

全反射赤外分光法によるファラオニスフォボロドプシンの膜タンパク質間相互作用の解析

(¹名工大院工 ²北大院薬) ○北出祐也¹、古谷祐詞¹、加茂直樹²、神取秀樹¹

【序論】 細胞は、外界の環境を感知するために、様々な膜受容体を細胞膜に発現している。その作用機序を物理化学のことばで理解するには、ダイナミクスの原子レベル分解能での解析が重要である。光で反応を制御できるロドプシンは、膜受容体の解析においてトップランナーとも言える存在である。その中の一つであるファラオニスフォボロドプシン (*ppR*) とその情報伝達タンパク

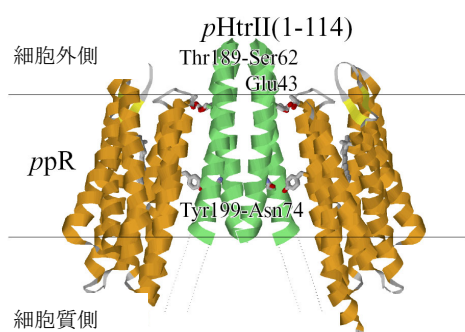


図 1 *ppR/pHtrII* 複合体の結晶構造

ppR と *pHtrII* は脂質二重膜中で複合体を形成しており、Tyr199-Asn74 および Thr189-Ser62, Glu43 の水素結合が会合を安定化している。また、*pHtrII* の細胞質側領域の構造は解かれておらず、情報伝達における役割に注目が集まっている。

質である *pHtrII* は高度好塩好アルカリ性菌 *Natronomonas pharaonis* の細胞膜において 2:2 の比率で複合体を形成している。*ppR* は、その内部に Lys 残基とシッフ塩基結合した発色団レチナールを有しており、レチナールが光を吸収すると *all-trans* 型から *13-cis* 型へと異性化反応を起こし、タンパク質の構造を変化させる。*ppR* の構造変化に伴い *pHtrII* は活性化され、細胞内に光情報を伝達する。

赤外分光法は分子構造を調べるのに適した手法であり、情報伝達過程に伴う *ppR* 及び *pHtrII* の構造変化に関して多くの知見を与えてきた。しかし、赤外線は水に強く吸収されるため、これらの計測では必要最小限度に水和したフィルム状試料が用いられてきた。本研究では、全反射赤外分光法を用いることにより、生理条件下に近い水中での *ppR* 及び *pHtrII* の構造変化を捉えることを試みた。

【実験方法】 *ppR* 及び *pHtrII*、それぞれの塩基配列を含むプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、1 mM IPTG により発現誘導した。次に、膜画分に含まれる *ppR* 及び *pHtrII* 試料を n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DM) を用いて可溶化し、Ni-NTA アガロースカラムで精製した。その後、L- α -phosphatidylcholine (PC) リポソームに再構成した (モル比 *ppR*:PC=1:50)。赤外分光測定を行うため、これらの試料を ATR ダイヤモンドセル上に滴下し、窒素ガスを吹きつけて乾燥させた。次に、シリコン製 O-リングとガラス製の容器で密封し、緩衝液 (pH 7) で試料を満たした。温度を 20 °C に保ち、500 nm 以上の光照射により M 中間体を蓄積させ、光照射中と暗中との赤外差スペクトルを得た (波数分解能: 2 cm^{-1} , 128 scan, 96 回積算)。

【結果と考察】 これまで当研究室では、水和フィルムを用いた赤外分光測定によって、膜中で形成される *ppR* の Tyr199 と *pHtrII* の Asn74 の水素結合状態が変化すること⁽¹⁾、及び *ppR* のタンパク質骨格が *ppR-pHtrII* 複合体形成時にのみ、温度依存的な変化を示すこと⁽²⁾を見出してきた。前者の結果は、膜中での *ppR* から *pHtrII* への情報伝達経路の存在を初めて示したものであった。また、後者の結果は細胞質側領域での *ppR* と *pHtrII* との相互作用を示唆する結果であったが、

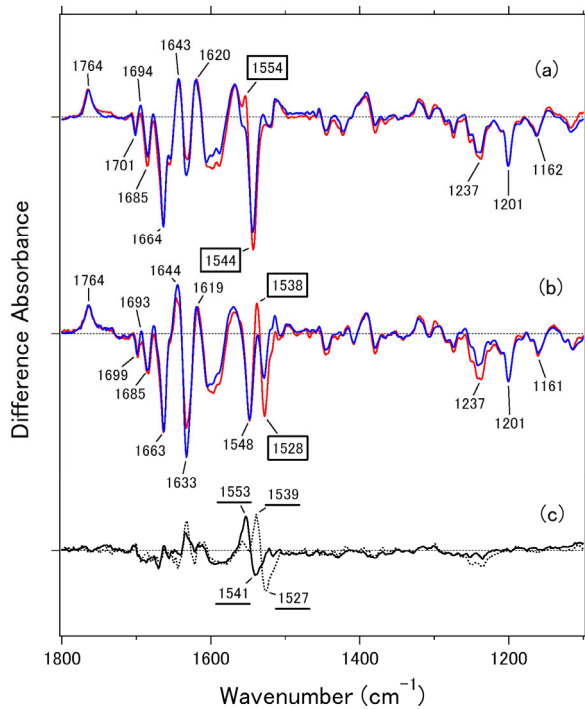


図2 *ppR* 単体の赤外差スペクトル

- (a) *ppR* の M 中間体と基底状態との赤外差スペクトル (青線は水和状態、赤線は水中)
- (b) ^{15}N *ppR* の M 中間体と基底状態との赤外差スペクトル (青線は水和状態、赤線は水中)
- (c) 水中のスペクトルから水和状態のスペクトルを引き算した赤外二重差スペクトル (実線は *ppR*、点線は ^{15}N *ppR*)

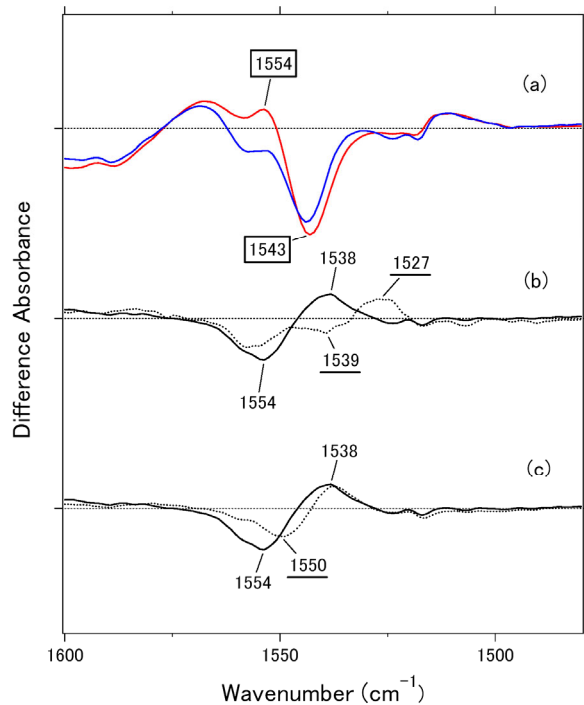


図3 *ppR* 単体及び *ppR/pHtrII* 複合体の赤外差スペクトル

- (a) 水中における M 中間体と基底状態との赤外差スペクトル (赤線は単体、青線は複合体)
- (b),(c) *ppR/pHtrII* 複合体のスペクトルから *ppR* 単体のスペクトルを引き算した赤外二重差スペクトル (実線は *ppR/pHtrII* - *ppR*, (b)の点線は ^{15}N *ppR/pHtrII* - ^{15}N *ppR*, (c)の点線は *ppR/^{15}\text{N}*pHtrII* - *ppR*)*

pHtrII の構造に変化は生じておらず、その領域での相互作用の実体については不明のままであった。

本研究における全反射赤外分光法による測定でも、基本的には水和フィルムと同様の結果が得られたが、*ppR* 単体の測定においてアミド II 領域に新たな変化が見出された (図 2)。また、これらのバンドは *ppR/pHtrII* 複合体形成時においても同様に確認されたが、複合体での測定では、さらに新たなバンドがアミド II 領域に見出された。*ppR*、*pHtrII* それぞれを ^{15}N 同位体標識した試料を用いて測定することにより、このバンドには *pHtrII* に由来する振動が含まれることが分かった (1554 cm^{-1} : 図 3)。

以上の結果より、*ppR* の単体は、水和状態における構造変化に加え、新たなタンパク質骨格の変化を水中において起こしていることが分かった。また、*ppR/pHtrII* 複合体では、更に *pHtrII* のタンパク質骨格も変化していることが明らかとなった。この変化は、新たに見いだされた *ppR* 単体のタンパク質骨格の構造変化によって引き起こされていると考えられ、細胞質領域における情報伝達経路の存在を示す新たな証拠である。

【参考文献】

(1) Y. Furutani, K. Kamada, Y. Sudo, K. Shimono, N. Kamo and H. Kandori, *Biochemistry* 44, 2909-15, 2005
 (2) K. Kamada, Y. Furutani, Y. Sudo, N. Kamo and H. Kandori, *Biochemistry* 45, 4859-66, 2006