

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成 13 年度採択研究代表者

七田 芳則

(京都大学大学院理学研究科 教授)

## 「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」

### 1. 研究実施の概要

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) はヒトゲノム中に 1000 種程度が同定され、創薬分野における最も重要なターゲット蛋白質である。本研究では、GPCR の中で最も研究の進んでいるロドプシンのリガンド結合機構や G 蛋白質活性化機構を原子レベルで解析し、その知見をもとに一般の GPCR の構造・機能解析を進める。具体的には、ロドプシンの光受容から G 蛋白質の活性化に至る反応過程を X 線結晶回折法と種々の分子生物学的・生化学的・分光学的手法を組み合わせ原子レベルで解析し、GPCR による G 蛋白質活性化機構解明の先駆けとなる知見を得る。また、得られた知見を基にして、ロドプシンを鋳型としたモデル GPCR を作成し、一般の GPCR の G 蛋白質活性化機構を系統的に解析することを試みる。また、ロドプシンの特殊なリガンド結合部位を改変し、ロドプシンをリガンドの結合によって活性化する一般の GPCR に変換することを試みる。これらの研究により現在 2000 種以上が発見されている GPCR について、リガンド結合機構、G 蛋白質活性化機構を簡便に検索する方法を提示し、創薬分野で重要なターゲットである GPCR の機能制御のための戦略を提示する。一方、GPCR のアミノ酸変異による生理機能の多様化について、ロドプシン類を例として解析する。具体的には、ロドプシン類の多様化に伴う新規視覚機能の分子メカニズムを解析し、機能多様化に関わるアミノ酸変異の役割について解析する。

### 2. 研究実施内容

平成13年度は七田グループと岡田グループで、設備備品の購入・設置を中心とする研究環境の整備を行うとともに、次年度以降の研究の飛躍を目指した基礎的な実験を中心に行うことを計画した。具体的には以下の研究を行った。

七田グループ

#### 1) ミリÅ分解能でのロドプシン機能の解析

我々は、光親和性レチナールアナログを利用して光を受容したロドプシン中での発色団の動きを直接測定することを試みた。そして、トランス型に異性化した発色団のβ-イオン環部位がヘリックスVIからヘリックスIVに向かって位置移動を起こし、この移動によってヘリックスIIIおよびIVの相対的位置が変化することを見いだした。そこで、ロドプシンの光反応過程に現れる多くの中間体においてこれらの動きを詳細に検討し、原子レベルでの機能解析を行うため、中間状態

(バソロドプシン、ルミロドプシン、メタロドプシン I) の FTIR スペクトルの精密測定を行った。この際、蛋白質部分の構造変化が温度に依存することを利用して、極低温 (77K) から室温付近までの温度領域での中間体の光反応も検討した。その結果、ルミロドプシンは極低温下で光照射しても、蛋白質部分の局所的な構造変化を伴ってもとのロドプシンに変化することが確認された。一方、メタロドプシン I を極低温下で光照射してもロドプシンに戻らないことから、メタロドプシン I ではすでに蛋白質部分の大きな構造変化が起こっていることが推定された。光親和性レチナールアナログを用いた実験では、ルミロドプシンの段階ですでに発色団の  $\beta$ -イオン環の位置移動が起こることが推定されている。したがって、ロドプシンの蛋白質中にはヘリックスの大きな再配置を伴わずに発色団  $\beta$ -イオン環の位置変化を起こす構造があると推定された。

## 2) ロドプシンと他の GPCR との比較研究

我々はロドプシンの細胞質第3ループ (G蛋白質結合部位) にロドプシンと一次構造が似ている (ロドプシンスーパーファミリーに属する) 種々の GPCR (5種類) の第3ループを組み込むと、それらのループがロドプシン中で働くことを見いだした。一方、ロドプシンとは一次構造の相同性のない (異なるファミリーに属する) 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の場合には、第3ループではなく第2ループをロドプシンの第3ループの部分に組み込むと働くことを見いだした。これらの結果からは、GPCR 全体では分子構築の違いは見られるが、G蛋白質を活性化する基本戦略は同じであることが考えられる。そこで、GPCR 全体に共通してみられる G蛋白質活性化機構を検討するために、ロドプシンとは分子構築の異なる GPCR について詳細に検討することを計画した。

モデル GPCR として mGluR (具体的には mGluR6) を選び、培養細胞系での発現および機能解析が可能かどうかを検討した。その結果、発現させた細胞の膜分画を用いて、アゴニスト刺激によって G蛋白質を活性化させることに成功した。一方、発現量が微量であるため、ロドプシンを試料として行っている生化学的な機能解析をこの試料を用いて行うことは難しいことがわかった。そこで、mGluR6 の発現効率を改善する方法を検索し、また、他の mGluR について培養細胞系での発現を試みている。

## 3) ロドプシン類の機能多様性を起因とする視覚機能の多様性解析

多くの脊椎動物の網膜には薄明視を司る桿体と昼間視・色覚を司る錐体が存在する。我々は部位特異的変異によりロドプシン (桿体視物質) と錐体視物質の分子的性質を比較検討し、性質の違いを引き起こすアミノ酸残基の違いを同定した。そこで、これらの違いが桿体・錐体の応答特性に及ぼす効果を検討するために、変異を導入したロドプシンを発現するマウスモデルの作製を試みた。また、桿体視細胞に錐体視物質を発現するマウスモデル、二重変異によりさらに錐体型に近づけたロドプシンを発現するマウスモデル、さらに、感受性波長の異なる3つの錐体視細胞を持つマウスモデルの作製を試みている。

### 岡田グループ

本研究では、ロドプシン活性化過程で生成する光反応中間体 (バソ、ルミ、M I、M II など) の X線結晶構造解析を行う予定である。光反応初期中間体 (バソ、ルミ) については、もとのロドプシンに比べて蛋白質部分の大きな構造変化が予想されないため、X線回折データの分解能が低いと

確実な結論が得られない可能性がある。また、発色団レチナール及びその近傍のアミノ酸の変化を議論する場合に、蛋白質内に存在すると予想される水分子を含めた基底状態の構造モデルをより精密化しておくことも重要である。そこで本年度は以下の研究計画を実施した。

#### 1) 基底状態の構造モデルの精密化

ウシ網膜由来のロドプシン3次元結晶の回折能を再現性よく高めるための条件を最適化し、2000年に2.8Åで決定した基底状態の構造モデルをより高分解能で精密化することを試みた。その結果、分解能を上げるとともに回折能の再現性を高めることに成功し、ロドプシンのヘリックス中に7個の水分子が存在することを発見した。これら7個の水分子のうちの1個はシッフ塩基近傍に位置するが、従来考えられていたシッフ塩基と対イオン(グルタミン酸)との間ではなく、対イオンのカルボキシル基とペプチド結合のカルボニル基との間に位置していることがわかった。したがって、この水分子は、対イオンのカルボキシル基の電荷を減じる役目を果たし、結果としてシッフ塩基がプロトン化され、可視部に吸収極大をもつロドプシンの形成に役立っていると推定された。

#### 2) 結晶中での中間体生成量の最適化

我々はすでに、結晶中でのロドプシンの光反応が溶液中のものと同様であることを明らかにした。しかしながら、X線回折データを多成分系として正確に解析するためには、より詳細な紫外・可視分光測定が必須である。そこで、より幅広い光反応条件において3次元結晶からの分光測定データを蓄積し、溶液中の場合との詳細な比較検討を行っている。

### 3. 研究実施体制

七田(京大)グループ

- ① 七田芳則(京都大学大学院理学研究科、教授)
- ② ロドプシンをモデルとしたGPCRの機能発現・多様性解析を担当

岡田(産総研)グループ

- ① 岡田哲二(産業技術総合研究所生物情報解析研究センター、主任研究員)
- ② X線解析法によるロドプシン類の機能解析を担当

### 4. 主な研究成果の発表(論文発表)

- H. Kandori, Y. Furutani, K. Shimono, Y. Shichida and N. Kamo (2001) Internal water molecules of pharaonis phoborhodopsin studied by low-temperature infrared spectroscopy. *Biochemistry* 40(51):15693-15698.
- A. Terakita, T. Yamashita, N. Nimbari, D. Kojima and Y. Shichida (2002) Functional interaction between bovine rhodopsin and G protein transducin. *J. Biol. Chem.* 277(1):40-46.
- A. Onishi, S. Koike, M. Ida-Hosonuma, H. Imai, Y. Shichida, O. Takenaka, A. Hanazawa, H. Komatsu, A. Mikami, S. Goto, B. Surybroto, A. Farajallah, P. Varavudhi, K. Kitahara and T. Yamamori (2002) Variations in long- and middle-wavelength-sensitive opsin gene loci in crab-eating monkeys. *Vision Res.* 42(3):281-292.