B645

Rhodopsin simulation in polyunsaturated stearyl-docosa-hexaenoyl lipid bilayer system

○ Kim Jae-Gil¹, Ikeguchi Mitsunori², Kidera Akinori²
(¹JBIRC、²横浜市大院・総合理)

Rhodopsin, the visual pigment found in vertebrate retinal rod cells, is a member of a superfamily of G-protein-coupled receptors that transduce signals across the membrane. Recently, 2.8 Å high resolution crystal structure (Science, Palczewski et.al., 289, 739 (2000)) reveals many important characteristic features of the ground state of rhodopsin. In the natural environment of rhodopsin, the polyunsaturated lipid chain (docosa-hexaenoyl fatty acid - DHA), plays a critical role in regulating the functional activity of rhodopsin. In this study, 17 ns molecular dynamics simulation has been performed for the crystal structure of rhodopsin (PDB: 1L9H) in polyunsaturated SDPC (stearyl-docosa-hexaenoyl phosphocholin) membrane system. From the equilibrium trajectory of the simulation, we investigate the stability and the ground state dynamics of rhodopsin by applying the principal component analysis. The correlation between conformation fluctuations in retinal chromophore and rhodopsin dynamics has been also examined. Finally, the protein-lipid interaction has been studied by computing order parameters of C-H bond vector of fatty acid chains.

J.-G. Kim, M. Ikeguchi and A. Kidera : Rhodopsin simulation in polyunsaturated stearyl-docosa-hexaenoyl lipid bilayer system

B647

ロドプシンとGDP結合型トランスデューシンの相互作用

○森住 威文、今井 啓雄、七田 芳則 (京大・院理・生物物理、CREST JST)

細胞の光情報変換過程におけるロドプシンの役割は、光を受容した後、GDP結合型の三量体G蛋白質トランスデューシン(Gt)と結合し、 α サブユニット上でのGDP-GTP交換反応を促進してそれを活性化することである。従来の研究から、Gtと結合して活性化するロドプシンの中間体はメタII中間体であると言われてきた。

しかし、我々がロドプシンとGtとの相互作用過程について時間分解分光法を用いて速度論的に詳細に検討した結果、メタII中間体以外にその前駆体であるメタIb中間体もGtと結合することを発見した。また、メタIb中間体はGtとは結合するが、Gt上でのGDP-GTP交換反応を誘起しないことも発見した。さらに、メタIbは、ロドプシンが含まれる視細胞外節膜、すなわち、生理的環境に近い条件下のロドプシン試料でも生成することを見いだした。つまり、視細胞内でもメタIbからGtとの相互作用過程が始まる可能性が強く示唆された。

そこで今回、メタIbとGtの相互作用メカニズムについてさらに検討を行った。GDP結合型Gt存在下でメタIbの生成・崩壊過程を解析した結果、GtはメタIbとはGDP結合型で結合し、メタIIとはGDP放出型で結合していることが明らかになった。つまり、メタIbからメタIIへの変化過程で、結合しているGt上でGDPの遊離が起こり、メタIIになってからGt上でGTPの結合が起こることが明らかになった。現在GtとメタIbとの結合部位について検討しており、その結果をあわせてロドプシンによる2段階のGt活性化機構を議論したい。

T. Morizumi, H. Imai and Y. Shichida : Interaction between Rhodopsin and Transducin in its GDP-bound form.

B646

ロドプシンにはtorsion potentialが働いている

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

ロドプシンのシストランス光異性化は、発色団のC11=C12ボンドにのみ急速な回転がおこるという特徴を持つ。これまで真空中の発色団レチナールの励起状態ポテンシャル面の計算が多くなされ、回転に対してbarrierが無いことや、conical intersectionの存在が明らかにされた。他方、タンパク質の役割についての情報は少ない。最近ロドプシンのX線結晶構造解析が成功した。われわれはこの構造をもとに、新しく開発した計算解析手法を適用し、タンパク質の異性化反応における積極的役割を明らかにしたので、それを報告する。ロドプシンに結合した発色団はグローバルに振れた構造をとっている。ここでC11=C12の振れ力定数を仮想的に零にして、新たな安定構造を求めるとC11=C12ボンドのみ反時計方向に80度程度振れた。隣接するC10=C11ボンドとC12=C13ボンドは時計方向に少し振れた。このことは主としてC11=C12ボンドをねじらせようとする力がタンパク質から働いていることを示す。C9=C10やC13=C14ボンドの振れ力定数を仮想的に零にして同様の計算を行なったが、どのボンドのねじれもほとんどおこらなかった。このことはC9=C10やC13=C14ボンドにはタンパク質から特別なねじれ力が働いていないことを示す。C11=C12ボンドの振れ力定数を零にしたときに開放されるひずみエネルギーを見積もると6 kcal/mol程度であることがわかった。これはわれわれが1975年に予言したTorsion potentialに他ならない。発色団が励起されると、この蛋白から与えられるひずみ力が働いて、C11=C12ボンドの一方方向的な非常に早い回転運動が引き起こされる。すなわちtorsion modelのメカニズムが働く。

T. Kakitani, A. Yamada, T. Yamato and S. Yamamoto : Torsion potential works in rhodopsin

B648

ロドプシンノックインマウスを用いた視細胞応答と光受容蛋白質反応過程の速度論的解明

○今井 啓雄^{1,2}、Vladimir Kefalov³、千坂 修⁴、植田 良樹^{5,6}、森住 威文^{1,2}、大西 暁士^{1,2}、Yingbin Fu³、本田 孔士⁵、King-Wai Yau³、七田 芳則^{1,2} (¹京大・院理、²CREST, JST、³Johns Hopkins University School of Medicine、⁴京大・院生命、⁵京大・院医、⁶市立長浜病院・眼科)

多くの脊椎動物の網膜には、昼間視・色覚に関わる錐体と、薄明視に関わる桿体が存在する。我々は、これらの細胞の機能の基礎となる光受容蛋白質の性質を比較検討し、錐体の光受容蛋白質は桿体の光受容蛋白質ロドプシンよりも中間体(メタII、メタIII)の崩壊やレチナールとの結合(再生)が速いことを見出した。また、培養細胞系で発現した変異蛋白質を用いて、これらの性質を制御するアミノ酸残基(E122、P189)を見出した。例えばロドプシンのE122を錐体型に置換したE122Qの変異体は、メタIIの崩壊が5倍、メタIIIの崩壊が2倍、再生が10倍程度速くなる。このような光受容蛋白質の性質の違いは視細胞の応答特性に影響を与える可能性があるため、その影響が視細胞の応答特性にどのように現れるのかを分光学的、電気生理学的測定を併用することにより解析した。まず、ジーンターゲットング法を利用したノックインマウスを作製することにより、ロドプシンのE122Q変異マウスを作製した。吸引電極法により視細胞の応答特性をさらに解析したところ、変異蛋白質の特性に由来する波長感受性の変化と共に、応答の終結速度、光退色後の回復速度の変化が観察された。そこで、マウス網膜から光受容蛋白質を含む視細胞外節膜画分を調製し、電気生理学的応答を記録すると同様の条件で、光受容蛋白質の中間体の生成・崩壊過程や再生速度を測定した。その結果、電気生理学的応答の速度とこれらの速度が対応することが判明した。すなわち、光受容蛋白質の光反応過程に現れる各素過程(中間体やアポ蛋白質)が視細胞の応答特性にどのように関与しているのかを解明することができた。

H. Imai, V. Kefalov, O. Chisaka, Y. Ueda, T. Morizumi, A. Onishi, Y. Fu, Y. Honda, K.-W. Yau, and Y. Shichida : Kinetic Analysis of the Intermediate States of Rhodopsin and Photoresponse of Rod cells Revealed by Rhodopsin Knock-in Mouse