2G1700

GFP 結晶が発する蛍光の偏光特性

○合田 真¹、下村 脩²、Shribak Mykhailo²、Tran Phong³、Inoue Shinya² ^{(¹ (社)JBIC、²MBL、WoodsHole、³Columbia Univ.)}

現在 Green Fluorescent Protein(GFP) は細胞生物学をはじめとする様々な分野で応用されている蛍光蛋白質である。ここでは、*Aequorea victoria* から抽出・精製して結晶化した GFP 結晶 (針状) の光学的特性について主に偏光顕微鏡を用いて解析した結果を紹介する。GFP 結晶中の発色団 (chromophore) の存在状態について X 線による解析を行ったところ、結晶の長軸方向とほぼ同じ方向に整列していることが示されたため、様々な偏光光学系にこの結晶を置くことで結晶の持つ光学特性について調べた。その結果、照射する直線偏光の光波の振動方向を結晶の長軸方向と平行にした場合、それを直交させた場合に比べて蛍光が6倍近く強く計測された。また、結晶から発する蛍光についてもアナライザ (検出器側の偏光素子) の角度を変えることで6倍近い蛍光強度の差が計測された。そこで、ポラライザ (直線偏光を作り出す素子) とアナライザの方向を平行にした偏光光学系に GFP 結晶を置いて検出される蛍光強度を調べたところ、結晶の長軸方向が直線偏光の振動方向と平行の状態では、直交させた場合より約30倍も強く蛍光が検出されることがわかった。GFP などの蛍光蛋白質は主に標的物質の分布や動態の解析にこれまで用いられてきたが、今回の解析結果から、偏光光学系を用いることでその標的物質の方向性を探る用途にも応用できる可能性があると考えられる。

M. Goda, O. Shimomura, M. Shribak, P. T. Tran and S. Inoue : Fluorescence polarization of GFP crystals

2H1330

大腸菌の多剤排出輸送担体 EmrE における loop 2-3 の役割

○神山 友子、奈良 敏文、宮内 正二、加茂 直樹 (北大院・薬)

EmrE は大腸菌の内膜に発現する多剤排出輸送担体であり、単一のタンパク質で Ethidium Bromide (EtBr) や Tetraphenylphosphonium (TPMP) など構造上相関のない脂溶性カチオン系薬物をプロトンとの対抗輸送で排出する。EmrE は分子量約 12 KDa、アミノ酸残基数 110 の小さなタンパク質で、その疎水性の高さから有機溶媒で抽出できるという特徴を持つ。現在までに 4 回膜貫通型であることや、膜貫通部位は α -Helix を形成していることなどが推測されている。また一方では、110 個のアミノ酸のうち、唯一膜貫通部位に存在する 14 番目のグルタミン酸を中心に機能解析が進んでいるが、機能・構造相関の詳細は不明である。

昨年の年会において、EmrE の single-cystein 変異体 P55C、T56C 変異体が膜不透過性 SH 試薬の標識により、薬物排出活性が著しく低下することを示した。このことは、loop 2-3 が細胞膜の外側から試薬が標識できる位置にあり、かつ薬物排出に関して何らかの役割を果たしていることを示す。

そこで、loop 2-3 の機能的役割を明らかにするために、Thr 56 における様々な部位特異的変異体を作成し、薬物排出活性や、薬剤耐性を測定した。その結果、Thr 56 を Ala に置換した変異体では、EtBr 排出活性やその耐性は野生型 EmrE とほとんど差が見られなかったのに対し、TPMP 耐性は著しい低下を示した。このことから、Thr 56 を含む loop 2-3 は TPMP の選択性に関わっている可能性が示唆される。

また、一方で Val に置換した変異体では、EtBr 排出活性やその耐性、TPMP 耐性は野生型 EmrE とほとんど差が見られなかった。このことから、TPMP の選択性が、56 番目のアミノ酸側鎖の微妙な違いによって引き起こされていることが示唆される。

T. Kouyama, T. Nara, S. Miyauchi and N. Kamo : Study of loop 2-3 in the multidrug transporter EmrE from *Escherichia coli* .

2G1715

G蛋白質共役型受容体・F P R 1 はG F P の有無に関わらず多量体形成する：蛍光一分子観察による解析

○東條 正、青木 大輔、木脇 圭一、シルヴィア イスカンダル、多田隈 尚史、石渡 信一、船津 高志 (早大・理工・物理)

GPCR (G 蛋白質共役型受容体) は免疫、神経、循環器調節等、生体の多様な機能調節に関与しており、恒常性維持機構の重要な担い手である。GPCR の機能発現機序を一分子レベルで解明することは、新規臨床治療薬の開発につながるものと期待される。昨年我々は、GPCR のひとつで好中球走化性因子受容体である FPR1 と蛍光タンパク EGFP のキメラ“FPR1-EGFP”を CHO 細胞に強制発現させたところ、“FPR1-EGFP”が構成的かつリガンド非依存的に多量体を形成することを見出し、前大会において報告した。ところがその後、我々が FPR1 の可視化に用いた EGFP は脂質修飾部位を導入して細胞膜に局在させると、培養細胞に強制発現させた際に細胞膜上で二量体化することが報告された。従って、GPCR を EGFP 融合膜蛋白として細胞膜上で発現させると、三次元で自由拡散している EGFP に比べて実効濃度が高くなり、GPCR の多量体形成ではなく EGFP の二量体形成を観察している可能性が出てきた。そこで我々は“FPR1-EGFP”の多量体化が EGFP によるアーティファクトでないことを確認するために、二量体を作りにくいと報告された EGFPmutant ”A206K” (Kd74 m M〜) とのキメラ“FPR1-EGFP (A206K)”を作製し CHO 細胞に発現させ蛍光一分子観察を行った。その結果、“FPR1-EGFP (A206K)”は構成的に多量体を形成することが確認された。さらに、これらキメラタンパク発現細胞に FPR1 を強制発現させると、“FPR1-EGFP”、“FPR1-EGFP (A206K)”のいずれも蛍光強度分布が多量体から単量体側にシフトした。これらの結果は、FPR1-EGFP の多量体形成が EGFP に依存せず、GPCR 固有の特性であることを示している。

T.Tojo, D.Aoki, K.Kinowaki, S.Iskandar, H.Tadakuma, S.Ishiwata and T.Funatsu : FPR1, a G-Protein Coupled Receptor, forms oligomers in a living cell regardless of a tendency of its fusion protein, EGFP, to form dimers.

2H1345

大腸菌多剤排出系 EmrE におけるプロトン輸送の定量

○奈良 敏文¹、菊川 峰志²、加茂 直樹¹ ^(¹ 北大院・薬、² 北大・先端研)

細胞膜を介する二次性能動輸送系は、細胞活動を支える重要な機能であり、実際に多くの輸送担体がこれまでに報告されている。これらの解析は、基質の輸送過程を観測・解析し基質輸送の詳細を知る、或いは電気生理学的手法で輸送を見る等の方法が一般的で、かつ比較的容易になされている。しかし、プロトン流入の解析や、その流入をどの様に基質輸送に繋げているかの解析は、二次性能動輸送のもう一つの側面であるにもかかわらず、またエネルギー変換という重要な課題であるにもかかわらず、これまでほとんど行われなかった。これは、プロトン移動が実験的に測定しづらいことが要因の一つとなっている。

今回我々は、大腸菌膜に発現する多剤排出アンチポーター EmrE を題材に、ethidium bromide (EB) 輸送に共役するプロトン流入の定量を行った。フレンチプレスにより得た大腸菌反転膜ベシクルを試料とし、調整時にベシクル内に 150 mM NH₄Cl をロードした。これを NH₄Cl free な medium に希釈する事によりベシクルに外向きプロトン駆動力を課し、10 micro M EB 添加後のベシクル外の pH 変化を FET 電極により測定した。その結果、EmrE を発現しないコントロールでは pH の緩やかな低下を示すのみであったのに対し、EmrE を発現するベシクルでは EB 添加と同時にプロトン流出を示す 0.1 pH 程度の急激な pH 低下が観察された。この pH 変化は 10 micro M CCCP 添加時に見られる変化と同程度であり、課せられたプロトン駆動力を最大限に利用した、EB 輸送に共役するプロトン流出と考えられる。本発表では、多剤排出系 EmrE の薬物輸送に共役するプロトン移動の化学量論的考察も同時に行いたい。

T. Nara, T. Kikukawa and N. Kamo : Evaluation of proton translocation via bacterial secondary membrane transporter EmrE, a small multidrug transporter in *Escherichia coli*.