

2A08 センサーロドプシン II - トランスデューサタンパク質複合体の光反応ダイナミクス

(京大院理¹・阪大院理²・テキサス大³)。井上圭一¹，西奥義憲¹，森崎雅世²，佐々木純³，徳永史生²，寺嶋正秀¹

【序】古細菌はその細胞膜中に様々な光受容タンパク質を持ち、それを利用して光のエネルギーを生体エネルギーに変えたり、走光性の発現などの生体活動に役立てている。そのような光受容タンパク質の一つであるセンサーロドプシン II (SRII) は光を受け取ると、古細菌の負の走光性をもたらす信号を相手方の膜タンパク質であるトランスデューサタンパク質 (HtrII) に伝達する。SRII と HtrII の間に行われるタンパク間情報伝達の機構を詳細に調べることは、生物の細胞内シグナル伝達に対して重要な知見を与えるとして期待されている。光励起された SRII では発色団の all-trans レチナールが 13-cis レチナールに異性化した後、レチナールとタンパク質を架橋しているシッフ塩基からプロトンが放出される。このプロトンは SRII のアミノ酸残基の間で受け渡され、それに伴いタンパク質の構造が変化する。光入射後の SRII はいくつかの構造の異なる中間体を経て元の基底状態に戻り、反応フォトサイクルを形成する。一般にこの構造変化を介して SRII は HtrII と相互作用すると考えられており、その機構を調べるにはフォトサイクルの解明が必須である。しかし、このダイナミクスは非常に複雑で、決定的なモデルは提唱されていない。そこで本研究では過渡回折格子 (TG) 法を用いることでフォトサイクルの解明を試み、さらに生理学的条件下での信号伝達過程の検出を目指した。

【実験】本研究では *Natronobacterium pharaonis* から得た SRII (pSRII) を界面活性剤 Dodecylmaltoside に可溶化させたものと、pSRII にペプチドリンカーを介して HtrII の生体膜部分に当たる N 末端側の 159 残基部分を結合させた pSRII-ΔpHtrII を同様に可溶化させたものの 2 種類をサンプルとして用いた。両サンプルともタンパク質濃度は 200 μM とした。測定には吸収変化を伴わない構造変化を観測できる TG 法を主に用いた。励起光として XeCl Excimer レーザー励起の色素レーザーの光 (465 nm) を用いて光強度は < 1 μJ とした。特に定量測定ではタンパク質の多光子励起を防ぐために 0.6 μJ 以下とした。またプローブ光として 780 nm のダイオードレーザーを用いた。このプローブ波長では TG 信号には分子の屈折率変化のみが寄与する。



図1 pSRII-ΔpHtrII 複合体構造

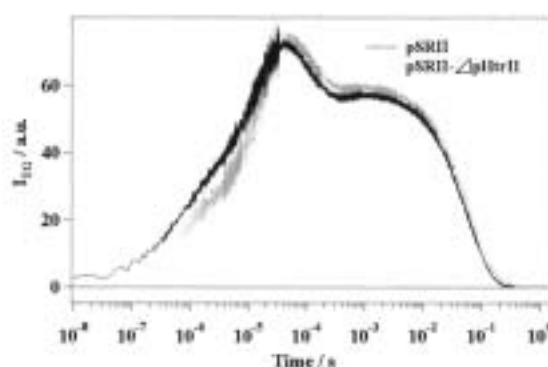


図2 pSRII および pSRII-ΔpHtrII 複合体の TG 信号

【結果】測定されたTG信号を図2に示す。pSRII、pSRII- Δ pHtrIIともTG信号は7つの指数関数の和の形で表される。最初の立ち上がりは、励起されたpSRIIが $pSRII^* \rightarrow K \rightarrow L \rightarrow M$ と異なる中間体へと順次変化していく過程に対応し、100 μ s程の時間には励起された分子から放出された熱の拡散成分が減衰の形で現れている。更に $M \rightarrow M' \rightarrow M'' \rightarrow O$ と変化し、最終的に数百 ms 後、基底状態に戻る様子が観察された。このようにして各々の変化成分の寿命を元にpSRIIのフォトサイクルは図3のように決定された。また、信号の最後の部分は分子が反応して基底状態に戻る過程と溶液中を拡散して過渡回折格子構造が失われる過程の二つの速度定数の和で減衰している。生成される回折格子の格子波数(q)を変化させることで溶液中の分子の並進拡散定数(D)を決定した結果、pSRII、pSRII- Δ pHtrIIの分子拡散定数はそれぞれ $D = 3.4 \times 10^{-11}$ 、 1.8×10^{-11} m^2/s の値を持つことがわかった。pSRII- Δ pHtrIIのStokes半径がpSRIIのものより約1.9倍大きいということは体積では6.7倍程度大きいことを意味し、pSRIIとpSRII- Δ pHtrIIの分子量の比が1.7倍程度であることを考慮すると、この複合体が室温溶液中の界面活性剤内においてX線結晶構造解析から予想されるようなダイマーを形成していることを示唆する。

TG信号には、光励起されたpSRIIが緩和することにより溶液中に放出した熱由来の信号が見られる。この成分の振幅を熱的参照試料のものと比べることにより、各々の中間体の基底状態からのエンタルピー変化(ΔH)を決定することが出来る。pSRII、pSRII- Δ pHtrIIのL、M中間体の ΔH を求めると、pSRIIではそれぞれ $\Delta H = 170$ kJ/mol、60 kJ/molであった。一方pSRII- Δ pHtrIIではそれぞれ $\Delta H = 80$ kJ/mol、80 kJ/molで、L中間体のエネルギーレベルが大きく下がっており(図4)、pSRIIのこの中間体は Δ pHtrIIと複合体を形成することで大きく安定化されていることが分かった。

また $O \rightarrow pSRII$ の過程に対応する変化成分の振幅が両サンプルの間で異なっており、pSRII- Δ pHtrII複合体はpSRIIのものとは比べこの過程において 12 ± 3 cm^3/mol のより大きな収縮が、また $M'' \rightarrow O$ の過程では逆により大きい膨張が起きていることがわかった。このことはフォトサイクルの中間体のうちO中間体においてpSRII- Δ pHtrIIはpSRIIよりも基底状態から膨張していることを示している。この体積変化はpSRIIからのシグナル伝達を受けて Δ pHtrIIが生じた構造変化に対応すると考えられる。本研究において初めて、生理学的条件下において実時間でpSRII、 Δ pHtrII間のタンパク質間情報伝達過程を観測することに成功したと言える。

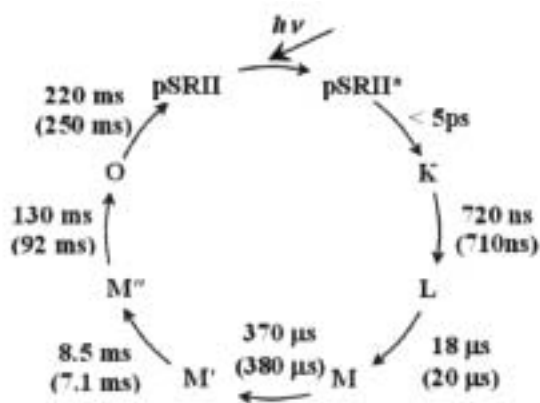


図3 TG法により決定されたpSRIIのフォトサイクル()内はpSRII- Δ pHtrIIの値)

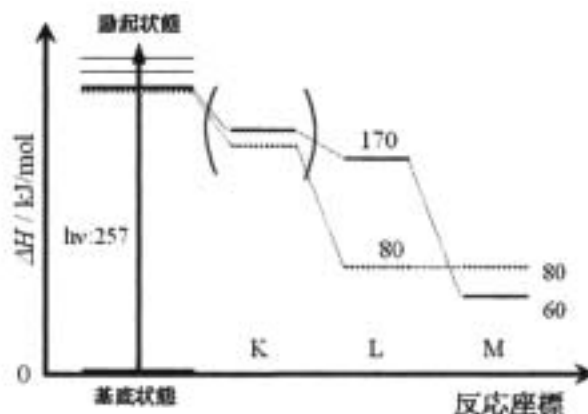


図4 pSRIIのフォトサイクルの初期段階におけるエンタルピー変化