

「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昨年度に決定したロドプシンおよびバソロドプシンの立体構造データを基にQM/MM法による分子動力的計算を行なった。また、バソロドプシンの後に生成する中間体であるルミロドプシンの構造モデルの作成を試みた。②赤外分光法を用いてG蛋白質の活性化をもたらすロドプシン後期中間体の構造解析を行った。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について、結合サイトの候補アミノ酸を網羅的に置換して、結合様式の検討を行った。また、代謝型グルタミン酸受容体の細胞質ループの網羅的な変異体解析により、新たな構成的活性変異のサイトを同定した。④錐体視物質を桿体視細胞にノックインしたマウスモデルを作製し、視細胞機能に与える影響を解析した。また、変異により吸収極大波長を変化させた錐体視物質を錐体視細胞にノックインしたマウスモデルについても、網膜における波長応答を解析した。

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

昨年度に決定した光受容体GPCRロドプシンの高分解能基底状態及び液体窒素温度下 (約100K) で捕捉された光反応初期中間体 (バソロドプシン) について、QM/MM法による分子動力学計算を行い、視覚初期過程を担う分子メカニズムとして非常に重要なレチナール発色団構造及びその環境について理論的な検証・結晶構造との比較解析を行っている。

基底状態については、2.2 Å分解能結晶構造で明らかになった発色団の局所的な振れが理論的にも証明され、光異性化反応に重要な意味を持つことが示された。また、水分子を介した水素結合ネットワーク及びその機能的役割に関して、貴重な知見が得られた。更に光活性化に伴う発色団・蛋白質構造変化について明らかにするために、150K以上の温度における光照射前後の結晶構造変化解析を行い、バソロドプシンから生成する中間体ルミ

ロドプシンの構造モデルを作成することが出来た。これらの結果から、ロドプシンでの光エネルギー蓄積・変換メカニズムに関する貴重な情報が得られ、更に後続の構造変化予測へ向けて大きく前進することが出来た。以上の研究とともに、培養細胞系を用いた大量発現から結晶構造解析までのプロセス確立も進め、ロドプシン変異体の高分解能データ取得が見込まれる。

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、メタⅠ、メタ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、G蛋白質の活性化をもたらす蛋白質の構造変化、特に α ヘリックスや β シート構造の変化をもたらす後期中間体の構造解析を主要なテーマとして、以下の研究を実施した。

ロドプシンの後期中間体の1つであるメタⅠにおいて、これまでの研究から対イオンがスイッチするという新しいモデルが提案されている。活性中間体であるメタⅡが生成するとき、発色団レチナールシッフ塩基から解離したプロトンは、対イオンであるGlu113に移動するとこれまで考えられてきた。しかしながら、新しいモデルによれば、メタⅠの段階でGlu181からGlu113にプロトン移動が起こってGlu181が対イオンになる。従って、メタⅡの生成に伴うプロトン受容体はGlu181となる。このモデルに従えば、ロドプシンの活性化に伴ってダイナミックな水素結合ネットワークの改変が起こっていることになる。我々はこのモデルを実験的に検討するため、グルタミン酸をアスパラギン酸に改変した変異体を用いた赤外分光計測を試みている。現在、試料調製に続いて最適な実験条件を確立することができた段階である。

古細菌型ロドプシンは同様に7回膜貫通型の蛋白質であり、全トランス型のレチナールを用いて光を吸収する。これまで古細菌型ロドプシンはその名の通り、古細菌にしか見つかっていなかったが、最近、真核生物であるアカパンカビにも発見された。アカパンカビロドプシンは光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシンとよく似たアミノ酸配列をもちながら、プロトンポンプ活性がないことが知られている。我々は赤外分光法を用いてアカパンカビロドプシンの光活性過程での構造変化を解析したところ、バクテリオロドプシンに見出された水素結合の強い水分子が存在しないことがわかった。このような水素結合ネットワークの違いが機能の違いに関係している可能性が示唆された。

③ロドプシンと他のGPCRとの比較研究

前年度の研究において、新奇のリガンド結合型ロドプシンにおいては、ヘリックスⅥに位置するTrp265とAla269がアゴニストである全トランス型レチナールの結合サイトの候補であることを見いだした。そこで、今年度はこの結果に基づき、これら2つの残基に網羅的なアミノ酸置換を行い、G蛋白質活性化能や全トランス型レチナール結合能について検討した。その結果、Trp265に変異を導入した場合、G蛋白質活性化能は低下することが示唆された。ところが、Trp265の位置に導入するアミノ酸の体積が小さいほど、全トランス型レチナールへの相対的な親和性が増加する傾向を示した。これらの結果は、Trp265は全

トランス型レチナールがアゴニストとして作用するのに必須な残基であることを示している。一方、Ala269に体積の大きなアミノ酸残基を導入するとG蛋白質活性化能が大きく低下し、また全トランス型レチナールの結合が阻害されることが示唆された。すなわち、Ala269はアゴニスト結合部位の形成に重要であることが示唆された。これらの結果から、リガンド結合型ロドプシンにおいて、Trp265・Ala269は近傍に存在するアミノ酸残基ではあるが、その機能が異なると考えられた。

我々は、ロドプシンとは一次構造の類似性のない代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の活性化メカニズムを明らかにし、ロドプシンでの知見と比較することを目標としている。これまでに、mGluRの細胞質第2ループとヘリックスIVとの境界領域に構成的活性化変異 (CAM) 部位を見いだしmGluRの活性化にこの領域の構造変化が関わることを示した。本年度はさらに他のヘリックス・細胞質領域の構造変化について解析を進めた。第2ループ以外の細胞質領域に網羅的に変異を施したところ、第1ループとヘリックスIIとの境界領域に新たなCAM部位を同定した。この結果は、ヘリックスIIIとVIの細胞質側にCAM部位が多く見られるロドプシンを含むGPCRグループとは対照的であり、mGluRの活性化においてヘリックスIVだけでなくヘリックスIIの構造変化が重要であることを示唆している。

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

我々は、光受容体のG蛋白質活性化能や中間体の安定性が視細胞の応答特性に与える影響を解析するために、桿体の光受容体ロドプシンと分子的性質の異なる錐体の光受容体 (マウス緑) を桿体視細胞にノックインしたマウスモデルを作製した。そして、このマウスモデルの桿体視細胞の応答感度を野生型のそれと比較した。網膜電位図 (ERG) や単一細胞記録による計測の結果、ノックインマウスの応答感度は野生型の約30分の1であることがわかった。ノックインマウスの桿体に発現しているマウス緑の絶対量を生化学的・分光学的に検討したところ、その量は野生型の視細胞に含まれるロドプシンの約10分の1であることがわかった。以上のことから、視細胞中の発現量の違い以外に約3倍の感度の違いがマウス緑をノックインしたことにより生じることがわかった。現在、これらの違いを分子レベルで検討している。

一方、我々はマウス緑の吸収波長を変化させた変異体を錐体視細胞に発現するマウスモデルを作製した。このマウスは波長感受性の異なる3つの錐体視細胞を網膜に持つことになる。そこで、新たに導入した変異体が錐体視細胞の中で機能するかを、網膜電図 (ERG) および神経節細胞のパッチクランプ法で検討した。その結果、変異体の吸収波長に由来する波長感度を示す応答を測定することができた。また、X染色体不活化による錐体視細胞のクラスター形成に対応して、神経節細胞からの応答の波長依存性が大きな分散を示すことも明らかになった。現在、導入変異体に由来するマウスモデルの行動学的な解析を続けている。

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

七田グループ

(1) 論文（原著論文）発表

- Koyanagi M, Kawano E, Kinugawa Y, Oishi T, Shichida Y, Tamotsu S, Terakita A. (2004) Bistable UV pigment in the lamprey pineal. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101(17), 6687-6691.
- Ueyama H, Kuwayama S, Imai H, Oda S, Nishida Y, Tanabe S, Shichida Y, Yamade S. (2004) Analysis of L-cone/M-cone visual pigment gene arrays in Japanese males with protan color-vision deficiency. Vision Res. 44(19), 2241-2252.
- T. Yamashita, T. Kai, A. Terakita and Y. Shichida (2004) A novel constitutively active mutation in the second cytoplasmic loop of metabotropic glutamate receptor. J. Neurochem. 91, 484-492.
- S. Kuwayama, H. Imai, T. Morizumi and Y. Shichida (2005) Amino acid residues responsible for the meta-III decay rates in rod and cone visual pigments. Biochemistry 44(6), 2208-2215.
- K. Terao, A. Mikami, A. Saito, S. Itoh, H. Ogawa, O. Takenaka, T. Sakai, A. Onishi, M. Teramoto, T. Udono, Y. Emi, H. Kobayashi, H. Imai, Y. Shichida and S. Koike (2005) Identification of a protanomalous chimpanzee by molecular genetic and electroretinogram analyses. Vision Res. 45(10), 1225-1235.

岡田グループ

(1) 論文（原著論文）発表

- Okada, T., X-ray crystallographic studies for ligand-protein interaction changes in rhodopsin. Biochemical Society Transactions, 2004. 32(5): p.

738-741.

- Okada, T., Sugihara, M., Bondar, A.-N., Elstner, M., Entel, P., and Buss, V., The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *Journal of Molecular Biology*, 2004. 342(2): p. 571-583.

神取グループ

(1) 論文(原著論文)発表

- Y. Furutani, M. Iwamoto, K. Shimono, A. Wada, M. Ito, N. Kamo and H. Kandori (2004) FTIR spectroscopy of the O photointermediate in pharaonis phoborhodopsin. *Biochemistry*. 43, 5204-5212.
- Y. Furutani, A. G. Bezerra Jr., S. Waschuk, M. Sumii, L. S. Brown and H. Kandori (2004) FTIR spectroscopy of the K photointermediate of neurospora rhodopsin: Structural changes of the retinal, protein, and water molecules after photoisomerization. *Biochemistry*. 43, 9636-9646.