

学位論文題名

古細菌型レチナール蛋白質の吸収波長制御機構

学位論文内容の要旨

【緒言】 高度好塩菌には高等生物の視物質と同様にレチナールを発色団とする光受容膜蛋白質が存在する。発色団であるレチナールの極大吸収波長 ($\lambda_{\max}$) は、蛋白質と結合することで大きく長波長にシフトする。この吸収波長変化はオプシンシフトと呼ばれる。蛋白質部分による吸収波長制御によりレチナール蛋白質はそれぞれ固有の吸収波長を持つこととなる。このオプシンシフトの程度の違いにより高等生物の場合、色覚が実現している。オプシンシフトが、蛋白質内のレチナール近傍構造とレチナール分子との相互作用により引き起こされるのは明らかであるがその詳細は解明されていない。古細菌型レチナール蛋白質であるバクテリオロドプシン (BR) は、その高い安定性と発現量が多いことから最も良く機能、構造が解明されている膜蛋白質の1つである。またファラオニスフォロドプシン (ppR) は他の3種の古細菌型レチナール蛋白質と大きく異なり短波長側に吸収波長を持つことが特徴の1つとして挙げられる。そこで本研究は、古細菌型レチナール蛋白質をモデルとして選択し、BR と ppR の吸収波長制御機構を解明することを目的とした。

【研究成果】 本研究の構成としては以下に示す4つに分けられる。それぞれの結果をまとめる。

- 1) 古細菌型レチナール蛋白質のアミノ酸配列の比較から見いだされる ppR に特徴的な3つの部位 (Val108, Gly130, Thr204) のみではレチナール蛋白質の吸収波長の違いは説明できない。しかし極性が変化する Gly130 (BR, Ser)、Thr204 (BR, Ala) は若干ではあるが吸収波長制御に寄与している。また3重変異体の結果から従来考えられていたオプシンシフトの相加性は必ずしも正しくないことが示された。
- 2) BR 様レチナール結合部位を持つ多重変異体 ppR (BR/ppR) を用いた解析では、BR/ppR の極大吸収波長 (524 nm) は BR (568 nm) と ppR (499 nm) の中間に位置し、吸収波長の差の 40 % 程度のシフトしか示さなかったことから、アミノ酸残基置換以外に構造の違いによる効果も関与していることが示された。また赤外分光測定からこの構造的要因はシッフ塩基近傍に存在することがわかった。さらに ppR に特徴的な性質である低温で安定な K 中間体の存在は、このシッフ塩基近傍構造がアミノ酸置換では変化させることが出来ない程、ppR では BR

と異なり特徴的であるためであることが示唆された。また暗条件下において BR と異なり all-*trans* 型レチナールのみ存在できる性質は β イオン環付近の構造の違いによる可能性が示唆された。

- 3) ppR のプロトン化シッフ塩基の対イオンは BR のそれに対応する Asp75 であることがわかった。また ppR の対イオン周辺は BR に比べ疎水性であることが示唆された。強酸性下においてシッフ塩基近傍のクロライドイオン結合には Asp75 以外にもう 1 つ解離性残基 (Asp201 が最も有力である) が関与することがわかった。D75E 変異体の可視吸収スペクトルに対する影響からプロトン化シッフ塩基と対イオンである Asp の相対距離は ppR と BR では異なることが示唆された。また pR 様蛋白質に特徴的なスペクトルの肩の有無はプロトン化シッフ塩基と対イオンの相対距離が決定していることも示唆された。発色団異性体組成比の分析から ppR ではレチナールが 13-*cis* 型をとった時にプロトン化シッフ塩基に対する対イオンの負電荷は BR よりも遠くに配置し、効果的な配置ではない可能性が示唆された。また 13-*cis* 型レチナールが安定に存在するためには対イオンが負電荷を持っていることが条件であるがわかった。
- 4) PMM 法を用いた吸収波長計算の結果、基底励起エネルギー差は 0.377 eV と算出され、実測の BR と ppR の吸収波長の差を再現していた。このエネルギー差の内訳は以下に示す 4 つの効果と同定された。1. レチナールの構造の違い、C=N 結合の長さによる効果 (10 %) 2. アミノ酸置換による効果 (60 %) この効果は主として 83 番目、105 番目、130 番目、204 番目のサイトのアミノ酸置換によるものであった。3. 構造の違いによる効果 (6 %) これは 83 番目、130 番目のサイトの主鎖の配置の違いによる効果が大部分を占める。4. Arg 残基の側鎖の向きの効果が 11 % 認められた。以上の効果が BR と ppR の吸収波長制御機構の主要因であると考えられる。

【結論】 本研究では以上のように BR と ppR の吸収波長の違いについての重要な知見が得られたが、その全容の解明にはさらなる検討または量子化学論によって得られた仮説の検証が必要であると考えられる。しかし、本研究によって得られた知見及び方法論は他のレチナール蛋白質の吸収波長制御機構に応用できると考えられる。また発色団と蛋白質の相互作用という面に注目すると、本研究のような分子機構の研究は小分子 (基質) と膜蛋白質 (特に結晶構造が報告されているロドプシンのような GPCR (G protein coupled receptor)) の相互作用解析にも応用が可能であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	加茂直樹
副査	教授	稲垣冬彦
副査	教授	横澤英良
副査	助教授	三宅教尚

学位論文題名

古細菌型レチナール蛋白質の吸収波長制御機構

レチナール蛋白質とは、ビタミン A のアルデヒド型であるレチナールを補欠分子とする色素蛋白質であり、我々高等動物の網膜に存在する光感覚のセンサーとなっているものがその1つである。そこには、明暗をみるロドプシンと色覚を司る3種の色素蛋白質があり、これらはすべてレチナール蛋白質である。色覚を司る色素蛋白質の吸収波長は、三原色に対応して赤、緑、青色の光を吸収するようになっている。また、明暗をみるロドプシンは青-緑色の光を吸収する。また、後述するように、高度好塩菌の細胞膜にはレチナール蛋白質が4種存在するが、それらの色素蛋白質の色は、紫から青色、および赤色となっている。さて、レチナール自身の吸収は約 380 nm 近辺にある。すなわち、レチナールがタンパクと結合すると、吸収波長が 380 から 580 nm 近くまで移動することが出来、レチナールが結合したそのまわりのタンパクの環境によって、種々の吸収波長をとる。この現象はオプシシフトと呼ばれている。このことは古くから不思議な現象として、生物学者、生物物理学者が実験的および量子力学をつかった理論的研究を行ってきた。その結果、種々の考えが提案されているが、いまだ、すべての研究者が納得する考えはない。

高度好塩菌の細胞膜には4種類のレチナール蛋白質が発現している。それらは、バクテリオロドプシン (bR と略す)、ハロロドプシン、センソリロドプシン、フォボロドプシン (pR と略す) である。前者3つの吸収極大波長は 560~580nm にあるが、最後のものは 500nm である。pR が発見される前から、極めて安定で大量に発現する bR を使って変異体を作製し、種々の性質を調べられていた。その中には吸収波長の研究もなされていたが、上述のように統一的な理解はされていない。申請者は前に高度好塩好アルカリ性菌である *Natronobacterium pharaonis* の細胞膜に存在するフォボロドプシン様蛋白質 pharaonis フォボロドプシン (ppR と略す) の大腸菌での発現系を構築した。そこで、申請者はこの発現系を使って、bR の研究結果とも比較しながら、ppR の吸収極大波長が bR のそれと比べて、なぜ 70nm も短波長シフトするのかを実験的また理論的に明らかにしようとした。

本学位論文は、4つのパートに分けることが出来る。まず、今までに報告されている23種の高度好塩菌のレチナールタンパクのアミノ酸の配列を比較すると、

長波長側に吸収極大のあるものではなく、500nm 近辺に吸収極大のある pR または ppR には完全に保存されているアミノ酸残基が3ヶ所あることが分かった。従来、オブシンシフトの起こる原因の一つとして、周囲のアミノ酸によってレチナールの場所に作られるローカルな電場の寄与が上げられていた。または、もっと直接的な相互作用（例えば、ファンデアワールス半径が互いに接触しあう等）も考えられる。そこで、これらの3ヶ所を bR の残基に置換した変異蛋白を作製したが、吸収極大は大きな変化を示さなかった。

ついで、レチナール結合部位に存在するアミノ酸をすべて bR のものに変異させた蛋白を作製した。変異させた部位は10ヶ所である。このように、レチナールの近傍のアミノ酸は全く bR と同じにも拘わらず、bR と ppR の吸収波長差の40%しか説明できなかった。この原因を明らかにするため、赤外分光法による検討を行った。レチナールは蛋白の特定のリジン残基とシッフ塩基を作って結合しており、ポリエンの鎖をへて他の端は β ヨノン環となっている。赤外分光では、 β ヨノン環近傍は bR 型と変化していたが、シッフ塩基の近傍では ppR の特徴を、このようなアミノ酸置換でも、残していた。

吸収極大を支配する因子の1つが、プロトン化シッフ塩基の対イオンをなす負に荷電する解離性残基である。これは75番目のアスパラギン酸であることが判明している。上で述べたように、シッフ塩基の近傍はアミノ酸置換にも拘らず、ppR 型であるので、このアスパラギン酸の吸収波長やレチナールの異性体組成におよぼす影響を詳細に検討した。

最後に、東京工業大学の櫻井助教授によって新しく開発された励起状態の蛋白部分の電子分極を考慮に入れることのできる量子力学的計算を行ない、1) シッフ塩基の C=N 結合長の bR と ppR の違い、2) アミノ酸の置換によるもの、3) 主鎖の配置の違い、4) あるアルギニン残基のグアニジン残基の方向の違い等の原因を明らかにしている。

このように、本研究は波長制御の問題を実験的および計算化学的に研究したものであり、薬学博士の称号を授与するにふさわしいと判定した。