

Title	ロドプシンの円二色性に関する研究
Author(s)	東, 真美
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/30085
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 2 】

氏名・(本籍)	^{あずま} 東	^{まさ} 真	^み 美
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	1917	号
学位授与の日付	昭和45年3月30日		
学位授与の要件	理学研究科生理学専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	ロドプシンの円二色性に関する研究		
論文審査委員	(主査) 教授 本城市次郎		
	(副査) 教授 殿村 雄治 教授 伊勢村寿三		

論 文 内 容 の 要 旨

ロドプシンを蛋白変性剤である尿素や塩酸グアニジンで変性すると、ロドプシンの吸収極大は短波長に移動し、シッフの塩基と同じ λ_{\max} をもつようになる。同様のことは、酸や熱変性によってもおこる。このことは、ロドプシンのオプシン(蛋白部分)・レチナール結合には、オプシンの高次構造に依存する部分とシッフ塩基結合の2種類があることを示唆している。ロドプシンを照射すると、少しずつ λ_{\max} の異なる種々の中間産物を経てオールトランスレチナールとオプシンに分解するが、この過程ではレチナールの異性化だけでなく、オプシンの高次構造も変化していると推定されている。ロドプシンが光を吸収してどのような変化をすることが視覚の第一段階となるかは非常に興味ある問題であるが、それを明らかにするため、ロドプシンの構造とそれが照射された場合の構造変化に大きな影響を与えているオプシンの構造に注目して研究を行った。

蛋白の高次構造の解析のためには、方法として旋光分散を用い、ウシのロドプシンとそれを照射したものについて調べた。その結果、ロドプシンの α -吸収帯 (λ_{\max} : 498nm) のある波長域に非常に小さいコットン効果があること、照射後にはこのコットン効果がみとめられないことが判明した。一方、紫外部における旋光分散から、ロドプシンのオプシンには α -ヘリックス構造が含まれ、照射するとランダムになる部分が少しあることが認められた。可視部でみとめられたコットン効果の大きさと存在する波長域をより正確に知り、このコットン効果がオプシンとレチナールのどのような結合に由来するのかを明らかにするため、以後この目的のためにより有効と考えられる円二色性の方法を用いた。

第一報 ロドプシンとイソロドプシンの円二色性

ウシのロドプシンの可視部(測定波長域: 300~600nm) 円二色性(CD)を測定すると、 α -吸

吸収帯 (λ_{\max} : 498nm) β -吸収帯 (λ_{\max} : 340nm) が共に光学活性であり、 Δe_{er} はそれぞれ 7.6, 9.8であることが判明した。9 シスレチナールを色素部分とするイソロドプシンも CD 吸収がみとめられたが、 Δe_{er} の値はウシより小さく、 α -吸収帯で 6, β -吸収帯で 5.5であった。ロドプシンを 20°C で光照射しても、暗の条件で 90°C まで温度を上げててもこのような CD 吸収帯は消失した。また紫外部 (測定波長域 : 200~250nm) CD 曲線は、ロドプシンの蛋白部分には α -ヘリックス構造が存在していることを示唆しており、20°C で光照射されると α -ヘリックス構造の約10%がランダム構造にかわることがみとめられた。11シスレチナールは遊離の状態では光学活性でないので、ロドプシンでは11シスレチナールがオプシンのある部分 (おそらく α -ヘリックス構造のようなひか酷的固定された構造をしている部分) に結合して対称性を失っていると考えられる。また9シスレチナールはオプシンとの結合がゆるく、従ってロドプシンより CD も小さく吸収極大も短波長にあると考えられる。

第二報 ロドプシンの旋光分散, 円二色性, アミノ酸組成に関する研究

カエルのロドプシンもウシと同様 α -吸収帯, β -吸収帯ともに光学活性であり、 $\frac{\Delta A_{er}}{A_{\max}}$ の値はそれぞれ 4.1×10^{-4} , 4.6×10^{-4} であった。ウシのロドプシンの $\frac{\Delta A_{er}}{A_{\max}}$ は α -吸収帯で 2.2×10^{-4} , β -吸収帯で 3.2×10^{-4} なので、カエルはウシより大きな値を示すことになる。紫外部の円二色性, または旋光分散から求められた $[\theta]_{222}$ $[\text{m}^2]_{233}$ の値をつかってヘリックス含量を計算すると、ウシおよびカエルのロドプシンでは約30%となった。また、ウシでもカエルでもロドプシンの蛋白部分のアミノ酸組成は殆んど同じこともたしかめた。従って、ウシのロドプシンとカエルのロドプシンで可視部の CD の大きさがちがうのは、オプシン全体のアミノ酸組成やヘリックス含量が異なることによるのではなく、レチナールに近接した部分のオプシンの構造が異なることによると考えられる。このことは、同じ種のロドプシンでも、抽出の方法をかえると CD の大きさが少し変化するという結果からも予測される。ロドプシンの蛋白部分のアミノ酸組成は、酸性アミノ酸 (特にグルタミン酸) が塩基性アミノ酸にくらべて多く、また疎水性側鎖をもつアミノ酸 (特にフェニールアラニン) が多いことが特徴的である。前者はロドプシンの pK が 5.43 であることの反映であるが、後者は膜に存在する水に不溶性の蛋白の性質を反映していると考えられる。ロドプシンでは、オプシンの疎水性側鎖に富んだ部分にレチナールが結合しており、分子全体として桿体外節の円盤膜にうめこまれて配列していると考えられる。

第三報 イカのロドプシンの円二色性

イカのロドプシン, イソロドプシンでも α -吸収帯, β -吸収帯が光学活性であった。ロドプシンを 0°C, pH 8.5 の条件で光照射すると、大部分はアルカリメタロドプシンが出来るが、それを pH 5.3 にするとアルカリメタロドプシンが酸性メタロドプシンになる。どちらの条件でも照射されないでこっているロドプシンの CD しかみとめられないので、メタロドプシンは光学活性でないと言える。イカのロドプシンの紫外部 CD から、ウシと同様 α -ヘリックス構造の存在が読みとれる。ロドプシンを 0°C で光照射すると、ヘリックス構造は変化しないが、照射後温度を上げていくとヘリックス構造が減少することがみとめられた。このことは、11シスレチナ

ールがオールトランス型にかわった段階であるメタロドプシンではヘリックス構造が変化しないが、レチナールがオプシンから遊離していくとヘリックス構造が変化することを示唆している。ヘリックス構造が変化しないロドプシンからメタロドプシンまでの過程でも紫外部 233nm で吸収が減少するので、たん白部分の構造変化があることは推定出来る。ロドプシンより長波長に吸収極大をもつ酸性メタロドプシンが光学活性ではないことより、 λ_{\max} を長波長に移動させる構造が可視部の CD を誘発するのではないと考えられる。また、ロドプシンでは11シスレチナールがオプシンと結合して固定され、レチナール分子が対称性を失うため光学活性になるが、オールトランス型になると11シス型とは結合していたオプシンのある部分がレチナールと結合出来なくなり、レチナールの対称性が回復すると考えられる。

論文の審査結果の要旨

この論文はウシ、カエル、イカのロドプシンの円二色性 (CD) について研究した成果で、3篇の報文から成っている。

第1報はウシのロドプシンとイソロドプシンの CD を測定した研究である。著者は前にロドプシンの旋光分散の研究を行ない、非照射の標品が 500nm 附近に弱いコットン効果を示すことを観察し、それがどのような構造に由来するかを明らかにする目的でこの研究を行なった。実験の結果、ロドプシンおよびイソロドプシンはそれぞれ 598nm および 487nm のピークとともに 430nm のシスピークをもつ CD スペクトルを示したが、これらはすべて照射または加熱によって消滅した。また 200-250nm の CD 測定から、ロドプシンは相当量のヘリックス構造を含むことがわかった。この研究によって11シス型、9シス型レチナールともに、オプシンとの結合によって光学活性となることがわかったのは大きな収穫である。

第2報はウシとカエルのロドプシンの CD を測定した研究で、可視部の CD 吸収が種によって異なること、紫外部の CD 測定からヘリックス含量がおおよそ30%と推定されること、またオプシンのアミノ酸組成をしらべた結果、酸性のものが塩基性のものより多く含まれること、疎水性のフェニルアラニンが他のタンパク質より多いことなどがわかった。著者はこれらの結果にもとづき、桿体外節円盤膜におけるロドプシンの存在様式について考察している。

第3報はイカのロドプシンとイソロドプシンの CD を測定した研究で、可視部の光学活性がメタロドプシンの段階で失われることを知り、さらに紫外部の CD スペクトルが照射によって変化しないことから、メタロドプシンではヘリックス構造に変化がないことがわかった。イカの酸性メタロドプシンの吸収極大はロドプシンより長波長にあるから、メタロドプシンの可視部が光学活性でないことは、レチナールとオプシンの間に CD に関係しない第3の結合があることを暗示する。

以上の研究は、ロドプシンにおけるレチナールとオプシンの結合について、シフ塩基結合のほかに可視部の CD を誘起する結合 および 吸収極大の長波長移動をおこさせる結合の存在を示唆し、困難な視物質の研究に新しい道を切り開いた推賞すべき研究である。3篇の参考論文はい

ずれもロドプシンに関するもので、著者の論文は博士学位論文として十分に価値あるものと認める。