

氏 名	つかもと ひさお 塚本 寿夫
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3065 号
学位授与の日付	平 成 18 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	ロドプシン類における活性化機構の比較解析

論文調査委員	(主 査) 教 授 七 田 芳 則	教 授 阿 形 清 和	教 授 藤 吉 好 則
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

ロドプシンは、他の G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) と共通の祖先から光受容体として分子進化してきたと考えられている。ロドプシンは、発色団レチナールの 11-cis 型から all-trans 型への光異性化に伴い G 蛋白質を活性化する。様々な動物種に存在するロドプシンおよびその類似蛋白質 (ロドプシン類) は、アミノ酸配列の相同性から 5 つのサブグループに分類される。その中の 1 つのサブグループに属する脊椎動物のロドプシン、特にウシロドプシンは、活性化機構が最も理解された GPCR である。しかし、一般的に GPCR は外来のリガンド (アゴニスト) の結合により活性化されるが、脊椎動物のロドプシンは外来の all-trans-retinal (アゴニスト) を結合できない。一方、多様なロドプシン類の多くは、脊椎動物のロドプシンとは異なる性質の活性状態を生じることが明らかになってきたが、活性化機構の詳細は不明であった。そこで、脊椎動物のロドプシンと異なるサブグループに属するロドプシン類と脊椎動物のロドプシンとの活性化機構の共通点および相違点を明らかにすることを試みた。具体的には、頭索動物ナメクジウオのロドプシンの光反応および G 蛋白質活性化を解析し、all-trans-retinal の結合についても検討した。

ナメクジウオロドプシンは光受容後、吸収スペクトルが長波長シフトした光産物を生じ、G 蛋白質を活性化した。また光産物にさらに光を照射すると、もとの状態に戻った。このような光反応は脊椎動物のロドプシンとは異なる。また、興味深いことにこのロドプシンは all-trans-retinal を直接結合して G 蛋白質を活性化する状態になることがわかった。一方、このロドプシンは all-trans-retinal よりも 11-cis-retinal に対して高い親和性を示し、アゴニスト (all-trans-retinal) の結合は抑えられていると考えられた。そこで、変異体解析により検討した結果、ヘリックス 6 に存在する Trp265 がアゴニストの結合を抑えるために重要であることがわかった。Trp265 はロドプシン類において高度に保存されていることから、ロドプシン類ではアゴニストの結合による光と無関係な活性化を Trp265 により抑制していることが示唆された。以上の結果から、ナメクジウオロドプシンと脊椎動物のロドプシンでは活性状態における all-trans-retinal と蛋白質部分との相互作用に違いがあると考えられた。

脊椎動物のロドプシンと同じサブグループに属するパラピノプシンはナメクジウオロドプシンと同様な分子特性を示す。そこで、活性状態におけるレチナールとその周辺に存在するアミノ酸残基との位置関係について、パラピノプシンとウシロドプシンを比較した。その結果、パラピノプシンについては、膜貫通ヘリックス 5 と 6 に存在する 208 位と 269 位のアミノ酸残基の配置が活性状態の形成に重要であり、all-trans-retinal は両残基と近い位置にあることがわかった。一方、ウシロドプシンでは、同じ位置の残基の配置が活性状態の形成に重要であるが、レチナールは両残基から離れた配置をとることが示唆された。以上の結果から、ロドプシン類の活性化において、208 位と 269 位のアミノ酸残基の配置は共通して重要であるが、all-trans-retinal の配置の違いが活性状態の違いを生み出す一つの要因になっていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ロドプシンは7回膜貫通 α -ヘリックス構造を持ち、分子進化の過程で光を受容する能力を獲得したG蛋白質共役型受容体(GPCR)である。これまでに視覚や体内時計の調節に関与する1000種類以上のロドプシン類が同定され、それらはアミノ酸配列の相同性に基づき5つのサブタイプに分類される。本研究ではロドプシン類の分子特性と機能多様化との関連を明らかにするために、それらの活性化機構についての比較解析を試みた。

拡散性の化学物質をリガンド(アゴニスト)として結合する一般のGPCRとは異なり、ロドプシンは光を受容して分子内に結合しているアンタゴニスト(11-*cis*-retinal)をアゴニスト(all-*trans*-retinal)に変換させて活性状態になる。これまでによく研究が行われている脊椎動物のロドプシン(ウシロドプシン)はall-*trans*-retinalと直接結合せず、特殊なGPCRと考えられることが多かった。本研究では上記5つのサブタイプに含まれるそれぞれのロドプシンとウシロドプシンとの比較解析を行う過程で、ウシロドプシンとは違って、all-*trans*-retinalと直接結合するロドプシンを発見した。このロドプシンはナメクジウオから発見され、ロドプシン類がリガンド結合型のGPCRの中から分岐して来たことを直接的に示す結果となった。さらに本研究では、このロドプシンがall-*trans*-retinalよりも11-*cis*-retinalにより高い結合特性を示すことに着目し、その分子機作を明らかにするため網羅的な変異体解析を行った。その結果、N端から265番目にトリプトファン残基が存在することにより11-*cis*-retinalへの結合特性が上がっていることが発見された。

さらに本研究では、ナメクジウオロドプシンの膜貫通ヘリックスVIに存在するAla269をLeuに置換すると、G蛋白質活性化状態のスペクトルの性質が変化し、また、G蛋白質の活性化効率も消失することを発見した。一方、脊椎動物(ウシ)のロドプシンではこの置換によりG蛋白質の活性化効率は減少するがスペクトル的な性質は変化しないことがわかった。その後の詳細な変異体解析により、ナメクジウオロドプシンと脊椎動物のロドプシンではG蛋白質を活性化する状態に至る分子内でのレチナールの動きが異なることが明らかになった。また、この結果を、ナメクジウオロドプシンと同様の分子特性を示すパラビノプシンでも検証し、脊椎動物のロドプシンでのみ見られる活性状態に至る構造変化の特異性を明らかにした。

以上のように、本研究は一般のGPCRと同様のアゴニスト結合能を持つロドプシンを発見し、そのアゴニスト結合能やG蛋白質活性化能に関わる分子機作を脊椎動物のロドプシンと比較検討し、この分野の発展に大きく寄与したと認められる。よって、本論文は博士(理学)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。