

1P110

タコロドプシンの光反応ダイナミクスの研究

(京大院理* , 兵庫県立大院生命理**) 井上圭一 * , 津田基之** , 寺嶋正秀 *

【序】生物の持つ細胞内受容体の中で、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は最も広く数多くの生物種に分布しており、光や化学物質など様々な外的刺激に対応してシグナル伝達を開始する。従って細胞内シグナル伝達の機構を理解する上でGPCRは非常に良いモデル系となっており、生物学および医学的にも多くの研究がなされている。例えば、光受容のGPCRとして、ウシなどの脊椎動物のロドプシンが広く研究されてきた。しかし、脊椎動物のロドプシンは、光を吸収すると活性化状態になったあと、発色団であるレチナールがタンパク質から解離してしまう。一方、*Octopus defleini*(ミズダコ)の網膜中に含まれるタコロドプシンは青色光を受容することで活性化型へと変化し、G-タンパク質を活性化するにもかかわらず、活性化型であるAcid-Metarhodopsinが安定に存在するという特徴を持つ。興味深いことに、このAcid-Metarhodopsin(Acid Meta)はオレンジ光を吸収することで、不活性化型のRhodopsinへ変換される(逆反応)。つまりタコロドプシンは脊椎動物と全く異なる視覚制御のメカニズムを持っており、その光反応およびG-protein活性化の機構を調べることはGPCR系の受容体のシグナル伝達機構を知る上で新たな知見を与えると期待されている。とりわけこのタコロドプシンは、活性化状態から不活性化状態へ光を用いて変換できる逆反応プロセスを持つことが特徴的であるが、これまでのところタコロドプシンの逆反応についてはほとんど研究がなされていない。本研究では、その反応ダイナミクスを過渡回折格子(TG)法を用いて調べた。

【実験】TG信号測定のために、pump光として560 nmパルスレーザー光を、probe光として840 nmのCW光を用いた。活性化状態であるAcid Metaに変化させるために、界面活性剤に可溶化させたタコロドプシン溶液に、色ガラスフィルターを通したタングステンランプからの450 nm以下の青色光を長時間照射した。発色団近辺のダイナミクスを調べるため、過渡吸収(TA)測定を行った。この測定では、pump光として560 nmのパルスレーザー光、probe光としてXeランプの光の白色光源として使い、分光器を用いて分光した。また単一波長における吸収変化の時間測定のため、420 nmの光をprobeとして使い、その強度変化を光電子増倍管を用いて測定した。

【結果と考察】図1に、タコロドプシンの逆反応における吸収変化を示す(probe波長： $\lambda = 420$ nm)。この波長における吸収変化は、我々の装置の時間分解能以下(< 500 ns)の早い時間スケールで立ち上がった後、240 μ sの時定数を持つ減衰が見られ、その後は100 msまで一定の吸収強度を示した。またICCDカメラを用いた全波長における過渡吸収スペクトルの測定では、240 μ sに相当する時間領域で400 – 485 nmの領域に吸収の減衰が確認され、その後最終生成物と考えられるRhodopsinの吸収スペクトルへと変化した。このことから発色団近傍のAcid-Metaの構造は、240 μ sでRhodopsinのものへと緩和することがわかった。

一方、同様の条件でタコロドプシンの逆反応過程のTG信号を測定した。測定に用いたタコロドプシン溶液は、励起前にオレンジ光を用いてAcid-Meta状態へと変換されているもの

の、一部 Rhodopsin 状態のものが残っているため、測定された信号には 10 %程度、Rhodopsin Acid-Meta の反応過程に対応する信号の寄与が含まれる。この寄与を、測定された TG 信号から差し引くことで取り除いた、Acid-Meta Rhodopsin の寄与による TG 信号を図 2 に示す(格子波数: $q^2 = 5.8 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$)。この信号には、TA 測定で確認された 240 μs のダイナミクスの後の時間領域においても 100 ms の時間領域まで複数の変化成分が確認された。

この TG 信号は 5 つの指数関数の和で表される。格子波数 q を変えた測定より、このうちの 3 つのフェーズは、熱および分子種の拡散過程に対応すると帰属された。最も早いダイナミクスである最初の拡散過程は、拡散定数が熱的参照試料のものと一致していることから、励起された Acid-Meta から溶媒に発された熱の拡散である。一方、遅い二つの拡散過程については、順反応の TG 信号との比較から、最終生成物の Rhodopsin (拡散定数: $D = 6.13 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) および反応物の Acid-Meta ($D = 2.91 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) の拡散に対応すると帰属した。この拡散係数の大きさより、タコロドプシンの逆反応において拡散係数の増加が起こり、溶媒との相互作用の強さが大きく変化していることがわかる。可溶化する界面活性剤の種類を変えても、Rhodopsin と Acid-Meta の拡散係数の大きさはほぼ一定であったことから、二つの状態の拡散係数の変化はタンパク質分子の構造変化によって引き起こされたものだと考えられる。

一方 TG 信号で確認された 2 つの指数関数で表せられる成分は、その寿命が格子波数に依存しないことから、タンパク質の中間体の反応ダイナミクスに対応すると考えられる。早いほうの反応速度は、TA で測定されたものに一致したことから、発色団周りの構造変化に対応している。ところが、遅いほうの反応成分 (6 ms) については、この時間領域において吸収変化が見られなかった。よって、これは吸収変化を伴わない反応過程に対応する、発色団から離れた部分での体積変化によって現れた信号であり、この時間スケールで分子体積の収縮が起こっていることがわかった。以前の研究から、Rhodopsin Acid-Meta の順反応過程において分子の体積が増加することがわかっている¹⁾が、この逆反応のミリ秒領域での体積収縮は、順反応で起こった体積膨張の一部がこの反応過程で緩和していることを示しているであろう。こうした測定結果から、タコロドプシンの反応ダイナミクスを議論する。

1) Nishioku *et al.*, 2002, *Biophys. J.*, **83**:1136-1146

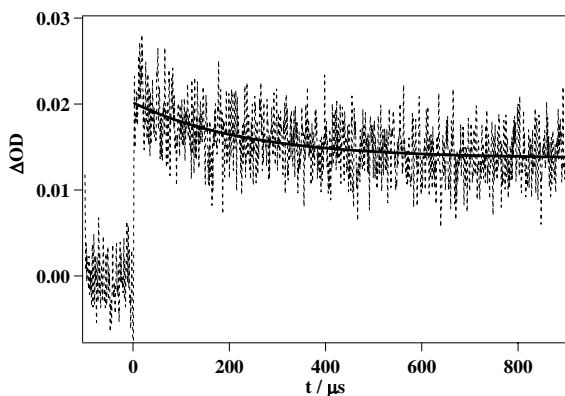


図 1 . タコロドプシン逆反応 TA 信号

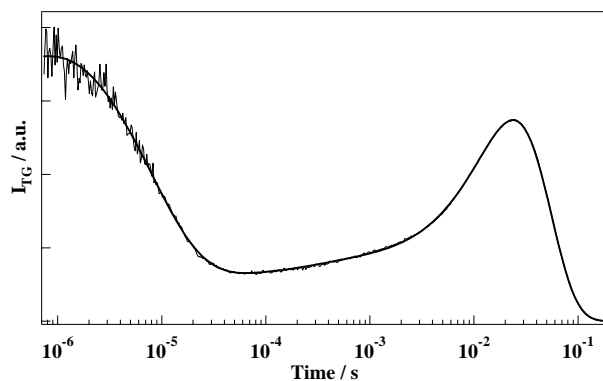


図 2 . タコロドプシン逆反応 TG 信号