

氏 名	なが 永 田 とも 智 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2230 号
学位授与の日付	平成 12 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	ロドプシンの機能発現過程における水素結合構造の動的変化過程の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 七 田 芳 則 教 授 藤 吉 好 則 教 授 井 口 八 郎

論 文 内 容 の 要 旨

網膜の桿体視細胞に存在する光受容蛋白質“ロドプシン”の機能は、外界からの光を高感度で受容し、活性型の構造に変化して光信号を G 蛋白質（トランスデューシン）に伝えることである。天然のロドプシンを用いた研究から、蛋白質内部には水分子を含む水素結合ネットワークがあり、このネットワークの変化がロドプシンの機能発現に重要な役割を担っていることが推測されている。しかし、水分子の存在位置やそれと相互作用するアミノ酸残基については想像の域を出ていなかった。

本研究では、(1) 発色団レチナールの異性化情報がどのように蛋白質の構造変化に結びつくのかを、水素結合ネットワークに注目して検討した。そのためにまず、発色団の異性化とそれに伴う発色団周辺の構造変化が主に起こっていると考えられる、バソ中間体での水素結合構造とその変化を調べた。さらに(2) 赤外吸収スペクトル上で発色団の異性体型特異的に環境を変える蛋白質由来の信号を同定し、この信号とロドプシンの高い光感受性との間に相関関係があるかどうかを検討した。具体的には、種々の分光学的測定法をウシロドプシンの部位特異的変異体に適用し、以下の結果を得た。

(1) レチナールシッフ塩基と Glu 113 の間には、1 個の水分子 (Wat-1 と命名) が存在し、その周辺のペプチド骨格も含めた水素結合構造があることがわかった。Wat-1 はシッフ塩基プロトンの正電荷と Glu 113 の負電荷の間に位置することで、それぞれの電荷を安定化し、ロドプシンの吸収極大波長を～500 nm にするために重要な役割を担っていると考えられた。また Wat-1 は、発色団の異性化の際、プロトン化シッフ塩基との水素結合の強さを変えずに、シッフ塩基とともに動くことが示唆された。また、Asp 83 や Gly 120 近傍にも 1 個の水分子 (Wat-2 と命名) が存在し、Wat-2 は Gly 121 周辺のペプチド骨格も含めた水素結合構造を形成していることが明らかになった。さらに Asp 83 と Gly 120 は水素結合と発色団を介して、Glu 113 とシッフ塩基部分につながっていることが推定された。Wat-2 を含む水素結合構造は、細胞質ループ (G 蛋白質との相互作用部位) と発色団 (光受容部位) との間に存在する。バソ生成時のこの領域の水素結合構造の変化は、分子内光情報伝達過程の初期段階であると考えられた。

(2) 発色団の異性体型特異的に環境を変える蛋白質由来の信号は Thr 118 の O-H 基であることを同定した。また Thr 118 を別のアミノ酸に置換すると、吸収極大波長と光感受性が変化することがわかった。この結果から、Thr 118 は発色団の結合ポケットを形成するアミノ酸であり、ロドプシンの高い光感受性の実現にも関わっていることが推定された。また Ala 117 も発色団の結合ポケットを形成していることが変異体を用いた実験から明らかになったが、Thr 118 と Ala 117 では存在する環境が異なり、Thr 118 は疎水的な環境、すなわち発色団の β -イオノン環と隣接し、Ala 117 は親水的な環境に存在することがわかった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法を用いて、視覚に関わる光受容タンパク質ロドプシンの光吸収後の構造変化過程を、分子内に含まれる水分子を含めた水素結合ネットワークの変化を指標とし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測定する方法である。そのため、光吸収後のロドプシン内で起こる構造変化を詳細に検討できる。従来の研究から、ロドプシン内部には水分子を含めた水素結合ネットワークが存在し、そのネットワークの変化が視物質の機能発現に至る構造変化に重要な役割を果たしていることが推定されてきた。しかし、実際にロドプシン分子内のどの位置に水分子が存在し、また、どのようなアミノ酸と相互作用しているかについての情報はほとんど得られていなかった。そこで、本論文では、ロドプシン分子内の特定のアミノ酸を置換した部位特異的変異体を系統的に作製し、その変異体と天然のロドプシンとで観測される FTIR スペクトルの違いを指標として、分子内での水分子やそれと相互作用するアミノ酸についての情報を得ることを試みた。

まず、ロドプシン発色団（プロトン化レチナールシッフ塩基）の対イオンである Glu 113 を Gln に置換した変異体を解析し、天然のロドプシンでは発色団と Glu 113 の間に水分子を介した水素結合ネットワークのあることを明らかにした。また、Asp 83 や Gly 120 の変異体の検討から、この水分子以外にもう一つの水分子が発色団近傍に存在することを発見した。これらの知見から、ロドプシン内部には発色団結合部位と G タンパク質活性化部位とをつなぐ水素結合のネットワークのあることがわかった。

さらに、発色団の異性化の際に大きく変化するタンパク質由来の信号が、Thr 118 の OH 基であることを同定した。また、このアミノ酸の置換によって、ロドプシンの光異性化の効率が大きく変化することを発見した。ロドプシンがなぜ高い光感受性を示すのかは視覚の分野における長年の研究対象であるが、本論文により、その分子メカニズムの一端が明らかにされた。

FTIR 分光法では、X 線結晶回折法などとは違って個々の原子の絶対座標を決定することはできない。しかし、個々の原子の相対的な位置関係や変化過程については他の方法に比べてより詳細に検討できる。したがって、本論文で見いだされた種々の興味ある知見は、今後のロドプシンの機能発現に至る分子メカニズムの解明に大きく寄与すると考えられる。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。