

氏 名	ひらの たかひろ 平 野 貴 弘
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2365 号
学位授与の日付	平 成 13 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	ニワトリの赤色感受性視物質アイオドプシンに対する塩素イオン結合の 効果 ——振動分光法による構造解析——
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

我々ヒトを含む多くの脊椎動物は、その視覚系を用いて色の識別を行っている。この色覚の分子的基礎をなすのは、網膜の錐体視細胞に含まれる様々な波長感受性を持つ光受容蛋白質（視物質）の存在である。視物質はアミノ酸配列の相同性から4つのグループに分けられ、各グループ内の視物質は似通った吸収極大波長を示す。この中で最も長波長に吸収極大を示すグループ（グループL）に属する視物質は、塩素イオンの結合サイトを持つ。これらの視物質に塩素イオンが結合すると、吸収波長が長波長にシフトすることから、この塩素イオンの結合メカニズムが長年の研究対象となっていた。

本研究では、グループLに属するアイオドプシン（ニワトリ赤色感受性視物質、 $\lambda_{\max}=571\text{nm}$ ）を対象として、塩素イオンの結合によって起こる発色団及び蛋白質部分の構造変化を検討し、塩素イオンの作用機構を明らかにすることを目標とした。そのため、塩素イオンを除去、或いは置換したアイオドプシン試料について赤外吸収スペクトルを測定し、以下の結果を得た。

- (1) 塩素イオンの結合によりアイオドプシンは約40nmの長波長シフトを示すが、塩素イオンと拮抗的に結合する硝酸イオンはシフトをおこさない。このことから、両イオンの発色団に対する相対的な位置が異なることが示唆された。
- (2) 光反応前のアイオドプシンの発色団の立体構造は、これらアニオンの影響を受けない。一方、光異性化後の初期中間体（バソ中間体）の発色団は、塩素イオンによりC14付近がねじれた構造をとる。硝酸イオンはこのねじれを誘起しない。以上のことから、硝酸イオンは塩素イオンと違って発色団からより遠い位置に存在することが示唆された。
- (3) 塩素イオンの結合により、光反応初期中間体（バソ中間体）での蛋白質骨格の変化が観測された。赤外スペクトルの波数解析から、変化部分は β シート構造であり、塩素イオンの結合により細胞外ループの構造が変化することが示唆された。
- (4) 塩素イオンは硝酸イオンと違って、水分子を伴って結合することがわかった。
- (5) 発色団であるプロトン化シッフ塩基の水素結合の状態は吸収波長に対して影響を与えることが知られている。しかし塩素イオンはその状態を変化させないことがわかった。

以上の結果から、塩素イオンは、塩素イオン結合部位の正電荷と電気双極子を形成し、発色団全体の電子状態を変えることで吸収波長の長波長シフトをもたらすと結論した。また、ウシロドプシンの立体構造を基にしたアイオドプシンの構造モデルを構築し、本研究の実験結果と照合した。その結果塩素イオンの結合による1) アニオン結合部位を含む細胞外ループと、2) 塩素イオン結合部位と発色団の間の蛋白質部分（主にTyr268）の再配置が示唆された。この構造変化を通じて、バソ中間体における発色団のC14近傍がねじれた構造をとるように作用するという機構を提唱した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

脊椎動物の錐体視物質はアミノ酸配列の相同性から4つのグループに分かれる。これらのグループのうち最も長波長に吸

吸収極大を示すグループは分子内に塩素イオンの結合サイトをもち、特異な波長シフトのメカニズムをもっている。これまでに部位特異的変異体を用いた実験から、塩素イオンと結合するアミノ酸残基はこれら視物質の細胞外ループ領域に位置することが示されていた。したがって、膜貫通領域に結合している発色団レチナールと塩素イオンがどのような相互作用をして、吸収極大の長波長シフトが誘起されるのかは、興味ある研究テーマであった。本論文では、ニワトリの赤感受性錐体視物質アイオドプシンを実験試料として、分子構造を詳細に検討できる低温可視および赤外スペクトル法を用い、塩素イオン結合サイトの構造、及び、波長シフトのメカニズムを解析したものである。

まず、透析により塩素イオンを除去、あるいは硝酸イオンに置換したアイオドプシン試料を調製し、塩素イオン結合型のアイオドプシンとの吸収特性を比較した。その結果、塩素イオンが結合した状態でのみ吸収の長波長シフトが起こることを発見した。一方、赤外吸収スペクトルに現れるC=N伸縮振動の解析から、波長シフトの原因は、対イオンとの相互作用の変化ではないことを明らかにした。さらに、発色団のC=CおよびC—C伸縮振動の解析から、塩素イオンは、結合サイトのアミノ酸残基と電気双極子を形成して、静電的相互作用により波長シフトを起こすことを明らかにした。また、赤外スペクトル法を用いて蛋白質部分の構造を解析した結果、塩素イオンは水分子を伴って蛋白質部分に結合し、そのため、塩素イオンの結合サイトが構造変化をおこし、発色団の近くに位置するようになることを推定した。同じ一価のアニオンである硝酸イオンは水分子を伴って結合できず、そのため、波長シフトを起こすことができないことも明らかにした。

さらに、アイオドプシンの初期中間体での塩素イオン結合の効果を検討し、塩素イオンが結合していると、発色団のC14の位置が特異的にねじれた構造をとることを発見した。アイオドプシンは他の視物質とは違って特徴的な光反応過程を示すが、この発色団のねじれ構造がその原因の一つであることを実験的に証明した。

以上のように、本研究は、塩素イオンが結合する視物質について、その分子構造および構造変化を詳細に検討し、塩素イオンによる波長シフトのメカニズムを明らかにしたといえる。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諮問した結果、合格と認めた。