

視物質における吸収波長制御機構 —アニオンによる制御を中心として—

(財)サントリー生物有機科学研究所 平野貴弘
京都大学大学院理学研究科生物物理学教室 七田芳則

The presence of multiple types of cone visual pigments with different absorption maxima is one of the molecular bases of colour vision. Because all of the visual pigments investigated so far contain 11-*cis*-retinal or its derivatives, the spectral shift would reflect the specific interaction of 11-*cis*-retinal with nearby amino acid residues. In addition, there is a unique mechanism of spectral red-shift observed in the visual pigments that have a chloride binding site. Here, we summarize recent investigations on the mechanism of spectral tuning in visual pigments including those having a chloride-binding site.

colour tuning / chloride effect / visual pigments / iodopsin / vibrational spectroscopy / dipole-dipole interaction

1. はじめに

ヒトを含む霊長類を始めとして、多くの脊椎動物は色を見分ける能力をもつ。この色識別能(色覚)はさまざまな波長感受性をもつ光受容タンパク質(視物質)によって実現される。これまで視物質の色感受性に関する研究は、比較的簡単かつ大量に調製可能なロドプシン(Rh)を実験材料として行われ、その物理化学的性質が詳細に調べられてきた。しかしRhは、薄暗がり働き、色覚には関与しない桿体視細胞に含まれる視物質である。これに対して、実際に色覚を担う錐体視細胞の視物質(錐体視物質)を用いた研究は、試料調製の困難さからほとんど行われてこなかった。最近になって生化学的・物理化学的研究に十分な量の錐体視物質を視細胞から分離・精製する技術、さらには培養細胞系での発現技術も確立され、さまざまな波長感受性を持つ錐体視物質の波長制御機構が実際のテーマとして浮かびあがってきた。

視物質の吸収波長は、光を吸収する発色団とその周りのアミノ酸残基との相互作用によって決まる。それに加えて錐体視物質の中には、塩化物イオン(以下、Cl⁻イオンと記述)が結合すると吸収波長が長波長にシフ

トするグループ(グループL, 後述)があり、その波長シフトの機構が最近のトピックとなっている。我々はCl⁻イオンによる波長制御機構を明らかにするため、従来の可視分光法に加えて振動分光法を用いた解析を進めている。振動分光法を用いることで、可視分光法では得られない発色団の特定の部分の構造や、タンパク質部分の構造変化に関する情報を得ることができる。本稿ではCl⁻イオンの結合による長波長シフトを含めた視物質の吸収波長制御機構について、これまでの報告と我々の最近の研究成果を概説する。なお、本稿中の残基番号は特に断らない限り、対応するウシRhの番号で表記した。

2. 視物質の吸収波長制御機構

2.1 視物質の基本構造と吸収波長の多様性

視物質は、視細胞外節の脂質二重膜中に存在する光受容タンパク質であり、アポタンパク質であるオプシンと、発色団の11-シスレチナールからなる。オプシンは約350個のアミノ酸からなり、7本の α ヘリックス(N末端側よりヘリックスI-VII)が膜を貫通する構造をもつ。発色団であるレチナールは β イオン環部分とポリエーテル鎖部分からなる(図1b)。発色団はヘリックスVII

Mechanism of Spectral Tuning in Visual Pigments

Takahiro HIRANO* and Yoshinori SHICHIDA**

* Suntary Institute for Bioorganic Research

**Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University

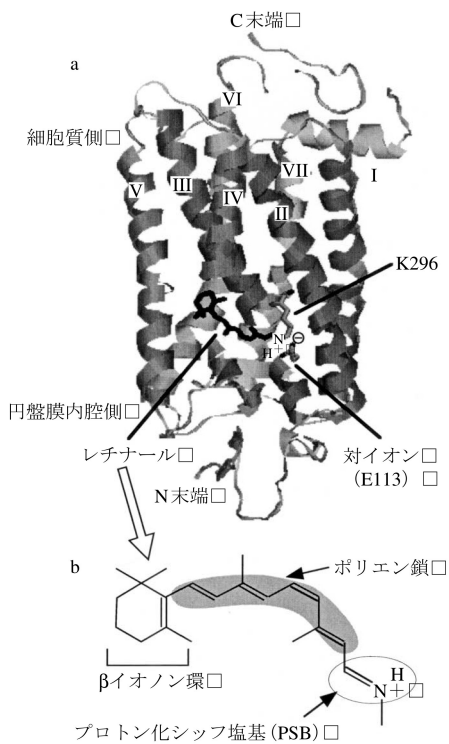


図1 a) ウシロドプシン (Rh) の立体構造. 図中のI~VIIは7本の膜貫通ヘリックスを表す. PSBを形成する発色団レチナールとLys296およびその対イオンのGlu113を表示した(文献2を改変). b) 発色団の構造式. 発色団であるレチナールはβイオン環部分とポリエン鎖部分(影付きの部分)からなる.

のLys残基(ウシRhではN末端から数えて296番目の残基; K296)とプロトン化した Schiff 塩基 (protonated Schiff base; PSB) 結合を形成し, 膜貫通ヘリックスに囲まれている. またヘリックスIIIの解離したGlu残基(E113)がPSBの正電荷(プロトン)を安定化させる対イオンとして働く. 最近, 岡田らによってウシRhの三次元結晶が作製され, X線回折の手法でその立体構造が解明された¹⁾(図1a).

ヒトの眼にはRh以外に赤, 緑, 青に波長感受性をもつ錐体視物質が存在し, 3原色的な色覚の分子基礎となっている. 一方, 我々が研究材料として用いているニワトリの眼には1種類のRhと, 赤, 緑, 青, 紫色に波長感受性をもつ錐体視物質が含まれる(図2). 鳥類から魚類までの脊椎動物で色覚を有するものの多くは錐体視物質を4つ持つが, 霊長類の一部を除いた哺乳類には2つしかない. このことから哺乳類の進化の過程で色識別能力がいったん退行したと推察される. その後霊長類の進化の過程で遺伝子重複により新たな錐体視物質を獲

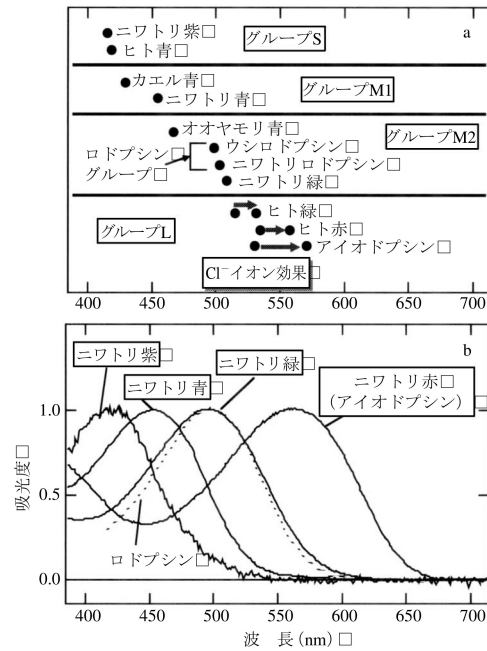


図2 a) 脊椎動物視物質の4つのグループと吸収極大波長. グループLの視物質はCl⁻イオンが結合すると吸収波長が長波長にシフトする. b) ニワトリ視物質の可視吸収スペクトル(点線: Rh).

得し, 3原色的な色識別能力が発達したのである.

さまざまな吸収極大波長をもつ視物質が存在するのに対応して, それらのオプシンのアミノ酸配列も多様である. 錐体視物質はアミノ酸配列の相同性を基に4つのグループに分類される. 各グループ内の視物質は互いに近い吸収極大波長を示し, 短波長側から順にグループS(紫), M1(青), M2(緑), L(赤)と呼ばれる³⁾(図2). アミノ酸配列の相同性が高い視物質間で吸収極大波長が近いことから, それぞれのグループ内で保存されたアミノ酸残基が波長制御に関わると想像される. では実際にどんな機構で吸収波長が制御されているのだろうか?

2.2 色覚に働く視物質(錐体視物質)の吸収波長制御機構

有機溶媒中で11-シスレチナール($\lambda_{max} \sim 380 \text{ nm}$)とブチルアミン(Lys側鎖のアナログ)から Schiff 塩基を作ると, その吸収極大波長は約360 nmになる. この溶液中に塩酸を加えて Schiff 塩基をプロトン化させ, PSBにすると約440 nmにシフトする. ヒトやニワトリの錐体視物質の発色団はすべて11-シスレチナールであり, Lys残基とPSB結合を形成する. そこで有機溶媒中のPSBを基準として視物質の吸収極大波長の違い(オプ

シフトと呼ぶ)を説明する機構が研究されている。

量子化学計算を基礎とした研究からオプシシフトの機構として以下の3つが提唱されている。すなわち (a) PSBのプロトンと対イオンとの相互作用の強さ, (b) 発色団近傍の極性または分極率の大きい側鎖との静電的相互作用, (c) 発色団近傍の側鎖との立体障害による発色団ポリエーテル鎖のねじれ, である。いずれも発色団の共役系 π 電子の状態を変化させ, 基底状態と励起状態間のエネルギー差を調節する。これらの波長制御機構が実際の視物質内でどのように実現しているかを知るには発色団の構造や電子状態を実験的に調べる必要があるが, その方法として分子構造に敏感な共鳴ラマンスペクトルやフーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 法などの振動分光法がよく利用される。

(a) の解析では, 対イオンと相互作用するプロトンと, それが結合している窒素原子の間のN-H伸縮振動を測定し, その波数の大きさから相互作用の強さを検討するのが直接的である。しかし, 現在のところこのモードは同定されておらず, 一般には以下の現象が利用されている。PSBのC=NHにおいて, C=N伸縮振動とN-H変角振動は波数が近いために互いに混じり合った振動を生じ, 本来のC=N伸縮振動からはシフトしている(共役という)。一方, 重水水和によってC=NHのHを重水素置換したN-D変角振動は, 低波数側に大きく外れるためC=N伸縮振動と共役せず, 本来のC=N伸縮振動のバンドが現れるので, バンドが見かけ上シフトする。このときのバンドのシフトの値が大きいほど, PSBのN-H部分と対イオンとの相互作用が強いことを示すことが知られており, これを指標とすることができる。

一方, (b) と (c) については, 振動スペクトルにおける指紋領域* (C-C伸縮振動の領域) やポリエーテル鎖の炭素に結合している水素の面外変角振動 (hydrogen-out-of-plane; HOOP) を指標として検討される。以下では錐体視物質を用いた波長制御機構に関する研究例を紹介する。

A. ヒト緑とヒト赤の間の波長制御機構

ヒト赤 ($\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$) とヒト緑 ($\lambda_{\max} = 530 \text{ nm}$) はともにグループLに属し, 約3,500万年前に遺伝子重複によって作られた視物質である。視物質全体の多様

* 1300 cm^{-1} から 1100 cm^{-1} の領域に現れるバンドは, 一般に分子の構造 (原子の幾何学的配置) を反映して変化するため構造研究に用いられ, 指紋領域 (fingerprint region) と呼ばれる。この領域には, 主にレチナールポリエーテル鎖のC-C伸縮振動に由来するバンドが観測される。

化にかかった時間 (数億年) から見ればごく最近で, 両者のアミノ酸配列で異なるのはたった15残基 (365残基中) である。しかし両者の吸収極大波長には約30 nmの違いがあり, ヒトの色識別能力はこの2つの視物質に大きく依存する。Asenjoらはこれら15残基について部位特異的変異体を系統的に作製し, そのうちの7残基の違いで両者の吸収極大波長の違いが決まることを示した⁴⁾。7残基中6残基が極性の変化 (水酸基の有無) を伴い, 特にN末端から (対応するウシRhの番号で) 164, 261, 269番目の残基の置換によって両者の極大波長の差がほぼ再現される。またRhの立体構造を基にこれら3残基の位置を推定すると, すべて発色団の β イオン環付近に位置することがわかる。したがって「発色団の β イオン環付近に極性基が存在すると極大波長が長波長シフトする」と考えられる。

また共鳴ラマンスペクトルの測定から, 上記の残基による波長シフト機構が推定された⁵⁾。一般に指紋領域の振動は分子に加わる局所的な摂動 (骨格の変動や点電荷の存在など) に敏感だが, この領域の振動モードはヒト赤と緑で違いが見られなかった。またC=NH伸縮振動にも違いがなかったことから, 発色団PSBと対イオンとの相互作用も同じであると推定された。以上の結果から, 吸収波長制御機構のうちの (a) および (c) の可能性は否定され, 両者の違いはヒト赤に含まれる水酸基が双極子として働き, 発色団に遠隔相互作用を及ぼすからであると考えられる。

では反対にPSB結合の近くに双極子を導入すると短波長シフトが起こるのだろうか? この考えは今のところ正しいようである。実際, マウス緑 ($\lambda_{\max} = 508 \text{ nm}$) やイルカRh ($\lambda_{\max} = 489 \text{ nm}$) では, 発色団と結合するLysからヘリックス1巻き分離した位置に存在するSer (水酸基をもつ) が短波長シフトの原因になっている^{6), 7)}。Rhの変異体の共鳴ラマンスペクトルにおける指紋領域やC=NH伸縮振動の結果から, このSerはPSBと直接相互作用するのではなく双極子として遠隔相互作用をすると推定されている⁵⁾。

B. 錐体視物質とロドプシンの波長制御機構の違い

量子化学的な計算から, PSBの正電荷と対イオンとの距離の違いによってPSBの吸収極大が440 nm付近から580 nm付近まで変化することが示された。そのため, 視物質が多様な吸収波長を示すのはこの距離の違いによると推定された。しかし最近発表されたウシRhの立体構造では, その距離は3.2 Åで有機溶媒中のPSBと対イオン (Cl⁻イオン) との距離と変わらず, 視物質の間でもほとんど変わらないと想像される。一方, いろいろな視物質の発色団のC=NH, C=ND伸縮振動を調べたと

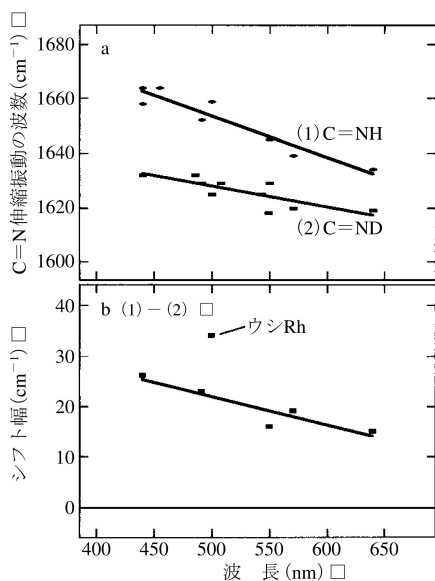


図3 視物質のC=NH, C=ND伸縮振動 (a) とそのシフト幅 (b) の波長依存性
 パソ中間体および9シス型の発色団をもつアイソ色素のデータも含む。重水素化に伴うシフト幅が直線関係を示すが、Rhは直線から外れる。

ころ、Rhでは発色団と対イオンとの相互作用の仕方が他の視物質とは異なることがわかってきた。

N-D変角振動がC=N伸縮振動とは共役しないことから、C=ND伸縮振動はC=N伸縮振動そのものであり、C=Nにおける電子の非局在化の程度を表す。よって、その波数を視物質の吸収極大波長に対してプロットすると直線関係を示す(図3a)。一方すでに述べたように、C=NH伸縮振動とC=ND伸縮振動の差は対イオンとの相互作用の強さの目安になる。錐体視物質や9シス型の発色団をもつ色素の値はその吸収極大に対して直線関係を示すが、Rhはこの直線から外れる(図3b)。つまりRhでは他の色素に比べて対イオンとの相互作用が特に強いことがわかる。KochendoerferらはウシRhとヒト緑のラマンスペクトルの比較から「両者の吸収極大波長の差はPSB-対イオン相互作用の強さの違いに起因する」と結論したが⁹⁾、シフトの機構はそれほど単純ではないらしい。

なぜRhだけが特殊な相互作用をするのか今のところ不明だが、Rhの構造から他の色素の分子構造を推定する際の重要な鍵となる。ウシRhの立体構造では、発色団の近傍4 Å以内には16個のアミノ酸残基が存在する¹⁾。そのうちすべての錐体視物質で保存されRhのみで異なるのはN末端から189番目の残基で、RhではIle、錐体

視物質ではProである。我々はFT-IR法と部位特異的変異体を用いた解析から、このProが錐体視物質の性質を決定する残基の1つであると推定した⁸⁾。Proはポリペプチドの二次構造を局部的に不安定化させる性質をもつ。したがってPro→Ileの置換に伴う構造変化が、Rhの発色団のPSB周辺で特別な相互作用の形成をもたらす可能性が考えられる。

3. Cl⁻イオンの結合に伴う長波長シフトの機構

1968年にCrescitelliは、オオヤモリ視物質の1つがCl⁻イオン濃度に依存した吸収極大波長のシフトを示すことを発見した。またKnowlesら、Fagerらはニワトリの赤色感受性視物質であるアイオドブシン(Iod)の吸収極大波長がCl⁻イオンの結合によってシフトすることを見出した。その後これらの視物質の一次配列が決定され^{9), 10)}、これらは現在グループLと呼ばれる視物質群を形成することが明らかになった³⁾。

Cl⁻イオンによる波長シフトはおもにIodで詳細に調べられ、(1) Cl⁻イオンが結合すると吸収極大波長が約40 nm長波長シフトする(2) ハロゲン化物イオンの中でもCl⁻イオンとBr⁻イオンは同じ効果を及ぼすが、I⁻イオンではシフトはほとんど起こらない(3) 硝酸イオンもIodに結合はするが吸収のシフトは起こさない(4) 二価アニオンや、かさの高い一価アニオン(グルコン酸イオン等)は結合しない、等の実験事実が示された。以上の結果から、Cl⁻イオンは発色団近傍に存在するアミノ酸残基に結合していると考えられた。

一方、Cl⁻イオンの結合に関わる残基の同定がヒト赤および緑の部位特異的変異体の作製により行われ、細胞外第2ループに位置するHisとLysであることが示された¹¹⁾(図4)。この結果は当時の研究者たちを少なからず驚かせた。膜貫通領域に囲まれて存在する発色団はループ領域から遠く離れており、Cl⁻イオンが結合しても発色団には作用しないと考えられたからである。

我々はIodに結合するCl⁻イオンと硝酸イオンが波長シフトに関して異なる効果を示すことに着目し、両者の結合の仕方と波長シフトの機構をFT-IR法で検討した。試料としてCl⁻イオン結合型Iodと硝酸イオン結合型Iod、さらにアニオンを含まない溶液中でのIod(アニオン非結合型Iod)を調製した^{12), 13)}。

Iodに結合しているCl⁻イオンを硝酸イオンに置換すると、吸収極大波長が571 nmから530 nmにシフトする。またアニオン非結合型Iodも530 nmに吸収極大を示す。硝酸イオンはCl⁻イオンと同じ部位に結合することが証明されているので¹⁴⁾、Cl⁻イオンが結合する際には硝酸イオンの結合では起こらないタンパク質部分の

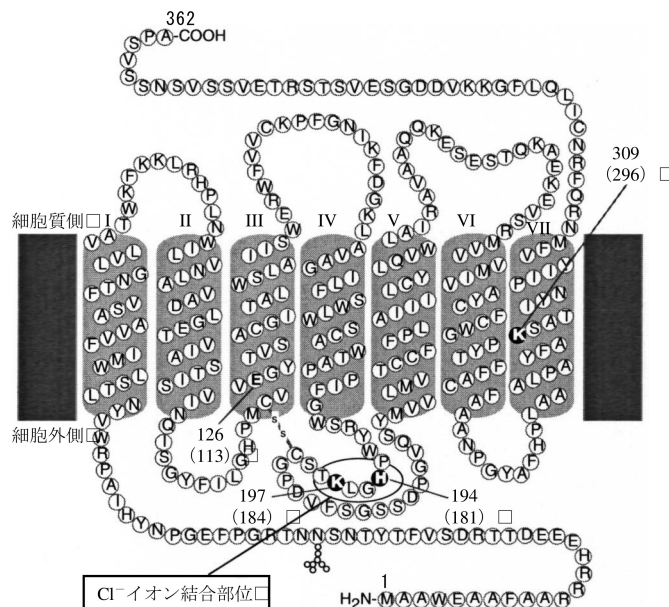


図4 アイオドプシン (Iod) の2次構造モデル (文献10を改変)
 かつこ内の数字はウシRhの該当する位置の残基番号を表す。H194 (181), K197 (184) はグループL共通のCl⁻イオン結合部位。

構造変化が起こると推定された。

そこで我々は上記3つのIod試料を用いて、Cl⁻イオン特異的に起こる構造変化の情報を得ることを試みた。まずIodのC=NH, C=ND伸縮振動の波数はCl⁻イオン結合型と硝酸イオン結合型とで変わらず、Iodにおける発色団と対イオンとの相互作用はCl⁻イオン結合によって変わらないことがわかった。またC-C伸縮振動と水素面外交角振動(HOOP)を比較しても有意な差がないことがわかった。以上のことから、Cl⁻イオンは結合部位となる正の電荷をもつアミノ酸残基と電気双極子を形成し、発色団に遠隔的な作用を及ぼすと推定された。

一方Iodを液体窒素温度で光照射して生成するバソ中間体のFT-IR測定から、結合したCl⁻イオンの発色団に対する位置が推定された。異性化前のIodの発色団の振動モードはCl⁻イオンの結合によって変化しない。一方、発色団がトランス型に光異性化したバソ中間体では、発色団のC₁₄に結合している水素原子のHOOPがCl⁻イオンの結合によって大きく変化することを見出した。したがって、Cl⁻イオンは発色団のC₁₄の近くに存在することが示唆された。さらに水分子のO-H伸縮振動が現れる波数領域を検討した結果、Cl⁻イオンは1個の水分子を伴って結合することが示唆された。この水分子の挙動は、Cl⁻イオンと硝酸イオンとの存在場所の

違いや、両者のアニオンとしての性質の違いを反映すると考えられ興味深い。

FT-IR法では発色団だけでなく、タンパク質の局所的な構造変化も捉えることができる。そこでCl⁻イオンの結合によって特異的に変化するバンドを検索したところ、アミド結合(C=O伸縮振動)に由来するバンドが1700 cm⁻¹付近に現れることを発見した。ペプチドのモデル化合物を測定した文献値によると、典型的なα-ヘリックスでは約1655 cm⁻¹、逆平行のひだ状βシート構造では約1694 cm⁻¹になる。したがって、Cl⁻イオンの結合によりIod中のβシート構造の変化が起こると推定された。

4. アイオドプシンにおけるCl⁻イオン結合部位の構造

昨年に発表されたウシRhの立体構造は、IodにおけるCl⁻イオンの結合部位についても重要な示唆を与えた。すなわち、細胞外ループに存在してCl⁻イオンの結合に関与する残基がその周りの残基とともにβシート構造をとり、発色団の近くに位置する可能性が示唆されたのである(図1参照)。IodのCl⁻イオン結合部位であるHis残基の位置に該当するウシRhの残基はGlu(E181)であるが、E181のカルボキシル基は発色団のC₁₂, C₁₄からそれぞれ4.5, 5.3 Åの距離に位置している。

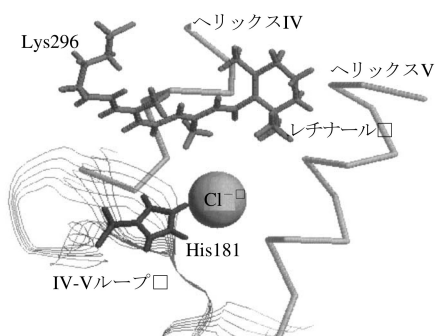


図5 Cl⁻イオンによる長波長シフト機構 (模式図)
Cl⁻イオンとHis181の正電荷が形成する電気双極子により、吸収極大波長の長波長シフトが誘起されると考えられる。

またE181はY268, Y192と水素結合可能な距離(それぞれ2.9, 3.2 Å)にあり, Y268とY191が水素結合を形成しうる位置(2.8 Å)にある。そこで我々は, IodとRhでヘリックスやループの主鎖構造が同様であると仮定してIodの立体構造モデルを作製し, Cl⁻イオン結合部位の構造を推定した(図5)。その結果Cl⁻イオンは発色団に対して約5 Å離れており, Cl⁻イオンとHisが形成する双極子が発色団に静電的作用を及ぼすと推定された。Cl⁻イオンとともに1個の水分子が発色団の近くに結合するという我々の結果は現在のところモデルとして再現できないが, この水分子の結合位置はイオン種による細胞外第2ループの構造的な違いを解明する鍵になると考えている。今後はアイオドプシンそのものの立体構造解析も視野に入れた詳細な振動スペクトル解析が必要であろう。

5. おわりに

視覚情報の中でも色覚情報が重要な地位を占めていることは言をまたないが, その分子機構の解明はこの分野の長年のテーマである。本稿では視物質における波長シフトの機構について最近の研究を展望したが, 研究が進むにつれて新たな疑問がわき起こってくることも事実である。物理化学的(電子状態の解析)には波長シフトが起こる機構はすでに解析しつくされた感があるが, 実際のタンパク質内でどのように実現されているかを解析することが今後の問題であろう。例えば実際のタンパク質の中では長波長シフトを起こす残基(水酸基をもつ残基)は発色団のβイオン環付近に位置し, その逆のシフトを起こす残基はシッフ塩基近傍に存在する。しかし発色団の電子状態を考えると, βイオン環付近に存在している残基の配向が変化するこ

とで短波長シフトが起こっても不思議ではない。視物質はある特別の波長を吸収する以外に, 光を効率良く受容し, また構造変化を通じてGタンパク質を活性化するという機能をもつ。つまり波長制御の問題は発色団の物理化学的な問題であると同時に, 視物質の基本的機能のために設計された立体構造を抜きにしては解析できない問題である。生物は進化の過程で紫から赤までの波長を見ることができるようになった。したがって, 「生物は将来赤外線を見ることができるとか」といった問題などは非常に興味深い, その解決にはさらなる研究が必要であろう。多くの若い研究者がこの分野に参入されることを期待している。

文献

- 1) Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000) *Science* **289**, 739-745.
- 2) 岡田哲二 (2001) *生物物理* **41**, 142-146.
- 3) Okano, T., Kojima, D., Fukada, Y., Shichida, Y. and Yoshizawa, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5932-5936.
- 4) Asenjo, A. B., Rim, J. and Oprian, D. D. (1994) *Neuron* **12**, 1131-1138.
- 5) Kochendoerfer, G. G., Lin, S. W., Sakmar, T. P. and Mathies, R. A. (1999) *Trends. Biochem. Sci.* **24**, 300-305.
- 6) Sun, H., Macke, J. P. and Nathans, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8860-8865.
- 7) Fasick, J. I. and Robinson, P. R. (1998) *Biochemistry* **37**, 433-438.
- 8) Imai, H., Hirano, T., Kandori, H., Terakita, A. and Shichida, Y. (2001) *Biochemistry* **40**, 2879-2886.
- 9) Kojima, D., Okano, T., Fukada, Y., Shichida, Y., Yoshizawa, T. and Ebrey, T. G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6841-6845.
- 10) Kuwata, O., Imamoto, Y., Okano, T., Kokame, K., Kojima, D., Matsumoto, H., Morodome, A., Fukada, Y., Shichida, Y., Yasuda, K., Shimura, Y. and Yoshizawa, T. (1990) *FEBS Lett.* **272**, 128-132.
- 11) Wang, Z., Asenjo, A. B. and Oprian, D. D. (1993) *Biochemistry* **32**, 2125-2130.
- 12) Imamoto, Y., Hirano, T., Imai, H., Kandori, H., Maeda, A., Yoshizawa, T., Groesbeck, M., Lugtenburg, J. and Shichida, Y. (1999) *Biochemistry* **38**, 11749-11754.
- 13) Hirano, T., Imai, H., Kandori, H. and Shichida, Y. (2001) *Biochemistry* **40**, 1385-1392.
- 14) Tachibanaki, S., Imamoto, Y., Imai, H. and Shichida, Y. (1995) *Biochemistry* **34**, 13170-13175.



平野貴弘

平野貴弘 (ひらの たかひろ)

(財) サントリー生物有機科学研究所 博士客員研究員
2001年 京都大学大学院理学研究科博士課程修了, 理学博士.
連絡先: 〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1
E-mail: hirano@sunbor.or.jp

七田芳則 (しちだ よしのり)

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学教室 教授
連絡先: 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
E-mail: shichida@photo2.biophys.kyoto-u.ac.jp
URL: <http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/index.html>