

氏名	ふる くに ゆう じ 古 谷 祐 詞
学位の種類	博士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2820 号
学位授与の日付	平成 16 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	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	赤外分光法による脊椎動物および古細菌ロドプシンの光情報伝達機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 七田 芳 則 教授 藤 吉 好 則 教授 宮 田 隆

### 論 文 内 容 の 要 旨

視覚の光受容体ロドプシンや古細菌の光センサーであるフォボロドプシンは、レチナールを発色団としてもつ光受容タンパク質であり、光を吸収するとタンパク質部分の構造変化を起こして機能を発現する。本研究は、これらタンパク質部分の構造変化や、タンパク質内部に含まれる水分分子の環境変化、さらには、タンパク質分子間の相互作用を低温赤外分光法を用いて解析した結果をまとめたものである。

視物質ロドプシンは光を吸収すると発色団であるレチナールが光異性化し、バソロドプシルミロドプシン、メタロドプシン I と名付けられた中間体を經由して、Gタンパク質を活性化する中間体であるメタロドプシン II に変化する。メタロドプシン II ではレチナールシッフ塩基が脱プロトン化し、ヘリックスの傾きを伴う大きな構造変化が生じると考えられている。これらの中間体は低温下で安定に捉えることができるため、低温赤外分光法を用いることにより、それらの構造を詳細に検討することができる。ロドプシンを D<sub>2</sub>O および D<sub>2</sub><sup>18</sup>O 水和し、それぞれの中間で変化する水分子の O-D 伸縮振動、 $\alpha$ ヘリックスや  $\beta$ シートの amide A (重水素置換可能な N-D 伸縮振動) を低温赤外分光法により捉えることができた。その結果、ロドプシンの活性化過程において強い水素結合を形成した水分子に変化がないこと、メタロドプシン I の形成に伴って  $\alpha$ ヘリックス、メタロドプシン II の形成に伴って  $\beta$ シートへと段階的に構造変化が生じることを明らかにした。次に、ルミロドプシン、メタロドプシン I の液体窒素温度での光反応を解析することにより、メタロドプシン I の形成に伴ってタンパク質の大域的な構造変化が生じることを明らかにした。

古細菌の光センサーであるフォボロドプシンは情報伝達タンパク質 Htr II と複合体を形成し、光情報をヘリックス間相互作用により伝達すると考えられている。光駆動プロトンポンプを機能としながら、タンパク質の立体構造がよく似ているバクテリオロドプシンとの比較研究により、ポンプとセンサーの違いをもたらすタンパク質の構造変化について研究を行った。その結果、フォボロドプシンは、バクテリオロドプシンと同様に M 中間体におけるシッフ塩基の脱プロトン化に伴う対イオン (Asp75) プロトン化が起こることが明らかとなった。一方、amide I の強度が大きく変化する N 中間体様の構造変化は生じないことが分かった。また、Htr II が存在する状態としない状態とで測定を行うことにより、Htr II によってフォボロドプシンの構造が修飾を受けて、レチナールの異性化に伴う  $\alpha_{II}$ ヘリックスの構造変化およびアミノ酸側鎖の X-H 基の水素結合変化が新たに生じることが明らかになった。

以上の結果から、視物質ロドプシンの活性化過程においてシッフ塩基近傍の水分子はプロトン移動反応を制御しないこと、メタロドプシン I において大域的な構造変化が初めて生じること、メタロドプシン II においてシッフ塩基領域の電荷対の安定化に重要な  $\beta$ シートに構造変化が生じることが分かった。また、古細菌の光センサーであるフォボロドプシンは、光駆動プロトンポンプとシッフ塩基の脱プロトン化構造は類似しているが、機能発現におけるヘリックスの動きに違いがあること、情報伝達タンパク質との相互作用により、光センサー自身の構造変化に違いが生じることが分かった。

## 論文審査の結果の要旨

近年、様々なタンパク質遺伝子の塩基配列が決定され、また、タンパク質の立体構造が原子レベルで解明されるようになってきた。そこで、タンパク質の機能発現メカニズムの本質的な理解のために、それらが機能する過程で起こる構造変化の情報が益々重要になっている。光受容タンパク質は光で反応を開始できるために、活性状態を一斉にまた大量に作り出すことができる。また、分光学的な方法が申できるため、フォムト秒から秒に至る様々な時間領域での測定が可能である。さらに、極低温でも反応を開始できるので、室温では不安定な中間体を安定化し、その構造を詳細に解析することも可能である。

本研究では、このような光収容タンパク質が持つ利点を活かして、視物質ロドプシンがG蛋白質を活性化する状態に変化する過程でのタンパク質部分の構造変化と、水分子が果たす役割について、低温赤外分光法を用いて研究を行った。その結果、ロドプシンのタンパク質中には多くの水分子が存在するが、ロドプシンの光反応過程において強い水素結合を形成した水分子に変化がないことが明らかになった。同じレチナルを発色団として持つバクテリオロドプシンでは、強い水素結合を形成した水分子の変化により分子内でのプロトン移動反応が起こる。上記の結果は、ロドプシンとバクテリオロドプシンで、水分子の役割の違いにより機能の違いが現れることを示唆しており興味深い。また、メタロドプシンIの形成に伴って $\alpha$ ヘリックス構造が変化し、メタロドプシンIIの生成に伴って $\beta$ シート構造の変化が起こることも明らかになった。これらの知見は、精緻な低温赤外分光法により初めて明らかになった構造変化であり、本研究の質の高さを表している。

フォボロドプシンは、プロトンポンプであるバクテリオロドプシンと立体構造がよく似ているが、情報伝達タンパク質HtrIIと複合体を形成し、光センサータンパク質として機能する。そこで、フォボロドプシンとバクテリオロドプシンとの比較研究により、ポンプとセンサーの違いをもたらすタンパク質の構造変化について研究が行われた。その結果、フォボロドプシンはバクテリオロドプシンと同様の中間状態を経由して反応が起こるが、その反応の速度は非常に遅く、amide Iの強度が大きく変化するバクテリオロドプシンのN中間体のような構造変化は生じないことがわかった。また、HtrIIが存在すると、フォボロドプシンの構造が摂動を受けて、レチナルの異性化に伴う $\alpha_{II}$ ヘリックスの構造変化およびアミノ酸側鎖のX-H基の水素結合変化が新たに生じることが明らかになった。

以上のように、本研究は光を吸収したロドプシンでタンパク質部分および水分子の構造変化を詳細に解析した。また、フォボロドプシンにおける光センサーとしての構造変化過程を明らかにし、この分野の発展に大きく寄与したと認められる。よって、本論文は京都大学理学博士の論文として十分に価値があると認められる。なお、主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、合格と認めた。