

2C19 センサーロドプシン I の活性化過程における プロトン移動反応の赤外分光による解析

(¹名工大院工 ²テキサス大医) 高橋はづき¹、古谷祐詞¹、佐々木純²、John. L Spudich²、
神取秀樹¹

【序論】

センサーロドプシン I (SRI) とその情報伝達タンパク質である HtrI は、高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜において 2:2 の比率で複合体を形成している。SRI は、外界の光環境に応じて、赤色光に集まる正の走光性と紫外光から逃げる負の走光性のための光センシング機能を一分子で担う興味深いタンパク質である。しかしながら、低塩濃度条件下で不安定であるため、分子科学的な研究はほとんど進んでいなかった。我々は、L- α -phosphatidylglycerol (PG) 膜

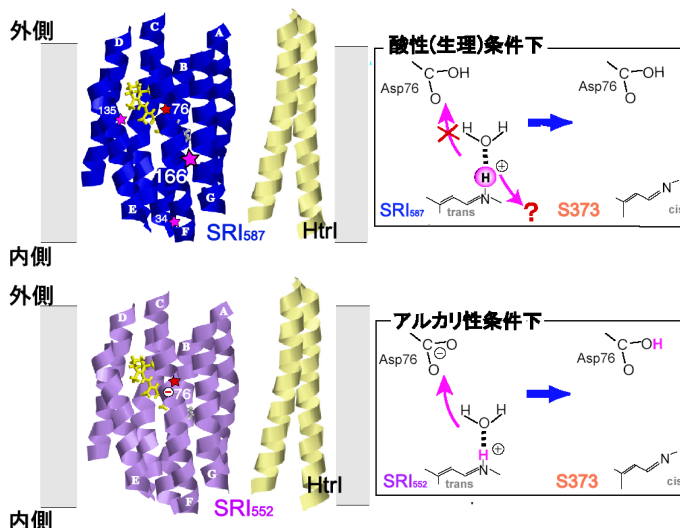


図 1 SRI-HtrI 複合体の模式図

SRI と HtrI は脂質二重膜中で複合体を形成している。右図は、S373 中間体形成に伴う、酸性・アルカリ性条件下でのシッフ塩基のプロトン移動反応を示した。アルカリ性では Asp76 にプロトンが移動するが、酸性条件では移動先は不明であった。

に再構成した SRI 精製試料を遠心操作により沈殿させ、残存の塩分を極力除去することにより、赤外分光計測に適した透明なフィルム状試料の作製法を確立した。その結果、正の走光性における活性化状態 S373 中間体において、SRI と HtrI との構造変化や相互作用変化は、レチナールシッフ塩基の対イオンである Asp76 の脱プロトン化状態とプロトン化状態で大きく異なることを明らかにした¹。一方、S373 中間体生成に伴いレチナールシッフ塩基のプロトンが解離するが、アルカリ性条件では Asp76 がその受容基として働くのに対して、酸性条件でのプロトン受容基は未解明であった。変異タンパク質を用いた研究から、His166 がプロトン移動に関与していることが示唆されているが、それがプロトン受容基であるという直接的な証拠はなかった。本研究では、His 同位体試料と変異体試料を用いた赤外分光計測の結果から、His166 のプロトン化について解析した。

【実験方法】

SRI と HtrI を融合させた塩基配列を含むプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、10 μ M all-*trans* 型レチナール存在下 1 mM IPTG により発現誘導した。次に、膜画分に含まれる SRI-HtrI 複合体試料を 1% 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、PGリポソームに再構成した (モル比 SRI:PC= 1:50)。これらの試料を 300 mM NaCl 緩衝液 (クエン酸 10 mM pH 5.5 or ホウ酸 10 mM pH 9.5) で懸濁した。遠心後のペレット試料を BaF₂ 窓板上にのせた濃縮溶液

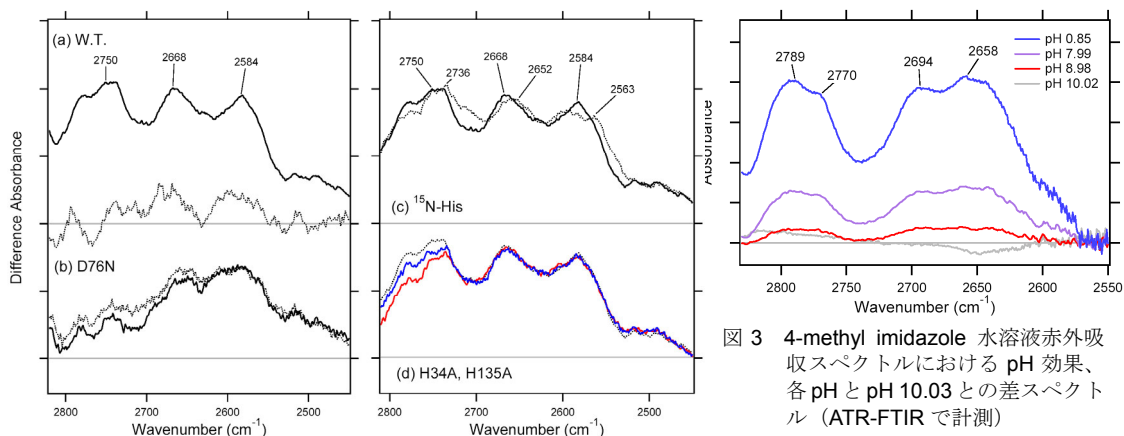


図2 左 野生型とD76N変異体のS373中間体形成前後の赤外差スペクトル (実線 pH 5.5, 点線 pH 9.5)
(a) 野生型、(b) D76N 変異体

右 野生型と¹⁵N-His 標識および His 変異体の S373 中間体形成前後の赤外差スペクトル
(c) 実線 unlabeled, 点線 ¹⁵N-His label 標識試料、(d) 黒点線 野生型, 青線 H34A, 赤線 H135A, 各 pH 5.5

図3 4-methyl imidazole 水溶液赤外吸収スペクトルにおける pH 効果、各 pH と pH 10.03 との差スペクトル (ATR-FTIR で計測)

フィルム試料を用いて赤外分光測定を行った。測定温度を 260 K とし、500 nm 以上の光照射により S373 中間体を蓄積させ、光照射前後の赤外差スペクトルを得た (波数分解能: 2 cm⁻¹, 128 scan)。

【結果と考察】

S373 中間体と暗状態との赤外差スペクトルにおいて、水素結合環境にある N-H 基の伸縮振動領域 (2800-2400 cm⁻¹) に、酸性条件下でのみ現れる特徴的なバンドが観測された (2750, 2668, 2584 cm⁻¹)。これらのバンドはアルカリ性条件下では現れないが、D76N 変異体では pH に関係せず観測された (図2 左) ことから、76の位置が電荷をもたないときにこの信号が現れることが明らかとなった。また、これらのバンドを¹⁵N-His 同位体標識試料を用いて測定することにより、His の N-H 伸縮振動であることを帰属した。さらに、H135A, H34A (SRI に存在する 3 個の His 中の 2 つ) の変異体では、これらのバンドが保存されたことから、His166 によるものと帰属した (図2 右)。His 側鎖のモデル化合物である 4-methyl imidazole 水溶液を用いて pH を振ったところ、イミダゾール環の窒素原子の τ および π 部位が両方ともプロトン化する強酸性条件下においてバンド強度が増大することが確認できた (図3)。

以上の結果より、Asp76 がプロトン化した条件下では、S373 中間体の形成に伴って、His166 がプロトン化することが明らかとなった。ロドプシンの機能発現には、プロトン移動反応が共役しているが、本研究はヒスチジンのプロトン化が直接、関与していることを示した最初の例となった。S373 中間体形成に伴う構造変化は、Asp76 にプロトンが移動するアルカリ性条件下と移動しない酸性条件下では大きく異なっていることを既に明らかにしているが¹、今回の研究により、His166 のプロトン化が新たな構造変化を引き起こしていることが示唆された。

【参考文献】

- (1) Y. Furutani, H. Takahashi et al., *Biochemistry* 47, 2875-2883 (2008).