

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02394

研究課題名(和文) X線自由電子レーザーによるGタンパク質共役型受容体の活性化機構の解明

研究課題名(英文) Activation mechanism of G protein-coupled receptors by X-ray free electron lasers

研究代表者

南後 恵理子(Nango, Eriko)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：90376947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、Gタンパク質共役型受容体の一つである視覚ロドプシンのX線自由電子レーザーによる動的構造解析を目的として実施した。ロドプシンは非常に微弱な光で結晶が崩壊するため従来の方法では測定が難しく、また高い空間分解能を示す良質な結晶を得ることが困難である問題点があった。そこで、本課題では新たな実験装置開発を行い、光散乱の影響を起こしにくい不連続方式による試料輸送装置を開発した。実際に光感受性のモデル試料でポンププローブ型時分割実験を行ったところ、時間経過に伴う構造変化を確認することができ装置性能を実証するに至った。また、視覚ロドプシンの発現系も各種検討し、数種の条件で結晶が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、活性化状態に至る途中構造など動的構造を原子分解能で得ることは困難であった。新たな放射光源であるX線自由電子レーザー(XFEL)を用いると動的構造を可視化することが可能であるが、視覚ロドプシンのような取り扱いが難しい試料の測定に適した装置や技術は達成されていなかった。本課題ではXFEL実験用装置開発に取り組み、新たな測定方法を確立した。こうした技術は他試料の動的構造決定においても貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted this research to analyze dynamic structures of visual rhodopsin, which is one of G protein-coupled receptors, using X-ray free electron lasers (XFEL). So far, time-resolved crystallography using XFEL has enabled to visualize dynamic structures of several light-sensitive proteins. However, it has been challenging to measure visual rhodopsin crystals because the crystal is damaged by very weak light. It has been also challenging to obtain rhodopsin crystals diffracting with high spatial resolution. We developed a new experimental device for time-resolved serial femtosecond crystallography to transport samples discontinuously for less light contamination. We performed pump-probe type time-resolved experiments with photo-sensitive samples using the device and observed structural changes with time. In addition, various expression systems of visual rhodopsin have been examined, and crystals were obtained under several conditions.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、真核生物の細胞膜に存在する受容体の一つで、7回膜貫通構造を持つ。GPCRは、細胞外からの様々なシグナルを受容すると構造変化を起こし、Gタンパク質と呼ばれる三量体タンパクを介して、シグナルを細胞内へと伝える。これらの刺激や情報の受容により引き起こされる生理現象は、心拍数の変動、平滑筋の弛緩や収縮、神経機能の調節など、様々な病態と深く関連している。そのため、GPCRは重要な創薬ターゲットとなっており、現在使用されている薬剤のおよそ4割がGPCRを標的としている。

より効果的な薬剤設計のために、GPCRの三次元構造に非常に興味を持たれてきた。2000年に視覚を司る受容体であるウシ由来ロドプシンの結晶構造が初めて明らかにされて以来、2 アドレナリン受容体など様々なGPCRの三次元構造が、X線結晶構造解析などにより明らかにされつつある。例えば、2 アドレナリン受容体のアゴニストが結合した活性化状態の構造と不活性化状態の構造とを比較すると、ヘリックスの構造変化が見られており、アゴニストの結合による結合ポケットの周辺の小さな変化が、膜貫通ヘリックスの移動や回転を誘起し、GPCRの細胞質側に大きな変化を生じさせていると思われる。他のGPCRでも類似した構造変化が見られるため、GPCRの不活性化状態から活性化状態に至るには、アゴニスト結合部位周辺のアミノ酸残基を起点としたダイナミックなコンフォメーション変化が起こるとされている。しかし、その“証拠”となっているX線結晶解析によって解かれた構造は、基本的に“止まっている”構造である。つまり、結晶中のGPCRが活性化状態になる“前”と“後”の「安定な状態」しか観測できないために、活性化状態に移る時にどんな構造を経ているのかは不明である。GPCRをターゲットとした創薬においては、シグナル伝達の強弱を望みのままにコントロールできる部分アゴニスト、部分アンタゴニストの開発が期待されている。こうした薬剤設計の重要な知見となるのは「活性化状態に至る途中の構造」にあることから、X線結晶解析をはじめとした従来の測定技術ではこうした構造の解明は極めて困難であった。

2. 研究の目的

最近、革新的な光源であるX線自由電子レーザー(XFEL)施設の供用が開始され、XFELの利用が可能となった。XFELは、その強力で非常に短い(数十フェムト秒程度)X線パルスによって、照射後に試料は崩壊する一方で、放射線損傷が顕在化するより短い時間で回折現象が完結する。そのため、化学変化など物質の極めて速い動きを原子分解能で解析できると期待されている。研究代表者の南後は、2013年より日本のXFEL施設SACLAにおいて、XFELを用いたタンパク質の構造解析に取り組み、シリアルフェムト秒結晶構造解析(SFX)をベースとした測定技術や装置の開発を行ってきた。SFXは、タンパク質微結晶を緩衝液などと共にXFEL照射領域に連続的に輸送して、多数の結晶からの回折像を収集して構造を得る方法である。「タンパク質が素早く反応・構造変化を起こす様子を捉える」ための時分割SFX実験装置・技術開発にも取り組み、2016年には、光で励起しプロトン輸送を行う膜タンパク質であるバクテリオロドプシンを用いて、ナノ秒からミリ秒にかけての13点のタイムポイントで試料が光照射によって構造変化し、プロトンを輸送する様子を観測することに成功した。この実験は、ナノ秒からミリ秒の長いタイムスケールにおけるタンパク質や水分子が移動する様子を原子分解能で詳細に捉えるという「分子動画」として、世界に先駆けた成果となった。

そこで、本課題では、これらの技術をベースとして、GPCRの活性化状態に至る過程の解明を目的とした時分割SFX実験によるGPCRの動的構造解析を行う。ターゲットのGPCRとしては、バクテリオロドプシンと同様に発色団としてレチナールを含み、光によって活性化される視覚ロドプシンを用いる。

3. 研究の方法

ロドプシンは、クラスAのGPCRであり、眼の網膜にある桿体に含まれる光受容タンパク質として暗所視を司る。この受容体は、最初に結晶構造が解明されたGPCRとして知られ、多くの研究者によってその構造変化に興味を持たれてきた。ロドプシンは、11-シス型レチナールを含む不活性化状態から光を吸収すると、全トランス型レチナールへと異性化することにより活性化状態になる。そして、フォト(photo)、バス(batho)、ルミ(lumi)、メタ(meta)と呼ばれる準安定な中間体を生成することが知られている。最も良く研究されているロドプシンは、ウシ由来のロドプシンであり、X線結晶構造解析によって、不活性化状態の構造と活性化構造が報告されている。その活性化構造としては、レチナールを含まないオプシン構造とメタロドプシンの構造のみが報告されている。脊椎動物のロドプシンと異なり、光活性メタ中間体が安定に存在するイカ由来ロドプシンではバス、ルミ中間体の報告例があるものの、ロドプシンは微弱な光で結晶が損傷することもあり、報告されている構造の空間分解能の多くは2.7-3.0と低く、どのような準安定構造を経て光反応が起こっているのか不明な点も多い。また、従

来の X 線結晶構造解析では、放射線損傷を回避できず反応に影響を及ぼす可能性があること、極低温による中間体捕捉は、時に構造のバリエーションが見られるため、“リアルタイム”で生成する構造を観測する必要がある。

このようにロドプシンは興味深いターゲットであるが、ロドプシンの XFEL による時分割実験は未だに報告例がない。それは、ロドプシンの良質な結晶（高い空間分解能等）を SFX 実験に必要な量を調製するのが容易ではないこと、微弱な光で崩壊するので測定が難しく、ロドプシンの時分割実験が可能な測定装置が現在はないということが挙げられる。本課題では、上記の問題を解決するためにウシやヒトといった高等生物のロドプシンの発現を検討し、良質な結晶を得るのに適した発現系の構築を行う。場合によっては安定化のための融合タンパク質導入などを検討し、併せて光受容活性の保持についても確認を行う。の装置開発については、バクテリオロドプシンの時分割研究で行われた装置・技術開発の実績を基に、新たな装置の開発を行う。ロドプシン結晶の難点は、微弱であっても光が当たるとレチナールを放出し、オプシンに変化してしまう点である。現在の結晶輸送方法では、励起光が広範囲に散乱されるため、微弱な光でも崩壊するロドプシンには適していない。そこで、試料を励起光や XFEL の照射ごとに少量ずつ液滴として送るなどの輸送方法を検討する。

4. 研究成果

一般的に、X 線自由電子レーザー（XFEL）による時分割 SFX 測定では、光感受性試料の結晶を緩衝液などに懸濁して 100 ミクロン程度の細いストリームとして流し、ポンプレーザーを照射して反応を開始させた後、XFEL による回折像を取得して動的構造を得る。今までに、結晶を輸送する装置やその技術は様々に開発されてきたが、現在主に使われている高粘度媒体による連続的な結晶輸送方法は、可視光レーザーによる光散乱の影響があるため、僅かな光でも反応する視覚ロドプシンには適していない。そこで、試料を液滴として「少量ずつ分離」し、ベルトコンベアで輸送して測定する不連続型結晶輸送装置の開発を行った。実際に開発した装置は XFEL 施設 SACLA にて、モデルタンパク質数種の微結晶を用いて回折実験を行った。その結果、構造解析に十分な回折像を得ることに成功した。また光感受性試料を用いてポンププローブ型時分割 SFX 実験を行い、得られた回折像より差フーリエ図を確認したところ、時間経過に伴い構造が変化していく様子を確認できた。この構造変化は分光実験とも一致しており、装置性能を実証することができた（論文準備中）。また、XFEL による構造解析を行うのに十分な量・質の結晶作成を目指して、ロドプシンの発現及び精製を行い、数種の高等生物由来ロドプシンを安定的に得ることに成功し、更に数種類の結晶化条件で結晶生成を確認することができた。現在、SPring-8 において回折実験を行い、更に高分解能を示す良質な結晶化条件の検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Im Dohyun, Inoue Asuka, Fujiwara Takaaki, Nakane Takanori, Yamanaka Yasuaki, Uemura Tomoko, Mori Chihiro, Shiimura Yuki, Kimura Kanako Terakado, Asada Hidetsugu, Nomura Norimichi, Tanaka Tomoyuki, Yamashita Ayumi, Nango Eriko, Tono Kensuke, Kadji Francois Marie Ngako, Aoki Junken, Iwata So, Shimamura Tatsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20221-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Wickstrand Cecilia, Katona Gergely, Nakane Takanori, Nogly Przemyslaw, Standfuss Joerg, Nango Eriko, Neutze Richard	4. 巻 7
2. 論文標題 A tool for visualizing protein motions in time-resolved crystallography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structural Dynamics	6. 最初と最後の頁 024701 ~ 024701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5126921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimazu Yoshiaki, Tono Kensuke, Tanaka Tomoyuki, Yamanaka Yasuaki, Nakane Takanori, Mori Chihiro, Terakado Kimura Kanako, Fujiwara Takaaki, Sugahara Michihiro, Tanaka Rie, Doak R. Bruce, Shimamura Tatsuro, Iwata So, Nango Eriko, Yabashi Makina	4. 巻 52
2. 論文標題 Improving High Viscosity Extrusion of Microcrystals for Time-resolved Serial Femtosecond Crystallography at X-ray Lasers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Crystallography	6. 最初と最後の頁 1280-1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600576719012846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nango Eriko, Kubo Minoru, Tono Kensuke, Iwata So	4. 巻 9
2. 論文標題 Pump-Probe Time-Resolved Serial Femtosecond Crystallography at SACLA: Current Status and Data Collection Strategies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 5505-5505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app9245505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shintaro Maeda, Yuki Shiimura, Hidetsugu Asada, Kunio Hirata, Fangjia Luo, Eriko Nango, Nobuo Tanaka, Masayasu Toyomoto, Asuka Inoue, Junken Aoki, So Iwata, Masatoshi Hagiwara	4. 巻 -
2. 論文標題 Endogenous agonist-bound S1PR3 structure reveals determinants of G protein-subtype bias	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf5325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 7件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Eriko Nango
2. 発表標題 Time-resolved serial femtosecond crystallography of light-sensitive proteins
3. 学会等名 Belgian Crystallography Symposium BCS-11 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eriko Nango
2. 発表標題 Measurement Systems for Biomolecular Movies using X-ray Free Electron Lasers
3. 学会等名 SACLA Users' Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eriko Nango
2. 発表標題 Protein structural dynamics revealed by molecular movie analysis
3. 学会等名 RIKEN BDR Symposium 2021 "Structuring Biosystems: Functions Emerging from Molecules" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南後 恵理子
2. 発表標題 高速分子動画：タンパク質が機能する際の構造変化を可視化する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会シンポジウム 拡大する構造生物学 Expanding Structural Biology (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eriko Nango
2. 発表標題 A molecular movie of structural changes in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin
3. 学会等名 2019 ESP-IUPB World Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 X線自由電子レーザーによるロドプシン類の分子動画解析
3. 学会等名 ISSP ワークショップ「レチナルタンパク質の光機能発現の物理と化学」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 X線自由電子レーザーによるタンパク質分子動画撮影
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 XFEL分子動画が捉えたタンパク質構造変化
3. 学会等名 日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浅田 秀基 (Asada Hideki) (20399041)	京都大学・医学研究科・特定講師 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------