

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	マツヤマ オジョス タケン 松山 オジョス 武
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 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) The physiological role of the covalently bound retinal-ligand in rhodopsin (ロドプシン中で共有結合したレチナールリガンドの生理的意義)	
論 文 調 査 委 員	(主査) 七田芳則 教授 (准教授・講師) 藤吉好則 教授 (") 阿形清和 教授 (")

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	松山 オジョス 武
論文題目	The physiological role of the covalently bound retinal-ligand in rhodopsin (ロドプシン中で共有結合したレチナールリガンドの生理的意義)		
(論文内容の要旨)			
脊椎動物の眼には光受容のために高度に分化した細胞（視細胞）が存在する。そのうち、桿体視細胞は薄暗がりのもとで働き、わずか 1 個の光子を検出することができるほどの高い光感度を示す。この高い光感度は、この細胞に含まれる光受容タンパク質であるロドプシンの分子的な性質によって実現している。ロドプシンは G タンパク質共役型受容体（GPCR）のメンバーで、分子内に共有結合したレチナールリガンド（レチナール発色団）を持っていることが特徴である。他の GPCR は拡散性のリガンドと非共有結合することによって G タンパク質を活性化する状態になる。ロドプシン中でレチナールリガンドがなぜ共有結合しているのかについては、これまでも研究されてきたが、その生理的意義についてはよくわかっていなかった。そこで本研究では、ロドプシンの共有結合部位のアミノ酸を変異させることによってレチナールリガンドを非共有結合させたロドプシン（K296G）を作製し、天然のロドプシンとの分子的性質の違いをいろいろな視点から検討した。 まず、レチナールが共有結合していることでレチナールの光反応に影響があるかどうかを検討した。野生型ロドプシンおよび K296G の吸収スペクトル、分子吸光係数、光感受性、極低温での光反応を比較検討した。その結果、共有結合をなくしてもこれらの性質はほとんど変化せず、共有結合の有無はこれらの性質に影響しないことがわかった。一方、レチナールが光反応を起こした後の熱反応について検討したところ、共有結合がなくなると熱反応の速度が大きく変化することがわかった。つまり、共有結合がなくなると熱反応過程で生成する中間体が不安定になり、中間体はより低温で次の中間体へ変化することがわかった。さらに、共有結合がないと G タンパク質を活性化する中間体であるメタⅡ中間体が生成せず、レチナールが遊離することがわかった。K296G からレチナールが遊離すると、G タンパク質を構成的に活性化する状態になる。したがって、K296G を光照射すると G タンパク質を活性化するが、この G タンパク質の活性化メカニズムは、リガンドに誘導される野生型ロドプシンの活性化メカニズムとは大きく異なることがわかった。ロドプシンが構成的な活性を示すと視細胞における暗ノイズの増加につながると考えられるので、共有結合によって構成的活性を抑制することが生理的に重要であると考えられた。 以上のことから、ロドプシンにおいてリガンドとの共有結合がないと、光反応は正常に起こるが、その後の熱反応や G タンパク質の活性化反応が大きく変化し、ロドプシンの単一光子検出器としての機能が阻害されることがわかった。			

(論文審査の結果の要旨)

ロドプシンは脊椎動物の桿体視細胞に含まれる光受容体で、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のメンバーである。ロドプシンは他の GPCR と多くの性質を共有しているが、光受容体として機能するために、特徴的な性質を持っている。最も特徴的なのは、ロドプシンは分子内でリガンドであるレチナールと共有結合していることである。光を受容するとレチナールリガンドは異性化し、タンパク質部分の構造変化を引き起こして G タンパク質を活性化する状態になるが、これは、他の GPCR が拡散性のリガンドと非共有結合して活性状態になるのとは大きく異なっている

ロドプシンのみにリガンドとの共有結合が形成されていることの生理的意義は多くの研究者の興味を引き、1990 年代から研究が行われてきた。しかし、試料調製の困難さなど、技術的な問題からあまり進展が見られなかった。しかし申請者はこの問題に興味を持ち、試料調製の方法を改良した結果、レチナールリガンドと共有結合をしているリジン残基をグリシン残基に置換したロドプシン変異体 (K296G) と野生型ロドプシンとの性質を、分光学的・生化学的手法を駆使して十分な精度で比較することに成功した。

K296G では、レチナールリガンドは非共有結合で結合部位に取り込まれている。申請者はまず、K296G の光化学的性質を野生型と比較しても、大きな差異は見られないことを示した。一方、光化学反応の後に起こる熱反応には大きな影響が見られ、異性化後に生成する中間状態が熱的に非常に不安定になることを示した。

次に申請者は、ロドプシンの G タンパク質活性化に対する共有結合の効果を検討した。その結果、K296G では、光依存的に生成するロドプシンの活性状態が生成しないままレチナールが解離することを示した。さらに、野生型ではレチナールの解離によって G タンパク質活性化能が抑制されるのに対し、K296G ではレチナールが解離した状態でも G タンパク質活性化能を示すことを示した。活性化状態が持続することは暗ノイズが増える原因になると考えられることから、共有結合の生理的な役割のひとつが、暗ノイズの抑制であることを提唱した。

以上のように申請者は、GPCR の中でロドプシンのみで見られるリガンドとの共有結合は、ロドプシンが単一光子検出器として働くために必須な特徴、すなわち、高い G タンパク質活性化能と低ノイズの実現のために、分子進化の過程で獲得されたものであることを明らかにした。この成果は、感度に特化した細胞が GPCR に求める特性を実験的に示したもので、分子進化の観点からも高く評価される。

よって、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る。また、平成 23 年 1 月 25 日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。