

氏名	くわ 桑 田 おさむ 浩
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1393 号
学位授与の日付	平 成 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	錐体視物質アイオドプシンの構造に関する研究

論文調査委員 (主 査)
 教 授 大 西 俊 一 教 授 竹 市 雅 俊 教 授 志 村 令 郎

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の視覚受容の過程は、視細胞の外節部分において、色素蛋白質である視物質が光を吸収することによって開始する。視細胞は形態的に桿体と錐体に分類されるが、桿体は薄明りの中で明暗の識別を分担する一方、錐体は明るいところでの色の識別、すなわち色覚の受容に関与している。申請者は、色覚の受容機構を分子レベルで解明するため、ニワトリの赤色感受性の錐体視物質であるアイオドプシンについて、その構造に関する研究を行った。

まず申請者は、ニワトリ視細胞外節の抽出液からアイオドプシンおよびロドプシンを精製した。精製アイオドプシンを抗原として作製された4種類のモノクローナル抗体について、それらがアイオドプシンに対する高い特異性をもつことを、ウエスタンブロッティング法、続いて免疫沈降法と分光学的測定法を組み合わせた方法で検証した。この抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法でヒヨコにおけるアイオドプシンの組織分布を調べ、アイオドプシンが網膜にのみ存在することを明らかにした。さらに、これらの抗体の1つがアイオドプシンと結合することにより、アイオドプシンの構造が変化して吸収スペクトルの短波長移動が起こることを見いだした。

続いて申請者は、アイオドプシンの一次構造を解明するため、アイオドプシンをコードするcDNAの単離を試みた。アイオドプシンの部分アミノ酸配列をもとにして合成したオリゴヌクレオチドローブを用いて、ヒヨコ網膜のcDNAライブラリーのスクリーニングを行うことにより、1339塩基対からなるアイオドプシンcDNAのクローンを単離した。cDNAの塩基配列から予想されるアイオドプシンのアミノ酸配列は362アミノ酸残基からなり、桿体の視物質であるロドプシンの配列との類似性は42%であった。

アイオドプシンの一次構造をもとに、機能的に重要と考えられる構造をアミノ酸残基のレベルで考察した。まず、アミノ酸配列のハイドロパシープロファイルの検討から、アイオドプシンと同様に、7本の α ヘリックスが膜を貫通する高次構造をもつことが推定された。また、発色団の結合部位、糖鎖の結合部位、リン酸化を受ける部位などのロドプシンとの共通性が示された。

他方、ロドプシンでは脂肪酸の結合しているC末端付近のシステイン残基がアイオドプシンにはなかったため、この部分のロドプシンとアイオドプシンの機能の違いが示された。さらにアイオドプシンの発色団結合部位の近くに、ロドプシンにはない親水性のポケット様の構造が存在することが示唆された。

参考論文のうち1篇は、視覚の受容機構を分子レベルで平易に解説した総説である。他の1篇はアイオドプシンに関するこれまでの研究の成果を網羅した総説であり、いずれも申請者のこの分野に関する深い学識を示すものである。

論文審査の結果の要旨

視細胞における光受容を担う色素蛋白質である視物質のうち、桿体の視物質ロドプシンは、桿体だけをもつ動物を材料として多様な研究手法で解析が進められていた。他方、錐体を桿体から分離する方法がないために、錐体の視物質の研究はロドプシンに比べると遅れていたが、唯一、ニワトリの赤色感受性の錐体物質であるアイオドプシンについては、古くからその存在が知られていた。

申請者の所属する研究室では、従来からこのアイオドプシンの分光学的・蛋白質化学的性質をロドプシンとの比較をもとに解析してきた。その結果、発色団の結合の様式や塩素イオンによる吸収スペクトルの調節などの点でロドプシンとは異なる性質が見いだされ、桿体と錐体の機能の違いが視物質のレベルでも説明できる可能性が示された。そこで申請者は、錐体による色覚の受容機構を分子レベルで解明することを目標として、アイオドプシンを研究対象に選び、その構造に関する研究を行った。

そのための道具として申請者は、モノクローナル抗体を利用した。精製アイオドプシンを抗原として作製された4種のモノクローナル抗体について、これらがアイオドプシンに対する高い特異性をもち、高感度の検出法に用い得ることを示した。また、これらの抗体を用いた解析により、これらがアイオドプシンの構造の解析に役立つことを示した。

続いて申請者は、アイオドプシンの一次構造（アミノ酸配列）を解明するため、アイオドプシン遺伝子の単離を試みた。まず抗体を用いた方法でcDNAの単離を試みたが、成功しなかった。そこで、単離のための方針を変更した結果、アイオドプシンcDNAを単離することに成功した。cDNAの全塩基配列を決定することによりアイオドプシンのアミノ酸配列を明らかにした。

アミノ酸配列の検討から、アイオドプシンの高次構造といくつかの機能的な構造については、ロドプシンとの共通性が示された。ところがアイオドプシンの発色団の結合部付近については、ロドプシンにはない固有の構造の可能性が示唆された。この構造が存在するという考え方は、発色団の結合に関するアイオドプシン固有の性質をうまく説明するものである。

このように、アイオドプシンの一次構造が明らかになったことにより、錐体視物質の機能を分子レベルで検討する手がかりが得られた。また、遺伝子が単離されたことにより、遺伝子工学的手法を用いた構造と機能の解析が可能となった。従ってこの研究の成果は、生物物理学の分野での優れた業績と思われる。

以上により、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められた。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認められた。