

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ロドプシンをモデルとしたG蛋白質共役型受容体の構造・機能解析

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

七田 芳則 (京都大学大学院理学研究科 教授)

主たる共同研究者

岡田 哲二 ((独)産業技術総合研究所脳神経情報部門 主任研究員)(平成13年12月～)

神取 秀樹 (名古屋工業大学大学院工学研究科 教授)(平成14年4月～)

中谷 敬 (筑波大学大学院生命環境科学研究科 助教授)(平成16年4月～)

3. 研究内容及び成果:

### 研究課題全体の研究内容及び成果

G蛋白質共役型受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)は7本膜貫通 $\alpha$ -ヘリックス構造を持つ膜蛋白質で、外界からの種々の情報を受容してG蛋白質を介する細胞内情報伝達カスケードを駆動する。本研究では、機能解析の進んでいるロドプシンのG蛋白質活性化機構を原子レベルで解析することを試みた。また、GPCR一般の構造・機能・多様化について、ロドプシンをモデルとした研究を展開した。研究の結果、原子の絶対座標からロドプシンのG蛋白質活性化に至る過程を解析し、また、ロドプシンをモデルとして一般のGPCRのリガンド結合機構も解析できることを示した。さらに、ロドプシンで得られた知見を利用すると、アミノ酸配列の相同性のないGPCRの機能解析もできることを示した。また、ノックインマウスの作製によりGPCRロドプシン類の生体内での機能解析にも成功した。下記にはそれぞれの成果について、研究グループごとに記述する。

### 七田グループの研究内容および成果

1) アゴニスト(all-trans-retinal)と直接結合するロドプシンを発見し、立体構造が既知のロドプシンのメリットを生かしてGPCRのアゴニスト結合機構を解析する道筋を示した。また、ロドプシンとアミノ酸配列の相同性のない代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)をターゲットとして、「CAMサイトの同定とジスルフィド結合によるヘリックス構造変化の阻害」という、アミノ酸配列によらない構造・機能解析の手法を開発した。以上のことから、ロドプシンをモデルとしたGPCR一般の研究が可能であることを実証した。

2) 種々のロドプシン類の機能解析の結果から、以下の知見を得た。①脊椎動物ロドプシンは、分子進化の過程で可視光を受容するのに必須なアミノ酸(対イオン)の変位を起こし、その結果として高効率なG蛋白質活性化能を獲得した。②哺乳類の体内時計の光センサー細胞(光感受性神経節細胞)は無脊椎動物の感桿型視細胞と起源が同じである。③トカゲの頭頂眼には1つの光受容細胞の中に2種類のロドプシン類が存在し、アンタゴニスティックなシグナル伝達を制御している。

### 岡田グループの研究内容および成果

2000年に発表したロドプシンの立体構造の分解能を2.6 Åにまであげ、ロドプシン中に存在する機能に必須な水分子の同定に成功した。また、2.2 Åにまで分解能をあげることで、理論計算に耐える立体構造の構築に成功した。さらに、ロドプシン光受容後に生成する初期中間体、バソロドプシンおよびミロドプシンの立体構造を決定し、ロドプシンのG蛋白質活性化機構を原子の絶対座標から議論できるまでに発展させた。このことにより、ロドプシン研究に質的な転換をもたらした。

### 神取グループの研究内容および成果

X線回折法では不可能なm Åでの構造や構造変化過程を明らかにするため、フーリエ変換赤外分光法を用

いて、ロドプシンおよびその類縁蛋白質についての構造解析研究を展開した。その結果、ロドプシン発色団のシッフ塩基近傍の水分子の配置を明らかにした。また、ロドプシンの光受容後に生成する中間状態での水素結合ネットワークの変化、ヘリックス構造の変化、 $\beta$ -シート構造の変化などに関する広範な知見を得た。

#### 中谷グループの研究内容および成果

ロドプシン類の多様化が細胞機能の多様化を導くかどうかを実験的に検証するため、七田グループと共同してノックインマウスを作製して検討した。その結果、ロドプシンの性質が、視細胞の光感受性、波長感受性、応答の立ち上がりと回復過程、光順応からの回復過程に関与していることが明らかになった。また、錐体視物質をノックインした桿体視細胞の光感受性と暗ノイズの解析から、錐体視物質から分岐したロドプシンがさらに機能進化することにより1個の光子を検出できる桿体の性質が生まれたことを発見した。

#### 4. 事後評価結果:

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本プロジェクトにおいて研究代表者らは、ロドプシンについてのこれまでの最先端の研究をさらに発展させるとともに、ロドプシン類の研究をいかにしてGPCR一般の機能解析の研究に展開していくかについて検討した。本プロジェクトの成果は国内23報、海外80報の論文としてまとめられ、PNAS, Angew.Chem.Int.Ed., Curr. Biol., Nat.Struct. Mol. Biol., Science などにも掲載され、研究成果の公表は十分に行われている。また、研究代表者および共同研究者が本プロジェクトの期間中に国際会議で44回、国内の会議で66回の招待講演をしたことも、本プロジェクトの活動が国内外で高く評価されたことを示している。実際、本プロジェクトで取り上げた主要な課題(X線解析によるロドプシンおよびその中間体の立体構造の解明、振動分光法による蛋白質内部での水分子の同定、リガンド結合型ロドプシンの発見、mGluRの機能解析、ノックインマウスを利用したロドプシン類の生理機能解析)すべてで招待講演を行っている。特許申請はないが、本プロジェクトの研究方向がGPCRの一般性と多様性に向けた基礎的な研究であることを考慮すると、将来、GPCRの基本的なメカニズムの知見の上立った特許申請が行われることを期待したい。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

GPCRを非常に重要な創薬ターゲットとしてみた場合、唯一立体構造が決定されているロドプシンは多くのGPCRの機能解析モデルとして重要である。本プロジェクトによりアゴニスト結合能を持つロドプシンが発見・解析されたことにより、機能解析モデルとしてのロドプシンの唯一の欠点を取り除かれた。今後は、アゴニスト結合からG蛋白質活性化に至る基本的な活性化メカニズムの知見に裏付けられた創薬(リガンド改変)研究が進むと期待される。また、ロドプシンで得られた知見を基にした機能解析法が、アミノ酸配列や立体構造の類似性のないGPCRの機能解析にも適用できることが示されたことより、分子アーキテクチャー(構築原理)の違うGPCRの機能解析にも新たな展開が期待される。さらに、ロドプシン類の分子的性質の進化により新たな細胞機能が生じたことが示され、分子進化学にも貢献した。

##### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本プロジェクトの期間中に、多くの研究者が育った。実際、研究期間の間に2名が教授、1名が助教授、1名が講師に昇進し、3名が助手として採用された。また、多くの大学院生がポスドクとして研究者の道を目指していることも、このプロジェクトの発展性を物語っている。

(受賞)岡田哲二:「リサーチフロントをリードする研究者」(2004年)