

「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ロドプシンの光反応中間体の構造解析を行い、QM/MM 法による分子動力学計算による検証・比較解析を行った。また、培養細胞系で発現したロドプシンや他の GPCR の精製・結晶化を進めた。②赤外分光法を用いてロドプシンおよびロドプシン類似蛋白質の後期中間体の構造解析を進め、それらと相互作用する蛋白質存在下での構造変化の違いを解析した。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脊椎動物のロドプシンとの G 蛋白質活性化に至る構造変化過程を比較解析した。また、代謝型グルタミン酸受容体について、G 蛋白質活性化に至るヘリックスの相対的な位置変化を解析し、ロドプシンの場合と比較検討した。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の電気生理学的解析を行った。また、「視覚」以外の機能に関与するロドプシン類について、それらの多様化についての分子レベルの研究を行った。

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

光受容体 GPCR ロドプシンの液体窒素温度下 (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た。その結果、可視吸収・振動モード・円偏光二色性などの様々な分光特性等のメカニズムが明らかになるとともに、活性化に必要なエネルギー蓄積に関しても貴重な知見が得られた。また、様々な制御因子の結合は多くの GPCR について活性化に影響を及ぼすと考えられていることから、ロドプシンについてもそのような候補分子との複合体構造解析に関する研究

を開始し、結晶化・X線回折データ収集を行った。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た。ロドプシンに限らず創薬標的GPCRの場合にも、この方法により高分解能データを取得する上で特に問題となると考えられるのは、良質の精製試料を作成することである。そこで、安定性・均一性・効率性などの観点から重要と考えられる改善の詳細な検討を行い、非常に有効かつ簡便な試料作成法及び結晶化が可能となった。

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

主に赤外分光法を用いた研究により以下の成果が得られた。

(1) ロドプシンが11シス型から全トランス型へのレチナールの光異性化によって活性化を誘起されるのに対し、11シス型レチナールを光でつくる異性化酵素、レチノクロムの活性化過程を赤外分光により研究した。その結果、ロドプシンとは異なる水素結合ネットワークを経由したシッフ塩基のプロトン脱離メカニズムを明らかにした。

(2) 古細菌型ロドプシンであるフォボロドプシンは視物質ロドプシンと同様、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し、伝達蛋白質を活性化することによって負の走光性を発現する。しかしながら、伝達蛋白質は水溶性のG蛋白質とは異なり、2回膜貫通型の蛋白質である。我々は赤外分光法を用いて、伝達蛋白質の側に起こる構造変化を初めて検出することに成功した。

(3) 我々のグループが開拓したX-H (X-D) 伸縮振動領域の赤外スペクトルの解析から、興味深い事実を発見した。古細菌ロドプシンは伝達蛋白質を介して光を情報へ変換するとともに、伝達蛋白質が存在しないと光駆動プロトンポンプとして能動輸送することが知られている。系統的な赤外分光解析により、プロトンポンプ活性のあるロドプシンにのみきわめて強い水素結合を形成した水分子が見出された。

③ロドプシンと他のGPCRとの比較研究

脊椎動物のロドプシンは光受容により分子内に結合しているアンタゴニストをアゴニストに変換して活性状態になるGPCRであり、アゴニスト活性を示す全トランス型のレチナールとは直接結合しない。一方、我々は昨年度に全トランス型のレチナールと直接結合するロドプシン類を無脊椎動物から発見し、脊椎動物のロドプシンとの構造的な違いについて検討した。具体的にはアゴニスト結合能をもつロドプシンのレチナール近傍に存在するアミノ酸残基の網羅的な変異体解析により、ヘリックスVIに存在するAla269周辺の構造が活性状態の形成に重要であることを見いだした。さらにAla269の変異によってG蛋白質活性化能が低下するが、この低下はヘリックスVに位置するいくつかのアミノ酸残基に変異を導入することで回復することを見いだした。また、このロドプシンと脊椎動物のロドプシンとは変異による活性状態の吸収スペクトルの性質やG蛋白質活性化能への影響の仕方が異なることがわかった。

我々はこれまでに代謝型グルタミン酸受容体タイプ8 (mGluR8) を用いてその細胞質領

域の変異体を網羅的に解析した。その結果、刺激非依存的に G 蛋白質活性化能が上昇する変異（構成的活性化変異、CAM）をヘリックス II と IV に同定した。今回、ヘリックス II と IV の CAM 部位近傍にシステインを導入し、ジスルフィド結合を形成させると活性化能の有意な低下が起こることを見いだした。つまり、mGluR8 が G 蛋白質を活性化する状態になるには、ヘリックス II と IV の細胞質側の相対的な距離が広がることが明らかになった。ロドプシンではヘリックス III と VI との相対的位置が広がることにより G 蛋白質を活性化する状態になる。以上のことから、mGluR もロドプシンと同様にヘリックスの動きを利用して G 蛋白質との相互作用部位を露出するがその分子構築が異なることが明らかになった。

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

薄明視と昼間視を司る桿体視細胞と錐体視細胞では、光感度や光応答の速度が異なることが知られている。本研究では、光受容に關与する視物質の多様化により両視細胞の応答特性がどのように変化するかを検討するために、桿体視細胞に発現する視物質ロドプシンをマウス緑錐体視物質に置換したノックインマウスを作製し電気生理学的に表現型解析を行った。吸引電極法を用い単一視細胞の光応答を詳細に解析した結果、視物質の光反応量当たりの光感度は野生型に対しマウス緑ホモマウスでは1/4倍に低下することが分かった。ウエスタンブロット法により視物質以外の光情報伝達蛋白質の発現量の定量を行い、それらが光感度に与える影響を考慮した結果、マウス緑ホモマウスにおける光感度の低下は置換した視物質の性質の違いに由来することが示唆された。

ロドプシン類にはいわゆる「視覚」に關与するもの以外に他の光受容機能（概日リズムや年周リズムなど）の受容体として働くものがある。我々は概日リズムのリセットに關与する脊椎動物の網膜の神経節細胞に、無脊椎動物のロドプシンと近縁の光受容体が発現しており、脊椎動物の概日リズムを制御する細胞が無脊椎動物の視覚に關与する細胞と進化的には同じであることを発見した。また、は虫類・両生類の頭頂眼にある光受容細胞から新奇のロドプシン類（パリエトプシンと命名）を発見した。

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、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（産総研、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（名工大、教授）

②研究項目：光法によるロドプシン類の機能解析

中谷（筑波大）グループ

①研究分担グループ長：中谷 敬（筑波大学、助教授）

②研究項目：細胞レベルでの GPCR 機能発現機構の解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

七田グループ

- T. Sugawara, Y. Terai, H. Imai, G. F. Turner, S. Koblmuller, C. Sturmbauer, Y. Shichida and N. Okada: Parallelism of amino acid changes at the RH1 affecting spectral sensitivity among deep-water cichlids from Lakes Tanganyika and Malawi. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* (2005) 102, 5448-53.
- H. Tsukamoto, A. Terakita and Y. Shichida: A rhodopsin exhibiting binding ability to agonist all-trans-retinal. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* (2005) 102, 6303-6308.
- H. Imai, S. Kuwayama, A. Onishi, T. Morizumi, O. Chisaka and Y. Shichida: Molecular properties of rod and cone visual pigments from purified chicken cone pigments to mouse rhodopsin in situ. *Photochemical and Photobiological Sciences* (2005) 4, 667-674.
- M. Koyanagi, K. Kubokawa, H. Tsukamoto, Y. Shichida and A. Terakita : Cephalochordate melanopsin: Evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Current Biology* (2005) 15, 1065-1069.
- T. Morizumi, H. Imai and Y. Shichida: Direct Observation of the Complex Formation of GDP-bound Transducin with Protonated Intermediate of Rhodopsin in Rod Outer Segments Membranes. *Biochemistry* (2005) 44, 9936-9943.
- H. Kassai, A. Aiba, K. Nakao, K. Nakamura, M. Katsuki, W. H. Xiong, K. W. Yau, H. Imai, Y. Shichida, Y. Satomi, T. Takao, T. Okano and Y. Fukada: Farnesylation of Retinal Transducin Underlies Its Translocation during Light Adaptation. *Neuron* (2005) 47, 529-539.
- T. Kodama, H. Imai, T. Doi, O. Chisaka, Y. Shichida and Y. Fujiyoshi: Expression and localization of an exogenous G protein-coupled receptor fused with the rhodopsin C-terminal sequence in the retinal rod cells of knockin mice. *Experimental Eye Research* (2005) 80, 859-869.
- A. Onishi, J. Hasegawa, H. Imai, O. Chisaka, Y. Ueda, Y. Honda, M. Tachibana and Y. Shichida: Generation of knock-in mice carrying third cones with spectral sensitivity

- different from S and L cones. *Zoological Science* (2005) 22, 1145–1156.
- Y. Ueda, N. Tammitu, H. Imai, Y. Honda and Y. Shichida: Recovery of Rod-mediated a-wave during Light-Adaptation in mGluR6-deficient Mice. *Vision Research* (2005) 46, 1655–1664.
 - T. Hirano, N. Fujioka, H. Imai, H. Kandori, A. Wada, M. Ito and Y. Shichida: Assignment of the vibrational modes of the chromophores of iodopsin and bathiodopsin: low-temperature Fourier transform infrared spectroscopy of ¹³C- and ²H-labeled iodopsins. *Biochemistry* (2006) 45, 1285–1294.
 - C. Y. Su, D. G. Luo, A. Terakita, Y. Shichida, H. W. Liao, M. A. Kazmi, T. P. Sakmar and K. W. Yau: Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science* (2006) 311, 1617–1621.

岡田グループ

- T. Okada: Methods and Results in X-Ray Crystallography of Bovine Rhodopsin. *CRC PRESS* (2005)

神取グループ

- Y. Furutani, A. Kawanabe, K.-H. Jung and H. Kandori: FTIR Spectroscopy of the All-trans Form of Anabaena Sensory Rhodopsin at 77K: Hydrogen Bond of a Water between the Schiff Base and Asp75. *Biochemistry* (2005) 44, 7988–7997.
- M. Sumii, Y. Furutani, S. A. Waschuk, L. S. Brown and H. Kandori: Strongly Hydrogen-Bonded Water Molecule Present near the Retinal Chromophore of Leptosphaeria Rhodopsin, the Bacteriorhodopsin-like Proton Pump from a Eukaryote. *Biochemistry* (2005) 44, 15159–15166.
- Y. Furutani, A. Terakita, Y. Shichida and H. Kandori: FTIR Studies of the Photoactivation Processes in Squid Retinochrome. *Biochemistry* (2005) 44, 12287–12296.
- Y. Sudo, Y. Furutani, A. Wada, M. Ito, N. Kamo and H. Kandori: Steric Constraint in the Primary Photoproduct of an Archaeal Rhodopsin from Regiospecific Perturbation of C-D Stretching Vibration of the Retinyl Chromophore. *Journal of the American Chemical Society* (2005) 127, 16036–16037.
- Y. Furutani, M. Shibata and H. Kandori: Strongly Hydrogen-Bonded Water Molecules in the Schiff Base Region of Rhodopsins. *Photochemical and Photobiological Sciences* (2005) 4, 661–666.
- T. Ota, Y. Furutani, A. Terakita, Y. Shichida and H. Kandori: Structural Changes in the Schiff Base Region of Squid Rhodopsin upon Photoisomerization Studied by Low-Temperature FTIR Spectroscopy. *Biochemistry* (2006) 45, 2845–2851.