

「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・機能解析を進めることを目的としている。

本年度は、まず、ロドプシン中間体の立体構造解析のための種々の条件を検討した。また、培養細胞系で発現させたロドプシンおよび構成的活性 (Constitutive Activity) を示す変異体を結晶化させることに成功した。さらに、ロドプシンの赤外スペクトル解析において蛋白質内部における水分子の水素結合構造を解析する新たな振動数領域を開拓した。一方、GPCRの研究において第2のモデルGPCRと位置づけている代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR8) を、培養細胞系で発現させることに成功し、また、ウシロドプシンとは違って全トランスレチナールをアゴニストとして結合する新規なロドプシンを発見した。さらに、錐体視物質の性質を示すロドプシン変異体をノックインしたマウスの視細胞応答を測定するとともに、錐体視物質を桿体視細胞の発現するマウス、および、3色性の錐体視細胞を持つマウスの作製にも成功した。

2. 研究実施内容

① X線解析によるロドプシンのG蛋白質活性化機構の原子レベルでの解析

既に得られているウシ網膜由来のロドプシン3次元結晶を用いて、その構造精密化や光反応中間状態に関する研究を行うことは、GPCRの構造・機能に関する知見を得るために現在最も有力なものである。本年度は、ロドプシンの4つの光反応中間体 (バソ、ルミ、MI・MII) のうち、クライオ条件下で捕捉可能な初期中間体 (バソ、ルミ) について、数多くの条件下での顕微分光測定、X線回折測定を行った。一方、その解析精度を向上させるために、3次元結晶の回折分解能向上のための詳細な条件検索を行った。それらの結果、これまでの中間体解析の障害であった問題をほぼ解消することが出来た。1つには、従来の3次元結晶は初期過程で起こる微少な構造変化を正確に検出するには回折分解能が不十分であったが、それを大幅に向上することが出来た。また、結晶の不完全性の1種で

ある内在的な双晶の問題も解析上の支障となっていたが、これについてもほぼゼロに近い結晶を得ることが出来た。以上の結果、暗状態でのロドプシンの構造をこれまでの2.6Åから2.2Åへと精密化するとともに、バソ中間体についても再現性のある構造変化を検出することが可能となった。

培養細胞系で強制発現させたロドプシン及び変異体を含めた関連蛋白質の結晶構造解析システムを確立することは、一般の創薬標的GPCRをターゲットとする構造研究のモデルとしても重要である。本年度の研究により、HEK293Sで発現させた野生型ロドプシンを試料として、X線回折測定に十分なサイズの両錐型結晶及び棒状結晶を得ることに成功した。この棒状結晶は高分解能回折を与える網膜由来のものと同様であることから、更に精密化することにより構造解析が可能であると考えられる。また光に依存しない構成的活性を有する変異体についても、実験条件を整えることにより両錐型結晶を得ることが出来た。これらの結晶化は、サブミリグラムのサンプル量でのスクリーニングにより行っており、今後更に多様なターゲットを効率的に結晶構造解析へと進める体制が確立されたと言える。

②分光法を用いたロドプシンのG蛋白質活性化機構の原子レベルでの解析

本研究では、ロドプシンの光反応中間体（バソ、ルミ、M I、M IIなど）における構造変化過程を、振動分光学的手法により詳細に検討し、X線やNMRといった他の手法では得られない原子レベルの情報を得ることを試みる。本年度は、レチナールの異性化による光エネルギーの捕捉機構を低温赤外分光により解析することを主要なテーマとして、以下の研究を実施した。

ロドプシンの発色団であるレチナールは正の電荷をもち、負電荷をもつ対イオンによって安定化されている。これまでに固体NMRを用いた研究により、イオン対を橋渡しする水分子の構造が重要であることが提唱されてきた。それに対し、昨年度の我々のX線結晶構造解析の結果から、水分子は橋渡し構造をとらないことが明らかになった。そこで、振動分光学的立場から水分子の伸縮振動を捉え、異性化反応産物であるバソ中間体における振動バンドの変化を解析したところ、X線結晶構造解析の結果と同様、イオン対を橋渡しする水分子は存在しないこと、異性化によって強い水素結合環境の水分子は構造変化しないことが強く示唆された。

一方、無脊椎動物のレチナール光異性化酵素であるレチノクロムや古細菌の光情報伝達のレセプターであるフォボロドプシンを試料として同様の実験を行った。その結果、レチノクロムではロドプシンと同様に水分子は存在しないが、フォボロドプシンではバクテリオロドプシンと同様、水分子が強い水素結合を形成してイオン対を橋渡しすることが明らかになった。以上のことから、ロドプシンファミリーと古細菌ロドプシンのファミリーでは、水分子の働きが異なることが明らかになった。

③ロドプシンと他のGPCRとの比較研究

我々はロドプシンのキメラ変異体を利用した研究から、ロドプシンと代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)では細胞質ループ部分でG蛋白質を活性化することは同じであるが、分子構築が異なることを明らかにしてきた。そこで、ロドプシンで行われている研究と同

様のクオリティーでmGluRの研究を行うために、培養細胞系でのmGluRの発現を試みた。その結果、mGluR8がロドプシンと同様にHEK293S系で発現させることができ、また、生化学的な研究に適用できることを見いだした。そこで、mGluRのループ中において、G蛋白質の活性化に最も重要な部位を特定することを試みた。まず、G蛋白質の活性化においてロドプシンのループ3と類似した働きをするループ2について、全ての残基を網羅的にアラニンと置換し、どのアミノ酸残基がG蛋白質の活性化の際に重要であるのかを検討した。その結果、G蛋白質の活性化に重要なアミノ酸残基は、ループ2のN末部位とC末部位の両方に集中していることを発見し、ロドプシンのループ3とは異なることが明らかになった。

我々は昨年度の研究により、ナメクジウオからクローニングしたロドプシンはウシロドプシン (Gt共役型) とは異なり、アポ蛋白質と全トランス型レチナールとが直接結合することを発見した。ロドプシンの活性化状態は発色団として全トランスレチナールを含むので、このロドプシンでは、アゴニスト (全トランス型レチナール) 活性化と光活性化とが同一のメカニズムである可能性が考えられた。そこで、このロドプシンのアゴニスト活性化状態と光活性化状態のG蛋白質活性化能を比較検討した結果、両者の生化学的性質は、全く同一であることがわかった。以上のことから、アゴニスト結合によるGPCRの活性化メカニズムを、このロドプシンの光活性化状態から解析できることがわかった。

そこで、ウシロドプシンの立体構造に基づき、発色団レチナール周辺のアミノ酸残基を網羅的に置換した変異体を作製して解析した結果、ヘリックス6に存在する2つのアミノ酸が全トランス型レチナール (アゴニスト) と相互作用していることを発見した。

④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

GPCRそのものの性質と生理機能との関連を解明するために、ロドプシンをモデルとしてノックインマウスを作製し、視細胞機能に与える影響を解析した。

まず、すでに作製した錐体視物質の性質を示すロドプシン (E122Q) を発現する変異マウスを実験材料として、このマウスの視細胞の応答特性を電気生理学的 (網膜電図 (ERG) 測定および単一細胞応答記録) に検討した。その結果、変異マウスの光感受性は野生型マウスよりも2倍程度低くなった。つまり、錐体と桿体の感受性の違いに視物質の違いが関係する可能性が示唆された。

さらに、これらの視物質の性質変化の影響を直接的に比較検討するため、錐体視物質そのものをノックインしたマウスの作製を試みた。その結果、桿体視細胞にマウス緑感受性錐体視物質 (マウス緑) を十分量発現するラインを得ることができた。

また、視細胞の応答特性だけでなく波長感受性という色覚の分子基礎的な知見を得るために、マウス緑の吸収波長を変化させたノックインマウスラインを作製した。この実験系のポイントは、2種類の視物質を排他的に錐体に発現させることにより、別々の波長感受性を持つ錐体を共存させ、色覚情報処理のモデルを得ることにある。In situ hybridizationにより発現パターンを確認したところ、ヘテロマウスの錐体では予想通り2種類の視物質が排他的に発現していることが確認された。

3. 研究実施体制

七田（京大）グループ

- ①研究分担グループ長：七田芳則（京都大学大学院理学研究科、教授）
- ②研究項目：ロドプシンをモデルとしたGPCRの機能発現・多様性解析

岡田（産総研）グループ

- ①研究分担グループ長：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研究項目：X線解析法によるロドプシン類の機能解析

神取（名工大）グループ

- ①研究分担グループ長：神取秀樹（名古屋工業大学工学部、教授）
- ②研究項目：分光法によるロドプシン類の機能解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

七田グループ

（1）論文（原著論文）発表

- H. Ueyama, S. Kuwayama, H. Imai, S. Tanabe, S. Oda, Y. Nishida, A. Wada, Y. Shichida, and S. Yamade (2002) Novel missense mutations in red/green opsin genes in congenital color-vision deficiencies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294(2), 205-209.
- T. Hirano, I.T. Lim, D. M. Kim, X.-G. Zheng, K. Yoshihara, Y. Oyama, H. Imai, Y. Shichida and M. Ishiguro (2002) Constraints of Opsin Structure on the Ligand Binding Site: Studies with Ring-fused Retinals. *Photochem. Photobiol.* 76(6), 606-615.
- S. Kuwayama, H. Imai, T. Hirano, A. Terakita and Y. Shichida (2002) Conserved Proline Residue at Position 189 in Cone Visual Pigments as a Determinant of Molecular Properties Different from Rhodopsin. *Biochemistry* 41(51), 15245-15252.
- M. Koyanagi, A. Terakita, K. Kubokawa and Y. Shichida (2002) Amphioxus homologs of Go-coupled rhodopsin and peropsin having 11-cis- and all-trans-retinals as their chromophores. *FEBS Lett.* 531(3), 525-528.

（2）特許出願

なし

岡田グループ

（1）論文（原著論文）発表

- T. Okada, Y. Fujiyoshi, M. Silow, J. Navarro, E. M. Landau, Y. Shichida (2002) Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(9):5982-5987

(2) 特許出願

なし

神取グループ

(1) 論文 (原著論文) 発表

- K. Shimono、 Y. Furutani、 H. Kandori、 N. Kamo (2002) A pharaonis phoborhodopsin mutant with the same retinal binding site residues as in bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 41(20):6504-6509.
- M. Iwamoto、 Y. Furutani、 Y. Sudo、 K. Shimono、 H. Kandori、 N. Kamo (2002) Role of Asp193 in Chromophore-Protein Interaction of pharaonis Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II). *Biophys. J.* 83(2):1130-1135
- Y. Furutani, M. Iwamoto, K. Shimono, N. Kamo and H. Kandori (2002) FTIR Spectroscopy of the M Photointermediate in pharaonis Phoborhodopsin. *Biophys. J.* 83(6):3482-3489.
- M. Iwamoto, Y. Furutani, N. Kamo, H. Kandori (2003) Proton Transfer Reactions in the F86D and F86E Mutants of pharaonis Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II). *Biochemistry.* 42(10):2790-2796

(2) 特許出願

なし