

氏 名	にしむらしょうこ 西村章子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2097 号
学位授与の日付	平成 11 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	視物質ロドプシン・三量体G タンパク質トランスデューシン間相互作用の分子メカニズムの解析ー赤外分光法によるアプローチー

(主査)

論文調査委員	教授 七田芳則	教授 藤吉好則	教授 西田栄介
--------	---------	---------	---------

論 文 内 容 の 要 旨

生体に広く存在する細胞内情報変換のモチーフは「受容体→Gタンパク質→エフェクタータンパク質」である。これまでに1000種類を超える受容体や様々なGタンパク質ファミリー、エフェクタータンパク質が発見されており、その情報変換の分子メカニズムが種々の方法を用いて検討されている。しかし、情報の授受がタンパク質のどのような構造変化によって行われるかといった、個々の分子の構造レベルにまで立ち入った研究はほとんど行われていない。本研究では、フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法を用い、視覚に関わる光受容タンパク質ロドプシンと、それに共役する三量体Gタンパク質トランスデューシンの間の相互作用過程を、タンパク質を構成する原子間の振動レベルの変化を観測することによって、詳細に検討することを試みた。そのため、実験試料として天然のロドプシンおよびトランスデューシンを用いる以外に、活性型ロドプシン・トランスデューシン相互作用において重要な部位である、トランスデューシン α サブユニット (Gt α) C末端領域に相当する合成ペプチドをトランスデューシンのかわりに用い、活性型ロドプシンとGt α C末端領域との相互作用面の構造変化も測定した。その結果、

1. 活性型ロドプシン・トランスデューシンが複合体を形成することによって、以下の変化が生じることがわかった。
 - (1) 活性型ロドプシンの膜貫通ヘリックス内、もしくは活性型ロドプシンとGt α C末端領域の相互作用面の中の疎水的な部位に位置するプロトン化カルボン酸の状態が変化する。
 - (2) 活性型ロドプシンのGln239→Glu249, またはGt α のAsp311→Lys329, nucleotide結合部位, switch領域のいずれかに位置するペプチド結合C=Oの水素結合が強くなる。
 - (3) 活性型ロドプシンとGt α C末端領域の相互作用面以外の部位に位置するAsn, Glnに変化が起こる。
2. 活性型ロドプシンとGt α C末端ペプチドが複合体を形成する過程は、以下の3段階で起こることが明らかになった。すなわち、
 - (1) プロトン化シッフ塩基を持つ活性型ロドプシンがペプチドと複合体を形成する。その際、3～9個のペプチド結合C=O (NH) が、 α ヘリックスを形成する。これは、Gt α C末端ペプチドのIle340→Asp346の領域の変化と考えられる。
 - (2) 段階(1)で形成された α ヘリックスの一部は解けるが、シッフ塩基はプロトン化した状態を保っている。
 - (3) シッフ塩基が脱プロトン化する。

Gt α C末端ペプチドはトランスデューシンと同様に活性型ロドプシンと複合体を形成する。したがって、この実験により観測された過程は活性型ロドプシンとトランスデューシンとの相互作用過程においても起こると考えられる。

3. 活性型ロドプシンとGt α C末端ペプチドが複合体を形成する過程で、相互作用に不可欠であるGt α C末端の349のペプチド結合の振動に変化が起こる。この変化は、Leu349のペプチド結合NHの水素結合が弱くなったか、Gly348とLeu349の間のペプチド結合に歪みが生じた結果と考えられる。

以上の実験結果をもとに、Gt α C末端がロドプシンのEFヘリックスに侵入することがロドプシンからトランスデューシンへのシグナル伝達に必須であるというモデルを提出した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、視覚に関わる光受容タンパク質ロドプシンと、三量体Gタンパク質トランスデューシンの間の相互作用過程を、フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法によって解析したものである。FTIR分光法は、タンパク質の構造変化を、化学結合における水素結合変化やその周囲の極性の変化として極めて高い感度で検出できる測定方法であり、X線結晶回折などによる3次元構造解析が困難なロドプシンの活性中間体の構造情報を得る上で大きな役割を果たしてきた。しかし、実験技術上の困難のため、FTIR分光法をタンパク質間相互作用の測定に適用した研究は報告されていなかった。申請者は、水溶液中でトランスデューシンをロドプシンを含むウシ桿体外節膜に吸着させたのち遠心によって共沈させる方法を考案し、その沈澱を測定試料とすることで活性型ロドプシン・トランスデューシン間相互作用のFTIR測定に初めて成功した。また、試料中に含まれる複合体以外の成分を、赤外吸収スペクトルの解析から除去する方法を考案し、複合体の情報だけを取り出すことに成功した。その結果、複合体形成によってプロトン化カルボン酸やペプチド結合などに変化が起こることを初めて明らかにした。

また本論文では、ロドプシンとトランスデューシンの相互作用において最も重要な領域であるトランスデューシン α サブユニットC末端領域に注目し、それに相当する合成ペプチドと活性型ロドプシンとの複合体形成過程を詳細に解析することにも成功している。申請者はこの解析により、トランスデューシン α サブユニットのC末端領域が活性型ロドプシンと相互作用をする過程で、 α ヘリックス構造の過渡的な変化を起こすことを明らかにした。さらに、複合体を形成する際に、その重要性が指摘されていたLeu349のペプチド結合に水素結合変化または歪みが生じることを明らかにした。以上の結果は、実際のトランスデューシン α サブユニットにおける複合体形成の素過程を明らかにしたものと考えられる。本論文では以上の結果をもとにして、活性型ロドプシンとトランスデューシン α サブユニットC末端領域の相互作用に関する構造モデルを提出している。

FTIR分光法では、個々の原子の座標を決定することはできない。しかし、生理環境に近い条件下で、特定の化学結合の時間変化を追跡できるという大きな利点を持っている。従って、本論文で開発された研究手法および得られた結果は、タンパク質の静的な3次元構造の解析と併用されることにより、タンパク質間相互作用のスタンダードな解析方法として発展すると期待される。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、主論文およ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、合格と認めた。