、武森 信暁、辻本 和雄（北陸先端大・材料）

蛋白質の、生理的温度におけるゆらぎと、機能の発現との関連を調べるのは、高効率な蛋白質の反応機構を解明する上で重要である。我々は、これまでレチナル蛋白質を試料に用いたコンベンショナルな低温分光法と、スペクトル解析法の一種である SVD 法を組み合わせ、研究を進めてきた。その過程において、単純な一次反応のスキームでは、説明のつかないスペクトルの挙動を見いだした。今回はネットフロー反応のスキームを考慮してさらに詳細に解析を進めたので報告する。

レチノクロム試料を 80K で光照射し、その可視吸収スペクトル変化を、特異値分解 (SVD: Singular Value Decomposition) 法によって分解した。レチノクロムの液体窒素温度下での光反応は、 $\text{Ret} \rightleftharpoons \text{Lumi} \rightleftharpoons \text{X}$ の平衡をなす。スペクトル/キネティクス成分は SVD によって 2 成分であることがあきらかになった。一次反応を仮定すると、double-exp 関数で近似が可能ははずだが、詳細な解析の結果、不可能なことをが示された。そこでガウス分布した反応定数を仮定して解析すると、Lumi から X へ向かう反応定数は、Ret-Lumi の遷移にくらべて幅広の分布関数プロファイルを持ち、さらにそのプロファイルに照射波長依存性があった。ガウス分布した反応定数をもとに基底を張り、b-スペクトルを求めると、デルタ関数近似の場合より Lumi-X のシグナルが大きくなる傾向が認められ、良い近似であることを示唆している。さらに、Runge-Kutta 法および、解析的な方法で、ガウス分布した素反応定数、および観測されるべき顕わな (ガウス分布した) 反応定数との関連を調べた。

講演では、得られた分布関数を基底とする b-スペクトル、ネットフロー反応のスキームによる素反応定数の挙動との関係を議論したい。

T.Mizukami, N.Takemori, K.Tsujimoto : Netflow Reaction of Retinal Protein II

1P142

タコロドプシン光反応における各中間体エネルギー準位の時間分解測定

西奥 義憲¹、中川 将司²、津田 基之²、○寺嶋 正秀¹ (¹京大院理、²姫工大理)

タコロドプシンの光反応において、多くの研究結果から、primer-hodopsin (Prime)、bathorhodopsin (Batho)、lumirhodopsin (Lumi)、mesorhodopsin (Meso)、transient acid metarhodopsin (Tr Acid Meta)、そして acid metarhodopsin (Acid Meta) と呼ばれる中間体が生成することが分かっている。こうした各中間体でのエネルギー変化 (ΔH) は視覚のプロセスを解明する上で非常に重要であり、大きな興味を持たれる。これまでは低温で各中間体をトラップし ΔH が求められてきたが、トラップされた条件下ではタンパク質構造が通常の反応する条件と異なっている可能性がある。ここでは、唯一時間分解でエネルギーの測定が可能である過渡回折格子 (TG) 法及び過渡レンズ (TrL) 法を用い、光反応進行中での各中間体 ΔH の検出を試みた。また、同様に重要な値である各反応に伴う ΔV の検出も、光音響信号 (PAS) 法を用い試みた。TG 及び TrL 法による信号強度は、吸収変化や体積変化そして放出されたエネルギーの量に依存する。これらの内、エネルギーによる信号成分を、時間分解を利用して分離することにより ΔH は、Batho で 145.8 kJ/mol、Lumi で 122.0 kJ/mol、Meso で 37.6 kJ/mol、そして Tr Acid Meta 及び Acid Meta で 12 kJ/mol と決めることが出来た。これは室温で初めての ΔH 測定である。Lumi 中間体は、室温とトラップされた状態とで ΔH が大きく異なっていることが分かり、低温と室温ではその構造が異なることを示しているのかもしれない。講演では PAS から求められた体積変化と合わせて、各中間体での構造変化について議論したい。

Y. Nishioku, M. Nakagawa, M. Tsuda, M. Terazima : Time-resolved measurements of the enthalpy change of the photoreaction intermediates on octopus rhodopsin

1P144

ロドプシンの光異性化モデル (Twist Sharing Model) 及びボンド選択性のメカニズムの解析:X 線結晶構造を用いた MD シミュレーション

○山田 篤志¹、倭 剛久¹、垣谷 俊昭¹、山本 茂義² (¹名大理・²中京大)

視覚での光の情報変換はロドプシンの発色団 11-cis レチナルが全トランスレチナルへ光異性化することで引き起こされる。このロドプシンの光異性化のメカニズムはこれまでに様々なモデルが提唱されてきたが原子レベルでの立体構造が解かれていなかったこともあり完全に解かれていない問題である。近年ロドプシンの立体構造が岡田ら (京大) により解かれ我々はその立体構造を用いることで初めて蛋白質すべての相互作用を取り入れた MD シミュレーションを行った。その結果より以下に示すような従来にない新しい光異性化メカニズム (Twist Sharing Model) を提唱する。そして C11=C12 ボンドのみが異性化し他のボンドの異性化を禁止しているボンド選択性の制御メカニズムの解析も行った。

MD の結果では C11=C12 が約 130fs で反時計回りに異性化した。興味深いことにこの C11=C12 の異性化の過程ではその周辺の多くのボンド (特に C9=C10, C10-C11, C12-C13, C13=C14) が反対向き (時計回り) に少しずつ捻れる現象を観測した。我々はこの光異性化のメカニズムを Twist Sharing Model と名づける。このモデルによる構造変化では蛋白質による鑄型内でも C11=C12 周辺だけの小さな領域での変形により"捻れた all-trans 型"レチナルを達成できる。

レチナル共役鎖上の多くの二重結合は励起状態でそれぞれが異性化する能力を有しているが周囲の蛋白質により異性化経路が制御され C11=C12 の反時計回りの光異性化のみが実現する。我々は光異性化に関与しているアミノ酸残基を特定し、さらに (1)Thr118 と C9 メチルおよびレチナル共役鎖との立体障壁により C9=C10 の時計回りの異性化を禁止していること (2)C13 メチルは一方方向性を引き起こす役割を有し、また C13=C14 の異性化を禁止している、という光異性化のボンド選択性のメカニズムを得た。これがロドプシンでは bicycle pedal model による光異性化の起こらない機構である。

A.Yamada,T.Yamato,T.Kakitani,S.Yamamoto : New Photoisomerization Model and Bond Selective Mechanism of Rhodopsin:MD simulation using crystal structure