

4A02 赤外分光法によるファラオニスフォボロドプシンの情報伝達過程での構造変化および相互作用変化の解析

(名工大院工¹・CREST/JST²・理研 GSC³・北大院薬⁴)

○古谷祐詞^{1,2}、須藤雄気¹、下野和実³、加茂直樹⁴、神取秀樹^{1,2}

【序】 光、臭い、味、神経伝達物質、ホルモンなど様々な刺激の受容体が細胞内へ情報伝達する分子メカニズムを理解するには、刺激受容に伴う受容体自身の構造変化と、情報伝達タンパク質との相互作用変化を明らかにする必要がある。光センサータンパク質は、ファラオニスフォボロドプシン(*ppR*)を含めて、いくつかの立体構造が X 線結晶構造解析により明らかにされている。また、活性化状態に至る構造変化を光で開始できるので計測しやすい利点があり、受容体の構造変化および相互作用変化を原子レベルで解析するのに最も適している。

本研究の対象となる *ppR* は古細菌 *Natronomonas pharaonis* の負の走光性の光センサーとしてはたらく、情報伝達タンパク質である *pHtrII* と 2:2 の比率で複合体を形成している (Figure 1)。タンパク質内部に結合したレチナールが光を吸収すると *all-trans* 型から *13-cis* 型へ異性化し、K 中間体を形成する。その後、*pHtrII* との相互作用が 100 倍程度弱くなる M 中間体を形成し、再び *all-trans* 型に熱異性化した O 中間体を経て、元に戻る光反応サイクルを示すことがわかっている。しかし、レチナールの光異性化による *ppR* の構造変化がどのようにして *pHtrII* に伝えられるのか、そのメカニズムは未解明である。

我々は、これまでに 77 K で測定した K 中間体と照射前の状態との赤外差スペクトルから、*ppR/pHtrII* 複合体特異的に 3479, 3369 cm^{-1} のバンドが現れることを明らかにした¹ (Figure 2)。これらのバンドは *ppR* の T204A 変異体と *pHtrII* との複合体では現れないことから、Thr204 の O-H 伸縮振動と帰属した²。3479 cm^{-1} から 3369 cm^{-1} への大きな低波数シフトは、Thr204 が K 中間体の形成に伴って、複合体形成時に限り、水素結合を強めることを示唆している。本研究では、活性中間体である M 中間体において、*ppR* から *pHtrII* への情報伝達過程での構造変化および相互作用変化を原子レベルで明らかにすることを目的としている。

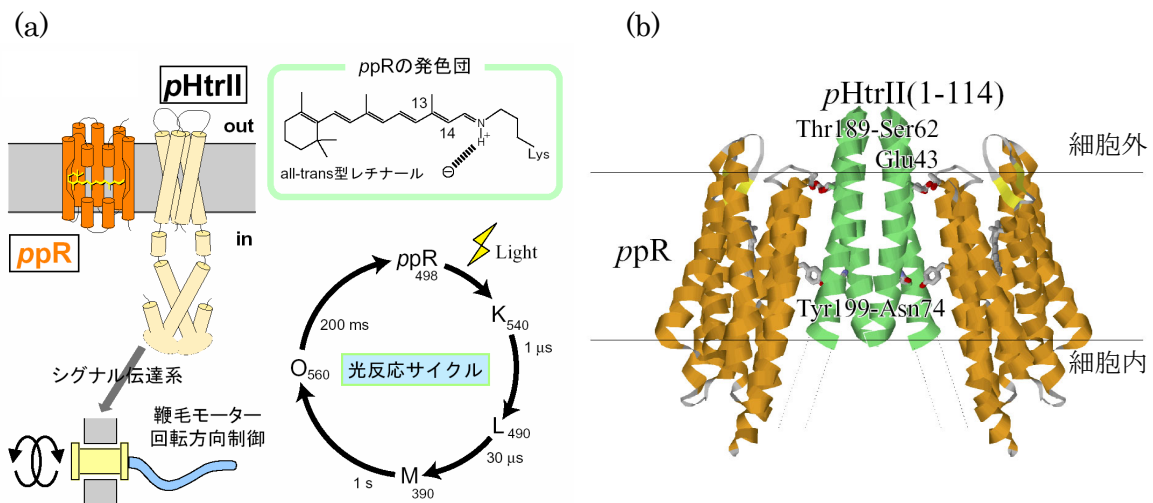


Figure 1 (a) *ppR* と *pHtrII* は負の走光性を担う光センサー機能をもつ。光反応サイクルに示した数字は吸収極大波長と崩壊の時定数。(b) *ppR* と *pHtrII* の複合体の X 線結晶構造。*pHtrII* は 573 残基中 1-82 番目までの膜貫通ドメインが解かれている。

【実験方法】 *ppR* および *pHtrII*(1-159 番目のアミノ酸残基まで)は大腸菌 BL21(DE3)を用いて発現し、膜各分を界面活性剤 *n*-dodecyl- β -D-maltoside で可溶化した後に、Ni-NTA アガロースカラムで精製した。*ppR* 単体溶液および *ppR* と *pHtrII* が 1:1 のモル比で混合した複合体溶液を PC リポソームに再構成した後に、80 μ L (約 3 mg/ml の *ppR* 濃度) を赤外窓板上で乾燥させ、フィルム試料を得た。1 μ L 程度の水 (H_2O , D_2O , $D_2^{18}O$) を試料近傍に置き、密閉することにより、試料を水和した。その後、M 中間体の安定化温度である 250 K まで冷却し、光照射前後の赤外差スペクトルを測定した。

【結果と考察】 単体と複合体の赤外差スペクトルを解析したところ、M 中間体では情報伝達タンパク質である *pHtrII* の水素結合にも変化が生じることがわかった。複合体および単体の M/*ppR* 赤外差スペクトルを引き算することにより、複合体に特異的なバンドとして 1693, 1684 cm^{-1} にバンドが現れた (Figure 3)。これは *pHtrII* の N74T 変異体との複合体では消失することから、Asn74 の側鎖の C=O 伸縮振動と帰属した³。M/*ppR* 赤外差スペクトルでは複合体と単体とで amide I にほとんど違いが見られないことから、*pHtrII* に二次構造変化は生じていないことが示唆された。また、高波数領域からは、Thr204 が M 中間体では元の状態に緩和していることがわかった³。

以上の結果をまとめると、*ppR* から *pHtrII* への情報伝達は Thr204 から Asn74 への水素結合ネットワークを介して行われると考えられ、*pHtrII* からさらに下流の情報伝達タンパク質への情報伝達は二次構造変化を伴わない剛体的なヘリックスの配置変化により制御されている可能性が示唆される。

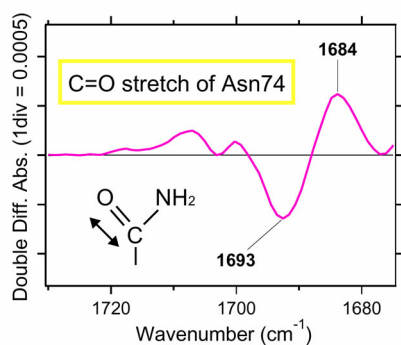


Figure 3 M/*ppR* 赤外差スペクトル (3600-3250 cm^{-1}) 複合体から単体を引き算して、複合体特異的なバンドを抽出した。

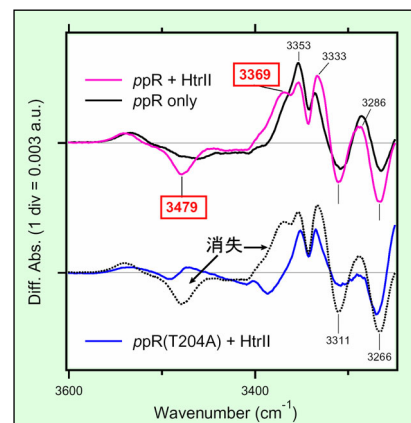


Figure 2 K/*ppR* 赤外差スペクトル (3600-3250 cm^{-1}) (上) *ppR* 単体と *ppR/pHtrII* 複合体の比較 (下) *ppR* の T204A 変異体と *pHtrII* との複合体。

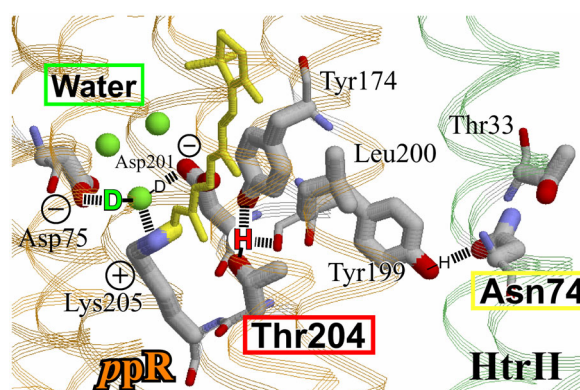


Figure 4 本研究で明らかになった *ppR* から *pHtrII* への情報伝達経路 レチナルの光異性化反応により、Thr204 の水素結合変化、M 中間体の形成に伴って Asn74 の水素結合変化が生じる。

- [1] Y. Furutani, Y. Sudo, N. Kamo and H. Kandori, (2003) *Biochemistry* 42, 4837-4842.
 [2] Y. Sudo, Y. Furutani, K. Shimono, N. Kamo and H. Kandori, (2003) *Biochemistry* 42, 14166-14172.
 [3] Y. Furutani, K. Kamada, Y. Sudo, K. Shimono, N. Kamo and H. Kandori, (2005) *Biochemistry* 44, 2909-2915.