

3B15

ヒドロキシルアミン存在下でのウシロドプシンの赤外分光解析

(名工大院工¹・分子研²) ○片山耕大¹、古谷祐詞^{1,2}、神取秀樹¹

【序】ロドプシン ($\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$) は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一員であり、発色団として 11-*cis* レチナールが Lys296 とプロトン化シッフ塩基を形成している^[1]。シッフ塩基は暗の中ではヒドロキシルアミンと反応しないが、照射による中間体形成に伴い、レチナールオキシムを形成することで解離する。このようにヒドロキシルアミンとの反応はロドプシン研究においてよく利用されるが、反応メカニズムを構造基盤に立って研究した例はほとんどなかった。

そこで我々は本研究において、レチナールシッフ塩基近傍の構造情報及びロドプシンの活性化における構造変化を理解するため、ヒドロキシルアミン存在下でのウシロドプシンの赤外分光解析を試みた。過去の研究によれば、赤外分光に通常、用いられる水和フィルム試料では、ロドプシンと G タンパク質との相互作用を観測することができず、赤外差スペク

トルを測定するためには溶液環境が必須であると結論した^[2]。一方、本研究ではヒドロキシルアミン程度の小分子であれば、水和フィルム試料においても反応が進行することがわかった。ヒドロキシルアミンは 240 K で生成する Meta-I 中間体 ($\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$) のシッフ塩基とは反応しない一方、280 K で生成する Meta-II 中間体 ($\lambda_{\max} = 380 \text{ nm}$) のシッフ塩基とは容易に反応しレチナールオキシム ($\lambda_{\max} = 368 \text{ nm}$) を形成した^[3]。さらに 265 K での測定により、ヒドロキシルアミンとの時間依存的な反応過程を捉えることにも成功した^[3]。これらの反応過程は紫外可視吸収分光を用いて生成物を確認する一方、全く同じ条件で赤外分光解析を行った。本発表では、赤外分光解析により明らかになったロドプシンの活性化過程におけるヒドロキシルアミンとの反応メカニズムについて議論したい。

そこで我々は本研究において、レチナールシッフ塩基近傍の構造情報及びロドプシンの活性化における構造変化を理解するため、ヒドロキシルアミン存在下でのウシロドプシンの赤外分光解析を試みた。過去の研究によれば、赤外分光に通常、用いられる水和フィルム試料では、ロドプシンと G タンパク質との相互作用を観測することができず、赤外差スペク

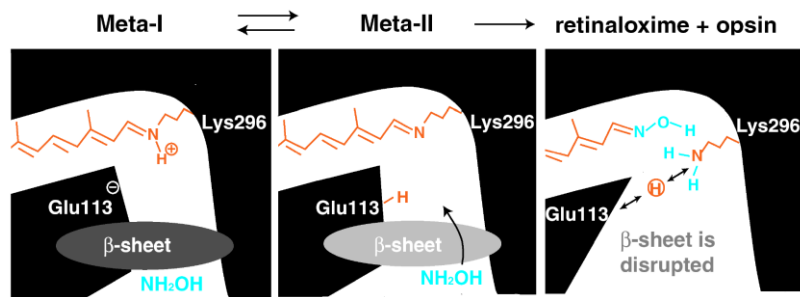


図 1: ヒドロキシルアミンとレチナールシッフ塩基との反応スキーム。ヒドロキシルアミンは Meta-I 中間体のシッフ塩基と反応しない。一方、Meta-II 中間体で反応が可能となりレチナールオキシムが形成されるが、このとき段階的なβシートの構造変化を観測した。レチナール結合部位に蓋をするような形で存在するβシートの構造変化がヒドロキシルアミンとの反応を誘導するものと考えられる。

【実験】ウシ網膜の外節膜 (ROS) に存在する桿体視物質ロドプシンを pH 7.0、2 mM リン酸緩衝液に最終濃度 0.8 mg/mL ($A_{500 \text{ nm}}=0.8 \text{ OD}$) になるように懸濁した。100 mM ヒドロキシルアミン存在下/非存在下における ROS 溶液 50 μL を BaF₂ 製の赤外窓板に滴下し乾燥フィルムを作製した。H₂O または D₂O で水和後、温度を 240 K、265 K、280 K に保ち、照射前後における可視吸収差スペクトル及び赤外差スペクトルを測定した。

【結果と考察】 図 2 (a) は 240 K におけるヒドロキシルアミン存在下および非存在下でのウシロドプシンの光照射前後の可視吸収差スペクトルを示す。459 nm、535 nm に正負のピークを持った

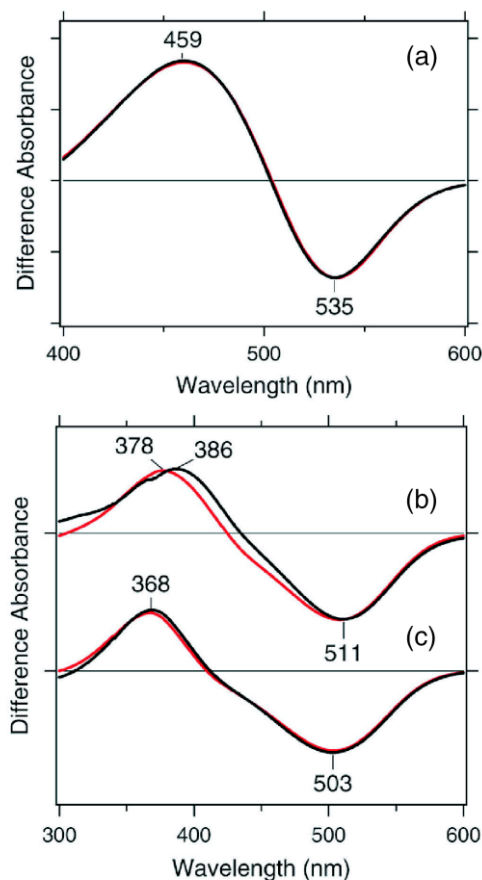


図 2: ウシロドプシンの光照射前後の可視吸収差スペクトル (pH 7)。 (a) 水和フィルム試料に対する 240 K での測定。赤線; ヒドロキシルアミン存在下、黒線; ヒドロキシルアミン非存在下。 (b) ヒドロキシルアミン非存在下における 280 K での測定。赤線; 水和フィルム試料。黒線; 溶液試料。 (c) ヒドロキシルアミン存在下における 280 K での測定。赤線; 水和フィルム試料。黒線; 溶液試料。

この形は典型的な Meta-I/ロドプシンの差スペクトルであり、ヒドロキシルアミン存在下および非存在下のスペクトルが一致したことから、ヒドロキシルアミンは Meta-I のシッフ塩基と反応しないことがわかった。赤外差スペクトルも類似していたが、興味深いことにシッフ塩基や水分子の水素結合にヒドロキシルアミン依存的な変化が観測された^[3]。ヒドロキシルアミンはレチナール結合部位に入り込めない一方、シッフ塩基部位の水素結合ネットワークに影響を与えることがわかった。

図 2 (b, c) は、Meta-II を生成する 280 K で測定した結果を示すが、溶液中だけでなく水和フィルム試料においてもヒドロキシルアミン存在下ではレチナールオキシムが生成することがわかった。水和フィルム試料中ではロドプシンは G タンパク質と複合体を形成しなかったが^[2]、ヒドロキシルアミンのような小分子であれば水和フィルム試料中でもシッフ塩基と反応してレチナールオキシムを形成することがわかった。レチナールオキシムの形成は、より低い 265 K においても時間依存的に見出されている。次に、赤外差スペクトルを比較したところ、Meta-II とレチナールオキシムでは大きく異なったスペクトルが得られた。特に興味深かったのは、ロドプシンの 1619 cm^{-1} の信号が Meta-II で、さらに 1639 cm^{-1} の信号がレチナールオキシムの生成によって消失した点であり、これらはいずれも β シートに由来すると解釈できる^[3]。7 回膜貫通の α ヘリックス構造から形成されるロドプシンには、レチナール結合部位を

構成する細胞外側領域だけに β シート構造が存在しているため、観測された β シートの構造変化は発色団に蓋をするように存在するこの部分の変化を反映していると考えられる。ロドプシンが Meta-II の段階で G タンパク質を活性化するのは反対側の細胞質側表面で起こるが、この段階では細胞外側領域にも大きな構造変化が誘起されることが明らかとなった。

【参考文献】

- [1] H. Kandori, *cis-trans Isomerization in Biochemistry*; Wiley-VCH, 2006, 53-75.
- [2] S. Nishimura, J. Sasaki, H. Kandori, T. Matsuda, Y. Fukada, A. Maeda, *Biochemistry* 1996, 35, 13267-71.
- [3] K. Katayama, Y. Furutani, H. Kandori, *J. Phys. Chem. B* 2010, 114, 9039-46