

2B08

ロドプシン／古細菌型ロドプシンキメラタンパク質を用いた G タンパク質活性化機構の解明

(名工大院工*, 京大院理**) ○井上 圭一*, 佐々木賢吾*, 中妻 亜弥*, 山下 高廣**,
七田 芳則**, 神取 秀樹*

【序】ロドプシンは高等動物の網膜内に存在する桿体細胞に含まれる光受容タンパク質であり、主として薄明視における光受容過程に関わっている。G タンパク質を活性化することで信号伝達を行う G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種であるロドプシンは、光によって反応を開始することができることから分光的な研究が盛んに行われてきた。また 2000 年に結晶構造が報告されたこともあって、最も理解が進んだ GPCR のモデルタンパク質となっている。しかしロドプシンがはたらく上で最も重要な桿体中の G タンパク質 (トランスデューシン) との相互作用については未だに分子論的な理解が進んでいないのが現状である。

古細菌型ロドプシンは視物質ロドプシンと同様、7 回膜貫通型 α ヘリックス構造の内部にレチナル分子を結合した光受容タンパク質であるが、G タンパク質の活性化能はないことが知られている。しかしながら、Geiser らは 2006 年に光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (BR) の細胞質側第 3 ループをロドプシンのもので置換したキメラタンパク質 (BR wt/Rh-loop3) が、光依存的にトランスデューシン活性化能を持つことを明らかにした。この結果は、ロドプシンと BR との光誘起構造変化に共通性があることを示唆しているが、Geiser らの論文ではキメラタンパク質の性質に関する記述がほとんどなく、活性化能もロドプシンの 1 / 3 程度という驚くほど高い値を報告している。

そこで本研究では、キメラ BR のトランスデューシン活性化能や光反応ダイナミクスを詳細に解析した。特に、BR のシッフ塩基に対するプロトン供与体である Asp96 を Asn に変異させた D96N 変異体をもとにしたキメラタンパク質も併せて調べることで、構造変化と活性化能との相関を検討した。

【実験】試料には BR の野生型および D96N 変異体の細胞質側第 3 ループをウシロドプシンのループに置き換えたキメラタンパク質 (それぞれ BR wt/Rh-loop3、BR D96N/Rh-loop3 とする) を用いた (図 1)。G タンパク質活性化能は試料に光を照射したとき、トランスデューシンに結合する $GTP\gamma^{35}S$ の量を測定することで評価した。また溶媒として 20 mM K_2HPO_4 (pH = 7.4)、200 mM NaCl を用いた。

過渡吸収測定はナノ秒 Nd³⁺:YAG パルスレーザーを励起光源とし、ICCD カメラを使ったフラッシュフォトリスシステム (C9125、C8808-01、浜松ホトニクス) を用いて行った。

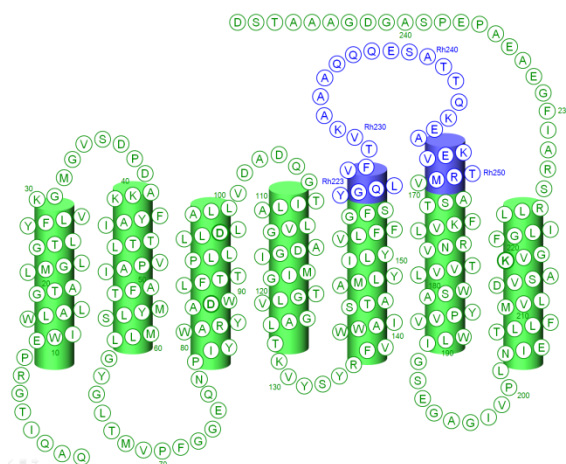


図 1 BR/Rh-loop3 キメラタンパク質の構造

励起光強度を $\sim 500 \mu\text{J}/\text{pulse}$ とし、光励起 50 回分の信号を平均化した。過渡吸収測定は 10 mM K_2HPO_4 、300 mM KCl 中で行い、 $\text{pH} = 7, 8, 9$ の異なる pH 条件下で実験を行った。

【結果と考察】図 2 に野生型 BR および BR/Rh-loop3 キメラの光依存的なトランスデューシン活性化能測定の結果を示す。野生型 BR については光依存的な活性化が見られなかったのに対し、BR wt/Rh-loop3 と BR D96N/Rh-loop3 についてはそれぞれ 64 と 80 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mol}$ pigment の活性化能があることが示された。これはウシロドプシンの 58600 分の 1 および 46900 分の 1 で、今回の結果は Geiser らの報告とは大きく異なっており、天然の GPCR はトランスデューシンを活性化するために最適化されているものと解釈できる。

次にこれらの試料のフラッシュフォトリシスを測定したところ、BR wt/Rh-loop3 のフォトサイクルにおいて M 中間体が減衰した後に、さらに短波長シフトした野生型 BR では見られない中間体 ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) が存在することが明らかになった。この中間体は O 中間体と同じ時定数で減衰することから、O 中間体と準平衡にある過渡的な中間体であると考えられる。またフォトサイクルの Turn over 速度は野生型 BR では $4.91 \pm 0.08 \text{ ms}$ であるのに対し、BR wt/Rh-loop3 ではそれよりも少し遅く $22.0 \pm 0.4 \text{ ms}$ であった。

一方 BR D96N/Rh-loop3 についてはそのフォトサイクルは BR wt/Rh-loop3 のものと大きく異なり、光励起後 100 μs 以降に存在する過渡的な中間体としては M 中間体のみが観測された。さらに驚くべき事に Turn over 速度が野生型 BR のものより 1000 倍以上遅い $9.6 \pm 0.6 \text{ s}$ であることが明らかになった。そして pH を上げるとその速度はさらに遅くなり、 $\text{pH} = 9$ では $78.6 \pm 1.0 \text{ s}$ となった。BR wt/Rh-loop3 と BR D96N/Rh-loop3 の間でこれほどまで Turn over 速度が異なるのに対し、トランスデューシン活性化能が同程度であることはロドプシンによるトランスデューシンの活性化と活性中間体の寿命の間に相関がないことを示唆している。

【参考文献】 1. Geiser *et al.*, *Protein Sci.* (2006) 15, 1679-1690.

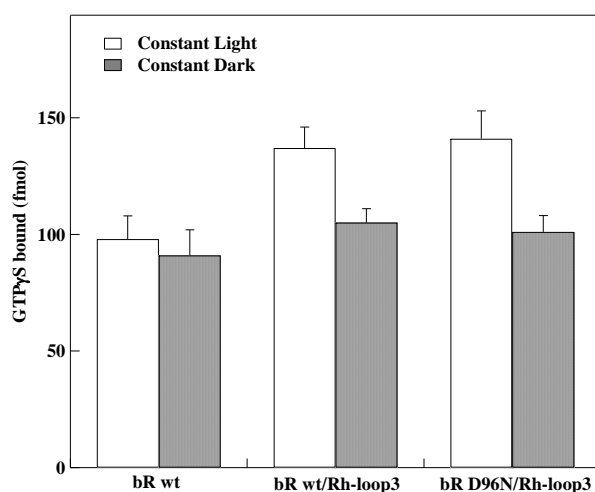


図 2 野生型 BR および BR/Rh-loop3 のトランスデューシン活性化能

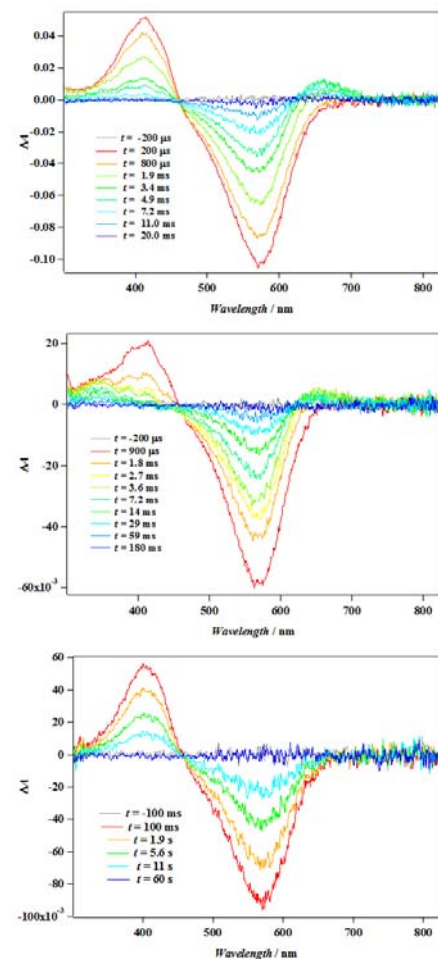


図 3 野生型 BR および BR/Rh-loop3 の過渡吸収スペクトル