

「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、①新たに取得した2.2Åのデータセットを用いたロドプシンの構造精密化を行い、ロドプシンの完全な立体構造モデルを構築した。また、ロドプシンの光反応初期中間体であるバソロドプシンの立体構造モデルを構築した。②赤外分光法を用いてロドプシン内での発色団の位置移動を誘起する蛋白質部分の構造変化を解析した。③全トランスレチナールをアゴニストとして結合するロドプシンとウシロドプシンについて、変異体解析により機能発現様式を比較検討した。また、低分子リガンドを結合するロドプシンを作製する試みを開始した。さらに、mGluRの構造・機能連関を変異体解析により行い、mGluRにも構成的活性変異体が存在することを発見した。④ターゲットベクターを変更して桿体視細胞に錐体視物質をノックインしたマウスの作製を試み、比較的多くの錐体視物質を発現するマウスの作製に成功した。また、3色性の錐体視細胞を持つマウスの応答特性の記録も試みた。

2. 研究実施内容

①X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

本年度は、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、その基底状態の構造精密化と光反応初期中間状態のモデル構築を行った。これまでのロドプシンの立体構造モデルではポリペプチド鎖のうち細胞質側に一部未同定の部分があり、そのためG蛋白質やアレチンなどとの相互作用部位に関する情報が欠けていた。そこで、新たに取得した2.2Åのデータセットを用いた構造精密化を行い、モデルを完全なものにした。

ロドプシン光反応の第一段階は、レチナールのシストランス異性化反応である。この光による強制的なリガンド構造の変化を一般的な創薬標的GPCRの場合に当てはめると、インバースアゴニストからアゴニストへの瞬時の変換と考えることができる。したがって、

その詳細な構造変化過程を明らかにすることは、リガンド-蛋白質相互作用変化と活性化との関係を直接的に明らかにする上で非常に重要である。我々は液体窒素温度近傍に維持したロドプシン3次元結晶について、顕微分光測定およびX線回折測定を繰り返し行うことにより光反応中間体（バソロドプシン）をトラップする条件を精密化し、その構造モデルを2.6Åで構築することができた。

一方、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ための研究を継続して行った。その結果、昨年度に始めたロドプシン野生型・変異体のものに加えて、ロドプシンと限られたホモロジーの7回膜貫通型受容体についても詳細な結晶化条件の検索を行った。

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

ロドプシンが光を吸収すると、まず発色団のシス-トランス異性化反応が起こって光のエネルギーが特異的に蛋白質内部へと捕捉される。この高エネルギー構造が緩和するとルミ、メタIといった中間体が生成することが知られているが、最近その過程で発色団レチナール分子の位置が移動することが提唱されている。そこで発色団移動のメカニズムを明らかにするため、発色団と蛋白質との特異的な相互作用を低温赤外分光により解析した。特に我々が開拓した新しい振動数領域におけるスペクトル解析を行った結果、発色団の水素結合環境をモニターすると考えられる振動バンドの測定に成功した。さらに、蛋白質骨格アミドAの測定から、重水で置換されるヘリックス構造がメタIの段階で、さらにシート構造がメタIIの段階で構造変化することが明らかになった。ルミでの構造変化は疎水的な蛋白質内部に限定されるものと考えられる。

一方、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は、ロドプシンとは異なって膜内で伝達蛋白質と相互作用することがわかっている。フォボロドプシンと伝達蛋白質との複合体の赤外分光測定に成功し、両者の相互作用にフォボロドプシン内のThr204の水素結合構造が重要な役割をしてい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

我々はこれまでに、全トランス型レチナールをアゴニストとして直接結合することのできる特殊なロドプシンを見いだした。そこで、変異体解析により、このロドプシンとウシロドプシンの機能発現機構を比較検討した。その結果、もとの不活性状態と活性化状態の両方のスペクトル的性質を変化させるアミノ酸残基や、膜貫通領域に存在するがG蛋白質活性化に関与するアミノ酸残基の同定に成功した。一方、このロドプシンとウシロドプシンにおいて、活性状態になる過程での変化に特別な違いはみられなかった。

レチナール以外の低分子リガンドを結合するロドプシンを作製する試みを開始した。具体的には、ウシロドプシンのレチナール結合部位を改変して、ムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)のリガンドを結合するロドプシンが作製できるかどうかを検討した。まず、ウシロドプシンの立体構造に基づき、約500種類の変異体解析を行ったが、mAChRのリガンドと結合する変異体は得られず、また、変異体作製・解析には、予想外に手間と時間を要することが分かった。以上のことから、ロドプシンのGPCRへの転換を試み

る際、モデリングに重点を置いてターゲットする残基を特定する方法を試みることも必要であることがわかった。

ロドプシンとは一次構造の類似性のないGPCRである代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)を第2のモデルGPCRとして解析を進めた。これまでに、ロドプシンに対してmGluRの細胞質ループ部分を組み込んだ変異体を用いて、両者の類似点・相違点の検討を進め、ロドプシンの細胞質ループ3とmGluRの細胞質ループ2が機能的に等価であることを見いだしていた。そこで、昨年度に確立したmGluRの発現系を用いて、G蛋白質活性化に重要な細胞質第2ループを網羅的に変異させた変異体を作製し、どの残基が重要か調べた。その結果、活性化に関与する残基がN末端側(ヘリックス3側)に集中していること、また、構成的活性化を示すアミノ酸残基の位置のあることがわかった。

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、錐体視物質と似た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、CCD高時間分解分光光度計を用いて視細胞内のE122Q変異体の挙動を実時間で計測し、野性型のロドプシンと比較した。また、この性質の差がどのようにマウスの視細胞の応答特性と関係するかを電気生理学的に比較検討した。一方、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、発現ベクターの改良により十分な量の錐体視物質が発現する視細胞をもつノックインマウスの作製に成功した。さらに、昨年度作製した視細胞の波長感受性(色覚)を変化させたノックインマウスを電気生理学的に解析した。その結果、内因性・変異型の二種類の視細胞からの応答が網膜神経節細胞レベルで統合されていることがわかった。

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）

(1) 論文発表

七田グループ

- Nakashima Y, Kusakabe T, Kusakabe R, Terakita A, Shichida Y, and Tsuda M (2003) Origin of the vertebrate visual cycle: genes encoding retinal photoisomerase and two putative visual cycle proteins are expressed in whole brain of a primitive chordate. *J. Comp Neurol.* 460(2), 180-190.
- Y. Furutani Y. Shichida, and H. Kandori (2003) Structural Changes of Water Molecules during the Photoactivation Processes in Bovine Rhodopsin. *Biochemistry* 42(32), 9619-9625.
- Y. Furutani, H. Kandori, and Y. Shichida (2003) Structural Changes in Lumirhodopsin and Metarhodopsin I Studied by Their Photoreactions at 77 K. *Biochemistry* 42(28), 8494-8500.
- T. Hirano, H. Imai and Y. Shichida (2003) Effect of Anion Binding on the Thermal Reverse Reaction of Bathorhodopsin: Anion Stabilizes Two Forms of Iodopsin. *Biochemistry* 42(43), 12700-12707.
- T. Morizumi, H. Imai and Y. Shichida (2003) Two-Step Interaction Mechanism of Rhodopsin Intermediates with C-Terminal Region of Transducin Alpha-Subunit. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 259-267.
- Terakita A, Koyanagi M, Tsukamoto H, Yamashita T, Miyata T, Shichida Y. (2004) Counterion displacement in the molecular evolution of the rhodopsin family. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3, 284-289.

岡田グループ

- T. Okada, and H. Nakamichi (2004) X-ray Crystallography of Rhodopsin. *Phase Transitions* 77, 21-29.
- Y. Kyogoku, Y. Fujiyoshi, I. Shimada, H. Nakamura, T. Tsukihara, H. Akutsu, T. Odahara, T. Okada, and Nobuo Nomura (2003) Structural Genomics of Membrane Proteins. *Accounts. Chem. Res.* 36, 199-206.

神取グループ

- 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, 2790-2796.
- Y. Furutani, Y. Sudo, N. Kamo, H. Kandori (2003) FTIR Spectroscopy of the Complex between *pharaonis* Phoborhodopsin and its Transducer Protein. *Biochemistry* 42, 4837-4842.
- K. Shimono, Y. Furutani, N. Kamo, H. Kandori (2003) Vibrational Models of the Protonated Schiff Base in *pharaonis* Phoborhodopsin. *Biochemistry* 42,

7801-7806.

- Y. Furutani, H. Kandori, Y. Shichida (2003) Structural Changes in Lumirhodopsin and Metarhodopsin I Studied by Their Photoreactions at 77 K. *Biochemistry* 42, 8494-8500.
- Y. Furutani, Y. Shichida, H. Kandori (2003) Structural Changes of Water Molecules during the Photoactivation Process in Bovine Rhodopsin. *Biochemistry* 42, 9619-9625.
- Y. Sudo, Y. Furutani, K. Shimono, N. Kamo, H. Kandori (2003) Hydrogen Bonding Alteration of Thr-204 in the Complex between *pharaonis* Phoborhodopsin and its Transducer Protein. *Biochemistry* 42, 14166-14172.

(2) 特許出願

なし