

氏名	にし おく よし のり 西 奥 義 憲
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2564 号
学位授与の日付	平成 14 年 9 月 24 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 化 学 専 攻
学位論文題目	Energetics, Conformational Changes and Protein-Protein Interaction in the Photolysis of Octopus Rhodopsin (タコロドプシン光反応過程におけるエネルギー・構造変化とタンパク質- タンパク質相互作用の研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 梶 本 興 亜 教 授 寺 嶋 正 秀 助 教 授 百 瀬 孝 昌

論 文 内 容 の 要 旨

ロドプシンは、動物の網膜に存在する視物質で、発色団 11-cis レチナールがプロトン化シッフ塩基経由で、タンパク質 オプシンのリジン残基に結合した膜タンパクである。ロドプシンが光を受けると、レチナールの 11-cis から all-trans への異性化が起こり、この後熱反応により吸収極大の異なる数種の間体が生成する。この中間体の一つが G タンパク質と呼ばれる膜表面のタンパク質を活性化し、これにより視神経に視興奮が起きる。このロドプシンの光反応は、脊椎動物と無脊椎動物とでは少し異なっており、脊椎動物の場合、G タンパク質と相互作用する中間体は metarhodopsin II であることが分かっているが、無脊椎動物であるタコのロドプシンの場合、多くの研究が行われ、その相互作用が起きることは分かっているにもかかわらず、どの中間体が実際に相互作用しているかについてはいまだ明らかではない。申請者は、更なるタコロドプシン光反応過程理解のため、化学反応に伴うエネルギー、及び体積変化を溶媒の屈折率変化から捉える事が可能である過渡回折格子法 (TG 法) 及び、過渡レンズ法 (TrL 法)、また、同様に反応に伴うエネルギー、体積変化を捉える事が可能である光音響信号法 (PA 法) をタコロドプシン光反応過程に適用し、得られた信号からこの光反応過程について議論を行っている。

初めに申請者は、可溶化されたタコロドプシンサンプルを用いて、その光反応過程についての研究を行った。15°C では 100 μ s 以内に発色団の吸収変化は完了するが、TG 信号には、この変化の後にも、更なる信号が観測されることを見出している。そのうち一つは様々な確認実験より、タンパク質の構造変化に伴うものであることを明らかとした。この変化の寿命は 15°C において 180 μ s であり、定量的測定からその体積変化の大きさは +13ml/mol と得られた。この遷移は吸収変化を伴わないことから、発色団から離れた部分での構造変化であると結論している。更に、この構造変化の温度依存性の測定から、活性化エンタルピー及び活性化エントロピーを求め、得られた値は吸収変化を伴う遷移での値とは大きく異なる値であることを明らかにした。これは、今回観測された遷移が、過渡吸収法で観測されるダイナミクスとは異なり、発色団から離れた部分でのタンパク質構造変化であることを示唆しているものと結論した。この結果から、最終の吸収変化により生成する中間体を、Transient acid metarhodopsin と名づけ、これが G タンパク質活性化に関与すると考え、今回観測された遷移はこの活性化から不活性にいたる遷移と考えた。

更に申請者は、今回観測された遷移を含めたタコロドプシン光反応における中間体のエンタルピー変化及び、体積変化を TG 法、及び PA 法により生理的温度で検出した。今までは各中間体を極低温で生成させることにより、その中間体のエンタルピー変化が求められてきたが、極低温と実際に反応が起こる条件では、タンパク質の構造が異なり、その値も異なる可能性がある。TG 法では、実際に反応が起こる条件下で、時間分解でエンタルピー変化を測定することが可能であり、ロドプシンの系にこの測定を適用している。その結果、Bathorhodopsin, Mesorhodopsin の ΔH は、低温測定での値と近い値が得られた一方、Lumirhodopsin で大きく異なる値が得られた。この違いは、極低温での状態と、実際に反応する状態ではこの中間体の構造が異なることを示しているのであろう。しかし、発色団の吸収は極低温でもほぼ生理的温度と同じであ

るので、発色団から少しはなれた部分でのタンパク質構造が異なるのではないかと推察している。また、得られた各遷移に伴う体積変化は、ロドプシンから Bathorhodopsin の反応で比較的大きく、+32ml/mol であり、その後の Lumirhodopsin から Transient Acid Metarhodopsin の反応では比較的小さな数 ml/mol の変化を得ている。ロドプシンから Bathorhodopsin への段階は、レチナールの異性化を含んでおり、この時の変化が比較的大きな構造変化として観測されたものと考えられ、その変化は発色団周辺に局在しているものと考えている。その後の遷移での比較的小さな構造変化の一方、先に示されたように Transient Acid Metarhodopsin から Acid Metarhodopsin への遷移では +13ml/mol と比較的大きな変化が観測されている。この体積変化は、比較的小さな構造変化が発色団周辺を中心に起こった後、発色団から離れた部分、つまり helix 部分で起きていることを示唆している。

次に、可溶性サンプルではなく脂質の再構成膜中で、TG 法によりロドプシン-G タンパク質相互作用の検出を試みている。再構成膜サンプルを調整した理由は、可溶性状態では相互作用が比較的小さいためである。Transient Acid Metarhodopsin から Acid Metarhodopsin の遷移における信号部分に、ロドプシンだけの溶液で観測された信号と G タンパク質を加えたサンプルでの信号に違いが観測された。これは、Transient Acid Metarhodopsin が実際に G タンパク質活性化に関与することを示していると考えている。

論文審査の結果の要旨

タコロドプシンの光反応過程の研究は、脊椎動物のロドプシンに比べ、比較的不明な点の多い無脊椎動物ロドプシンの光反応過程の研究において重要な課題の一つである。申請者の「タコロドプシン光反応過程におけるエネルギー・構造変化とタンパク質-タンパク質相互作用の研究」は、次に述べるように多くの重要な発見を含んでいる。

第一の論文では、タコロドプシン光反応過程において、発色団吸収変化の完了後に吸収変化を伴わない更なる遷移を TG 法により観測している。この変化は、温度変化等の測定により、発色団から離れた部分でのタンパク質構造変化を観測したものと結論している。この観測により、吸収変化完了時に生成する中間体が G タンパク質と相互作用する中間体であり、観測されたタンパク質構造変化は、活性化状態から不活性化状態に至る変化と提唱している。

第二の論文では、タコロドプシン光反応過程で生成する中間体のエンタルピー、及び体積変化を、過渡回折格子法 (TG 法)、過渡レンズ法 (TrL 法)、光音響信号法 (PA 法) により生理的温度で、反応進行中に時間分解で検出している。今までは、極低温化で生成させることにより、その中間体のエンタルピー変化が求められてきたが、極低温と実際に反応が起こる条件では、タンパク質の構造が異なる可能性があり、その値も異なる可能性がある。実際、得られた値が低温と生理的温度で異なる中間体も存在している。これらの得られた値と、タンパク質構造変化との関連を議論し、比較的小さな構造変化が発色団周辺を中心に起こった後、発色団から離れた部分、つまり helix 部分で起きているという説を提唱している。

さらに、再構成膜サンプルを調整し、G タンパク質と活性化ロドプシン間の相互作用の検出を試み、その結果から、第一の論文で提唱した様に、G タンパク質と相互作用する中間体は吸収変化完了時に生成する中間体であると提唱している。

以上申請者の研究は、その結果の重要性を考慮する時、タコロドプシンの光反応過程の研究分野において貢献する所が極めて大きいと考えられる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。