

全反射赤外分光法によるサル緑感受性視物質の クロライドイオン結合機構解析

(名工大院工¹, 分子研生命錯体², 京大霊長研³) ○片山 耕大¹, 古谷 祐詞^{1,2},
今井 啓雄³, 岩城 雅代¹, 神取 秀樹¹

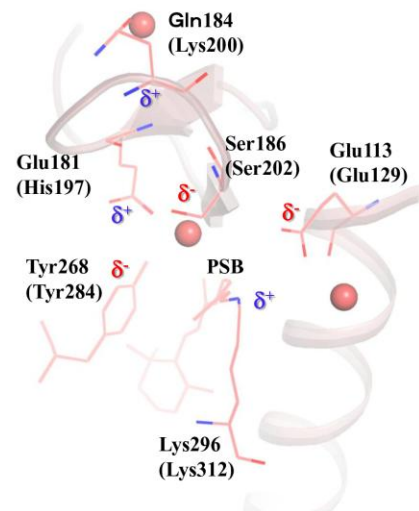
ATR-FTIR study for chloride binding mechanism of monkey green-sensitive visual pigment

(Department of Frontier Materials, Nagoya Institute of Technology¹, Department of Life and Coordination-Complex Molecular Science, Institute for Molecular Science², Primate Research Institute, Kyoto University³) ○Kota Katayama¹, Yuji Furutani^{1,2}, Hiroo Imai³,
Masayo Iwaki¹, Hideki Kandori¹

【序】我々が様々な色を識別できるのは、吸収極大波長の異なる3種類の色覚視物質が網膜に存在するからである。これらは全て同一の発色団分子 11-*cis* 型レチナールをもつが、オプシンと呼ばれるタンパク質部分がレチナールの電子状態を制御する結果、色の識別が可能になる。それに加えて色覚視物質の中には、塩化物イオン (Cl⁻) が結合すると吸収波長が長波長シフトするグループ (グループ L) があり、その波長シフトの分子機構が注目されている。特にヒトやサルの緑・赤感受性視物質はともにグループ L に属し、遺伝子重複によって発現した視物質である。従って、サル緑・赤感受性視物質の Cl⁻ 結合部位の構造解析を行い、両視物質間における Cl⁻ 結合機構が同じなのか、異なるのか、構造基盤に立って解析することは興味深い。これまで我々は、培養細胞により発現させたサルの緑・赤感受性視物質に対し低温赤外分光法を適用させることで、霊長類色覚視物質の構造解析を初めて実現し¹、内部結合水の同定にも成功²、最近では部位特異的な変異タンパク質に対する精度の高い計測も達成している。

今回我々は、サル緑感受性視物質に対し、エバネッセント波を利用して水溶液中でのスペクトル測定が可能な全反射赤外分光法を活用し、塩 (Cl⁻) 存在下/非存在下での赤外差スペクトルを測定し、Cl⁻ 結合部位の構造情報を直接得ることに成功したので報告する。さらに、同様にしてタンパク質内部に Cl⁻ を結合させる微生物型ロドプシン (ハロロドプシン) とのスペクトル比較、及び各種異なるイオン間 (Br⁻, I⁻, NO₃⁻) での交換差スペクトル計測により、色覚視物質における詳細な Cl⁻ 結合機構の解明を目指した。

【実験】HEK293T 細胞株により、サル緑感受性視物質を発現し、界面活性剤による可溶化、抗体カラムによる精製の後、PC リポソームへ再構成した。0.1 mg のタンパク質を 10 μL 全



サル緑・赤感受性視物質における Cl⁻ 結合に重要な領域を示す。His 197 及び Lys 200 が結合サイトの一端を担う³。また表示されたアミノ酸はロドプシンに対応しており、括弧内は色覚視物質に対応する。

反射赤外分光装置のダイヤモンドプリズム上に滴下し、窒素雰囲気下で乾燥させた後に、緩衝液 (200 mM phosphate [pH 7.25], 10 mM NaCl) を環流させた。その後、塩あり/なしにおける赤外差スペクトルを計測した。イオン交換スペクトル計測では 10 mM phosphate [pH 7.25] に 10 mM の NaCl もしくは NaBr, NaNO₃, NaI を混合した緩衝液間での差を計測した。また、NaNO₃ のタンパク質内部への結合シグナルを同定する為に、硝酸の安定同位体標識試料 Na¹⁵NO₃ に対する NaCl とのイオン交換赤外差スペクトルも計測した。

【結果と考察】 図 2 は、サル緑感受性視物質に対し、Cl⁻の結合解離により誘起された赤外差スペクトルを表わしている。得られたスペクトルにおいて、1637 (-)/1620 (+) cm⁻¹ 対バンドは、典型的なβ-シートの amide-I バンドに対応する振動数である。過去の部位特異的な変異タンパク質に対する実験により、タンパク質の細胞外側に存在する領域が Cl⁻結合サイトの一端を担うと報告されており³、この領域がβ-シートを形成すると考えられる。また興味深いことに、観測された対バンドにおいて、ポジティブ側 (Cl⁻結合型) でのバンド強度が大きく現れている。この結果は Cl⁻のタンパク質内部への結合が、積極的にβ-シートの構造安定化に寄与していることを示唆している。一方で、ポジティブ側に観測される 1745 (+) cm⁻¹ バンドは、プロトン化カルボン酸の C=O 伸縮振動バンドであると考えられる。この結果は、Cl⁻非結合型ではバンドが確認されないことから、Cl⁻の結合に伴いプロトン化するカルボン酸が存在することを示している。このように今回得られた赤外差スペクトルは、X 線結晶構造が未だに解かれていない色覚視物質に対し、Cl⁻のタンパク質内部への結合に伴う構造変化を捉えるに至った。

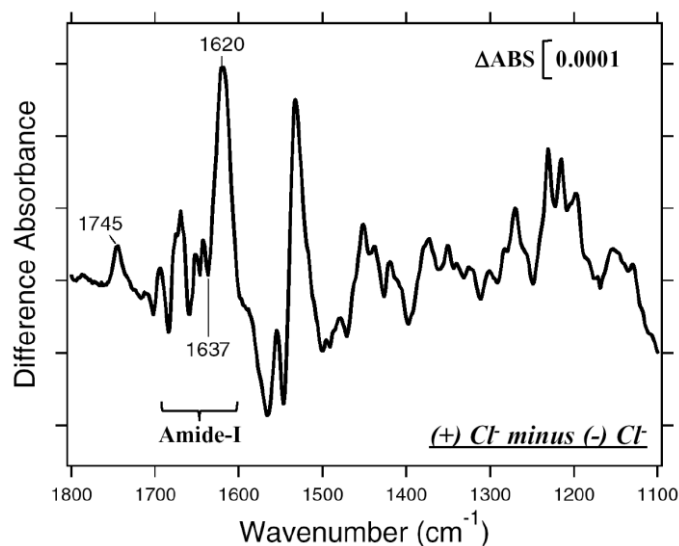


図 2 293 K で測定した 1800-1100 cm⁻¹ 領域におけるサル緑感受性視物質に対する Cl⁻の結合解離に伴う構造変化 塩 (Cl⁻) 存在下/非存在下における差スペクトルを計測しているため、ポジティブ側、ネガティブ側はそれぞれ Cl⁻結合型、解離型に対応する。

本発表では他の振動バンドの由来についても議論したい。また Cl⁻結合部位をもつ微生物型ロドプシン (ハロロドプシン) の結果と比較することで、Cl⁻結合機構について考察し長波長シフトをもたらす分子メカニズムについて議論したい。

- 【引用文献】 1. Katayama, K., Furutani, Y., Imai, H., and Kandori, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 891-894 (2010).
 2. Katayama, K., Furutani, Y., Imai, H., and Kandori, H., *Biochemistry* **51**, 1126-1133 (2012).
 3. Wang, Z., Asenjo, A. B., and Oprian, D. D., *Biochemistry* **32**, 2125-2130 (1993).