1P245

活性型GPCRの単離とキャラクタリゼーション：タコ酸性型メタロドプシン

○松本 久実、芦田 明美、津田 基之（兵庫県立大・院生命理學・生命科学）

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は神経系・内分泌系で最も大きなスーパーファミリーを形成しており、その構造に基づく機能解析は創薬関係において最も重要なターゲットである。既に構造の解かれたウシロドプシンは不活性型のみであり、活性型は得るのが困難なためGPCRの構造に基づく機能解析には不十分である。一方、タコロドプシンは活性型、不活性型ともに安定でありGPCRの構造と機能を解明するのに最適である。

我々は既に、C末端を切断することにより、均一で高純度なタコロドプシン（ α -ロドプシン）を得る精製方法を確立した。精製した α -ロドプシンに青色光照射すると α -ロドプシンと α -メタロドプシンが混在した光平衡の状態となる。本研究では活性型GPCRの構造を明らかにするために、この光平衡状態から α -メタロドプシンの単離を試みた。光平衡産物をDEAEカラムに展開することにより二つの分画を得た。レチナール異性体分析、吸収スペクトルから第一分画が α -ロドプシン、第二分画が α -メタロドプシンと同定できた。得られた α -メタロドプシンは暗状態でGタンパク質を活性化した。また、橙色光照射によって α -メタロドプシンから不活性型GPCRである α -ロドプシンに再生すると、Gタンパク質活性化能が消失する結果を得た。以上より、得られた α -メタロドプシンは活性型GPCRとしての機能と性質を保持していることが確認できた。このようにして活性型GPCRである α -メタロドプシンの精製方法を確立した。次に、 α -ロドプシン、 α -メタロドプシンの温度に対する安定性を調べた。両者とも結晶を得るためには十分な安定性を示す結果が得られた。現在、種々の件で α -ロドプシン、 α -メタロドプシンの結晶化を試みている。

K. Matsumoto, A. Ashida and M. Tsuda : Purification and characterization of activated GPCR: octopus acid metarhodopsin

1P247

レチノクロムの光反応に伴うタンパク質の構造変化

○古谷 祐詞^{1,2,3}、寺北 明久^{2,3}、七田 芳則^{2,3}、神取 秀樹^{1,3}
(¹ 名工大院工、² 京大院理、³ CREST/JST)

レチノクロムは無脊椎動物の視細胞内節に存在するレチナール光異性化酵素である。all-trans型レチナールを11-cis型に異性化させ、輸送タンパク質を介して、外節に存在する視物質ロドプシンに供給する。これまで低温可視吸収測定により、ルミレチノクロム（ルミ）、メタレチノクロム（メタ）などの中間体が報告されている¹。特にルミは77~250 Kの温度範囲で安定に存在し、同様の温度領域で様々な中間体を生成する視物質ロドプシンと対照的である。 Schiff塩基の対イオンは、脊椎動物の視物質ロドプシンのようにヘリックス3に存在するGlu113ではなく（レチノクロムではMet）、ヘリックス4と5の間のループ部分に存在するGlu181であることが部位特異的変異体を用いた解析によりわかっている²。一方でレチナールやタンパク質の構造に関する情報はきわめて限られているのが現状である。

我々は、レチノクロムの機能発現メカニズムを明らかにするために、赤外分光法を用いて Schiff塩基周辺の構造や光反応過程でのタンパク質の構造変化について詳細な解析を行った。その結果、脊椎動物の視物質ロドプシンとは異なり³、水素結合強度の強い水分子がレチナールの異性化に伴って構造変化することがわかった。また、プロトン化したAsp91の水素結合強度がルミ、メタの生成に伴って強くなり、さらにメタの生成に伴ってタンパク質骨格に大きな変化が生じることが明らかになった。これらの結果をもとに、レチノクロムの光反応過程について議論したい。

1. Hara et al. (1981) Photochem. Photobiol. 33, 883.
2. Terakita et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 14263.
3. Furutani et al. (2003) Biochemistry 42, 9619.

Y. Furutani, A. Terakita, Y. Shichida and H. Kandori : Structural changes upon retinal photo-isomerization in squid retinochrome at 77 - 270 K studied by FTIR spectroscopy

1P246

低温赤外分光法によるイカロドプシンの構造解析

○太田 徹¹、古谷 祐詞^{1,2,3}、寺北 明久^{2,3}、七田 芳則^{2,3}、神取 秀樹^{1,3} (¹ 名工大院工、² 京大院理、³ CREST/JST)

無脊椎動物であるスルメイカの視細胞外節に存在するイカロドプシンは、発色団として11-cis型レチナールをプロトン化 Schiff塩基により共有結合している。脊椎動物のウシロドプシンではこの正電荷を安定化させるために脱プロトン化したGlu113がカウンターイオンとしてはたっていることが知られている。無脊椎動物のロドプシンでは発現系が構築されていなかったために、発色団のカウンターイオンはこれまで不明であった。最近になってイカの視細胞内節に存在するレチナールの光異性化酵素レチノクロム¹、さらにはGPCRであるナメクジウオロドプシンにおいて²、膜貫通ヘリックスには含まれないGlu181がカウンターイオンであることが明らかになった。11-cis型レチナールを結合し、GPCRであるナメクジウオロドプシンの結果は、イカロドプシンのカウンターイオンもGlu181であることを強く示唆する。

本研究では、無脊椎動物のイカロドプシンに対して低温赤外分光を行い、得られたスペクトルを脊椎動物であるウシロドプシンのもの³と比較した。その結果、イカロドプシンの場合、ウシではみられないような強い水素結合を持つ水分子が観測された。一方で、レチナール Schiff塩基の水素結合はイカの方がウシよりも弱いことがN-D伸縮振動の領域から明らかになった。これらの結果をもとに Schiff塩基近傍の水素結合ネットワークやタンパク質の構造変化について議論したい。

1. Terakita et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 14263.
2. Terakita et al. (2004) Nat. Struct. Mol. Biol. 11, 284.
3. Furutani et al. (2003) Biochemistry 42, 9619.

T.Ota, Y.Furutani, A.Terakita, Y.Shichida and H.Kandori : Low temperature FTIR spectroscopy of squid rhodopsin

1P248

バクテリオロドプシンの一方向へのプロトン移動は Schiff塩基と水分子との相互作用の変化によっている

○前田 章夫^{1,2}、Gennis Robert¹、Balashov Sergei²、Ebrey Thomas² (¹ イリノイ大 生化学、² ワシントン大、生物)

バクテリオロドプシンのプロトンポンプは、光によるオールトランス型レチナール発色団の13シス型への異性化による Schiff塩基の配向変化で誘導される。L中間体からM中間体に移る過程でプロトンが Schiff塩基からAsp85に移り、M中間体からN中間体に移る過程で、反対側にあるAsp96から Schiff塩基へプロトンが移る。この一方向へのプロトンの移動は、各中間体における Schiff塩基、Asp85、Asp96のプロトンへの親和性（pKa値）の変化で説明される。ほぼ同じ自由エネルギーをもつLとMで、 Schiff塩基、Asp85のpKa値が著しく異なることは、どのように説明されるか。FTIRスペクトルに現れる水のOH伸縮振動の強度はLの形成にともない著しく大きくなる。変異タンパク、重原子置換による実験から、数個の水分子が Schiff塩基とAsp96の間に形成される構造体に囲まれてクラスターを形成し、Lのプロトン化 Schiff塩基を安定にしていることが分かる(1)。このLの構造は神山らによるX線構造と一致する(2)。これらの水分子は、Mでは Schiff塩基から離れた別の場所に移動し、 Schiff塩基のpKa値の低下をもたらす。NのFTIRスペクトルはLのそれと似ていて、 Schiff塩基は水和していることが示唆される。ただ、Lと同じような構造体に囲まれた水クラスターは、Lをも安定にするV49A変異タンパクの場合にのみみられる。以上の結果から、 Schiff塩基のAsp96側の疎水性領域にある水分子が、プロトンの一方向への移動をさめる残基のpKa値を調節していることが示唆される。(1) Maeda et al. (2003) Biochemistry 42, 14122-14129. (2) Kouyama et al. (2003) J. Mol. Biol. 335, 531-546.

A.Maeda, R.B.Gennis, S.P.Balashov and T.G.Ebrey : One-way proton transport in bacteriorhodopsin is modulated by changes in the interaction of the Schiff base with water molecules