

4P064

全反射赤外分光法で見るサル緑感受性視物質の陰イオン結合

(名工大 院工¹, ケース・ウェスタン・リザーブ大², 京大 霊長研³)

○ 中村 駿太¹, 片山 耕大^{1,2}, 岩城 雅代¹, 今井 啓雄³, 神取 秀樹¹

ATR-FTIR study of anion binding to monkey green sensitive visual pigment

(Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology¹, Case Western Reserve University², Primate Research Institute Kyoto University³)

○ Shunta Nakamura¹, Kota Katayama^{1,2}, Masayo Iwaki¹, Hiro Imai³, Hideki Kandori¹

【序】動物の網膜には、明暗を認識する桿体視物質と、色覚を認識する錐体視物質が存在する。これらは、7回膜貫通ヘリックス構造のGタンパク質共役受容体のひとつであり、発色団として11-cis レチナールをもつ。我々、ヒトを含む霊長類は3種類の錐体視物質をもち、特に赤・緑感受性視物質はLグループ視物質に属する。Lグループ視物質は、錐体視物質の中でも最も長波長に吸収極大をもつグループであり、塩化物イオン(Cl⁻)がタンパク質内部に結合することで吸収極大が長波長へシフトする。Cl⁻の結合には、細胞外第2ループのHis197とLys200が大きく関与していることが分かっているが¹、それ以外の構造情報についてはほとんど分かっていない。

今回、我々はサル緑感受性視物質に対し、タンパク質の陰イオン選択的構造変化を捉え、陰イオンが波長制御に及ぼす影響を検討することを目的とし、エバネッセント波を利用して分子振動を捉えることが可能な全反射赤外分光測定を行った。Cl⁻、NO₃⁻、N₃⁻を含むバッファーと含まないバッファーを交互に流すことで赤外差スペクトルを測定した。

【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、1D4抗体カラムによる精製の後、PCリポソームへと再構成した。0.1 mgの再構成ペレットを、45 μlのバッファー(2 mM phosphate, 10 mM NaCl, pH 7.25)で懸濁後、そのうち5 μlをATRシリコンプリズム上に滴下し、窒素雰囲気下で乾燥させた。各種アニオンを加えたバッファー(200 mM phosphate, pH 7.25)を用いて、バッファー交換による赤外差スペクトルを測定した。Cl⁻、NO₃⁻は、10 mMと0 mMの陰イオンが含まれたバッファーを、N₃⁻は20 mMと0 mMの陰イオンが含まれたバッファーを用いて測定した。

【結果と考察】各種アニオンのバッファー交換により誘起された赤外差スペクトルを図2に示す。(a)はCl⁻の結合により得られたスペクトルである。(b),(c)は、NO₃⁻、N₃⁻の結合によって得られたスペクトルであり、両者は類似しているのに対し、

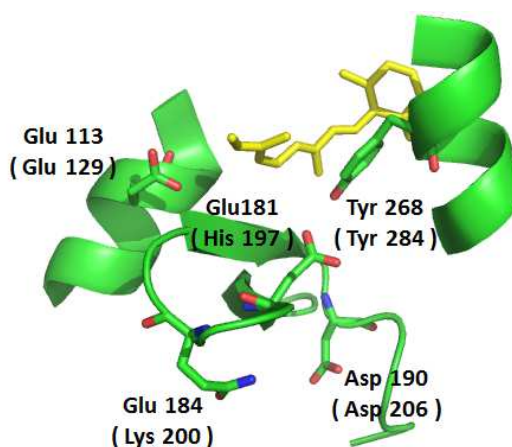


図1 ウシロドプシンにおける発色団レチナール周辺のX線結晶構造

Cl⁻の結合によって得られたスペクトル (a) は (b), (c) とは異なる結果となった。タンパク質の二次構造を反映するアミド I 領域 (1690-1620 cm⁻¹)、アミド II 領域 (1590-1510 cm⁻¹) が大きく異なっており、これは、Cl⁻の結合に伴うタンパク質内部の構造変化が、NO₃⁻や N₃⁻の結合によるものとは異なることを示唆する。1500-1600 cm⁻¹ 領域には、アミド以外にレチナールの C=C 伸縮振動のモードが現れる。低温赤外分光測定の結果から、レチナールの C=C 伸縮振動のバンドが、Cl⁻結合型で 1534 cm⁻¹に、NO₃⁻結合型で 1540 cm⁻¹に現れる

ことが分かっている。今回の結果で、Cl⁻の結合における 1532 cm⁻¹、NO₃⁻の結合における 1538 cm⁻¹、N₃⁻結合における 1534 cm⁻¹はレチナールの C=C 伸縮振動を反映していると考えられる。1745 cm⁻¹にみられるバンドは、プロトン化カルボン酸による信号が候補としてあげられ、Cl⁻の結合に伴い、結合サイト付近のカルボン酸がプロトン化していると考えられる。また、1200-1300 cm⁻¹ 領域においても、Cl⁻の結合による特異的なレチナールもしくはアミノ酸の変化が現れている。

図 3 は、光反応後のオプシンに対して、Cl⁻、NO₃⁻の結合により誘起された赤外差スペクトルを測定した結果である。

その結果、Cl⁻、NO₃⁻ともにフラットな信号が得られた。また、光反応前後で、Cl⁻の解離と思われる信号が得られた。これは、暗状態で保たれていたアニオン結合部位が、レチナールの異性化とともに構造変化を引き起こし、アニオンが結合できない状態となっていると考えられる。過去の研究で、光反応過程で Cl⁻が解離することが示唆されており²、今回の結果はこれと一致する。

本発表では、これらの Cl⁻の結合により特異的に引き起こされた構造変化に着目し、Cl⁻結合部位を形成しているアミノ酸について議論し、長波長シフトの要因と関連付けていきたい。

【引用参考文献】

1. Wang, Z., et al., *Biochemistry* 32, 2125-2130 (1993).
2. Tachibanaki, S., et al., *Biochemistry* 34, 13170-13175 (1995).

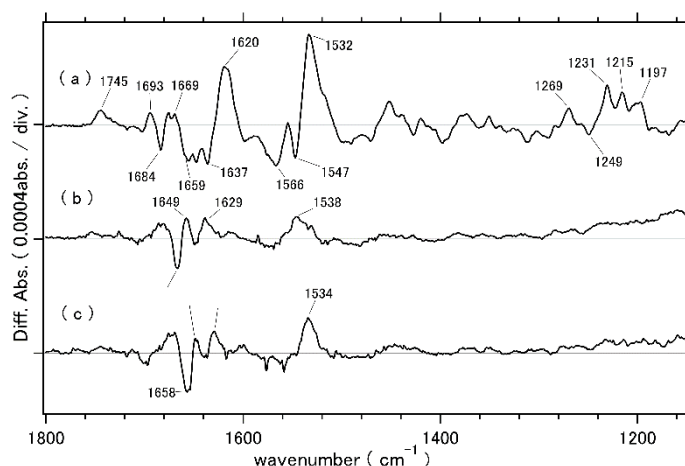


図 2 1800-1150 cm⁻¹ 領域におけるサル緑感受性視物質の各種アニオンの結合による赤外差スペクトル (a) Cl⁻ (b) NO₃⁻ (c) N₃⁻

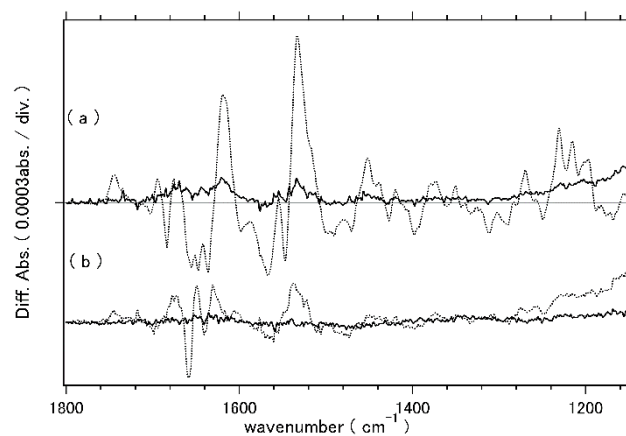


図 3 1800-1150 cm⁻¹ 領域における光反応後のサル緑感受性視物質のオプシンに対する各種アニオンの結合による赤外差スペクトル (a) Cl⁻ (b) NO₃⁻