

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07319

研究課題名(和文) アレスチンの受容体選択性と自己会合

研究課題名(英文) Receptor specificity and self-association of arrestin

研究代表者

今元 泰 (Imamoto, Yasushi)

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：80263200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なG蛋白質共役型受容体(GPCR)であるロドプシンと、そのG蛋白質活性化を停止する調節蛋白質であるアレスチンとの相互作用を、ナノディスクを用いたX線溶液散乱法で解析した。自己会合性とリン酸化ロドプシンとの結合能について、全長アレスチンとスプライスバリエーションであるp44と比較したところ、両者は同様に濃度依存的な4量体を形成することがわかった。また、p44とリン酸化ロドプシンは、暗状態で不安定なプレカップル状態、光活性化状態でフルカップル状態を形成することが実験的に示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCRは市販の医薬品の約半数が作用していると考えられている生理学的・薬理的に重要な蛋白質群である。GPCRはリガンドの作用によってG蛋白質で仲介される細胞内シグナル伝達系を活性化し、リン酸化とアレスチン結合によってG蛋白質活性化能を失う。本研究で得られたアレスチンのタイプの違いによる結合様式の違いは、GPCRの活性を適切に制御して細胞が正常に機能するメカニズムの理解に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The interaction between rhodopsin, a typical G-protein coupled receptor, and arrestin was studied by small-angle X-ray scattering using nanodiscs. The comparison of self-association and interaction with phosphorylated rhodopsin between rod arrestin and its splice variant p44 suggested that p44 forms tetramer similar to that of arrestin. In addition, it was experimentally demonstrated that p44 and phosphorylated rhodopsin form unstable complex (pre-coupled state) in the dark, which is converted to fully coupled state by light.

研究分野：生物物理学、光生物学

キーワード：アレスチン G蛋白質共役型受容体 GPCR 自己会合 X線溶液散乱法 p44

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、市販の医薬品の約半数が作用していると考えられている生理学的・薬理的に重要な蛋白質群である。GPCR はリガンドの作用によって、G 蛋白質で仲介されるシグナル伝達系を活性化する。GPCR はその後リン酸化され、調節蛋白質であるアレスチンが結合することによって G 蛋白質活性化能を失う。GPCR をターゲットとする医薬品の多くが GPCR に対する阻害剤であることからわかるように、GPCR の活性を適切に制御することは、細胞が正常に機能するために不可欠である。そのため、近年はアレスチンに関する研究が加速度的に発展している。

ヒトでは 4 種類のアレスチンが同定されている。このうち 2 つは視細胞で発現し、一般に桿体アレスチン、錐体アレスチンとよばれている。残りの 2 つは アドレナリン受容体やアセチルコリン受容体など、視覚以外の GPCR と相互作用し、アレスチン 1、アレスチン 2 とよばれている。これらのアミノ酸配列や立体構造はよく似ているが、その性質が大きく異なっている。

桿体アレスチンはリン酸化したロドプシンに特異的に結合する。錐体アレスチンは、リン酸化した錐体視物質に最もよく結合するものの、リン酸化していない錐体視物質や非視覚 GPCR にも結合する。また、アレスチンはリン酸化した錐体視物質、ロドプシン、非視覚 GPCR に結合するが、リン酸化していないものにはほとんど結合しない。つまり、桿体アレスチンはリン酸化状態と受容体の種類をとともに区別できるのに対して、錐体アレスチンはリン酸化状態、

アレスチンは受容体の種類を厳密には区別できないといえる。これらの知見は、アレスチンの生理機能を理解するためには、いかにして適切なパートナーを識別しているのかを分子レベルで明らかにすることが不可欠であることを示している。しかしながら、従来のアミノ酸配列や立体構造に基づいた解析からでは、サブタイプ間の受容体選択性やリン酸基特異性の違いに対する明確な知見が得られていない。

一方、報告者らの以前の研究から、桿体アレスチンは自己会合して 4 量体を形成することがわかっている。その解離定数がアレスチンの細胞内濃度付近にあることから、アレスチンの自己会合には、受容体と結合することができる単量体の濃度が、必要以上にあがらないためのリザーバとしての役割があると考えられている。この自己会合性もアレスチンのサブタイプによって異なっており、桿体アレスチンは 4 量体化するのに対し、錐体アレスチンは多量体化せず、アレスチンは直鎖上の多量体を形成する。

以上のことから、報告者はアレスチンの自己会合性に注目することで、アレスチンの受容体選択性やリン酸基特異性の違いを明らかにすることができると考えた。

2. 研究の目的

リン酸化した G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) に結合し、その活性を停止させるアレスチンは、サブタイプによって受容体選択性やリン酸基特異性に大きな違いがある。しかし受容体との結合に参与するアミノ酸残基や立体構造にサブタイプ間で大きな違いはなく、これらの単純な比較から選択性の違いを説明することはできていない。そこでアレスチンの自己会合性がサブタイプ間で異なることに注目し、選択性の違いが自己会合性の違いに起因するのかを検証する。

3. 研究の方法

アレスチンと受容体の結合特異性と自己会合性の関係を明らかにするため、ウシ桿体アレスチンと、そのスプライズバリエーションである p44 に着目した。p44 はウシアレスチンの C 末端の 35 アミノ酸残基が 1 個のアラニン残基と置換したものである。暗順応状態にある桿体細胞では、アレスチンはロドプシンが局在する外節部から内節部へ移動するため、暗順応状態の視細胞でのロドプシンの活性停止は、主に p44 によると考えられている。p44 は光活性化したロドプシンならばリン酸化していなくても結合し、リン酸化したロドプシンならば光活性化しなくても結合すると報告されている。そこで、p44 をリン酸化状態や受容体特異性を解析するためのモデルとして用いた。

ウシ桿体アレスチン (以下アレスチン) は、主にウシ網膜から調製した。一方、p44 の細胞内の含量は少ないため、大腸菌に遺伝子を導入し、発現系を構築した。また、比較のため、大腸菌で発現させたアレスチンも調製した。

アレスチンや p44 の自己会合、およびロドプシンの結合の解析には、報告者らによって実績のある X 線溶液散乱法を用いた。得られた散乱曲線の原点散乱強度 (散乱角 0 への散乱強度の外挿値) から、散乱体の見かけの分子量を見積もった。

なお、従来の研究では、界面活性剤で可溶化したロドプシンを用いていたが、本研究ではナノディスクに組み込んだロドプシンを用いた。ナノディスクは、両親媒性の Membrane scaffold protein (MSP) で囲まれた脂質二重膜の薄片で、直径が約 11 nm であることからロドプシンをはじめとする GPCR を埋め込むことができる。ナノディスクは可溶性が高く単分散すること、膜環境を再現できることから本研究に好適な試料であると考えられた。

4. 研究成果

4. 1. ナノディスク試料を用いた X 線溶液散乱測定によって、桿体アレスチンとロドプシンの結合を定量的に解析できるかどうかを検討した。まず、ナノディスク溶液の X 線散乱曲線を測定し、ギニエプロットしたところ、最小角側（ギニエ領域）に直線領域が見られ、単分散していることが確認された。直線領域を散乱角 0 へ外挿し、原点散乱強度を得た。原点散乱強度は、 $[\text{散乱粒子の分子量}] \times [\text{重量濃度}]$ に比例する。ナノディスクは 1 分子のロドプシン (42 kDa) と 2 分子の MSP (33 kDa \times 2) からなるが、電子密度の異なる脂質も含んでいる。そこで、オボアルブミン (43 kDa) との比較から、ナノディスクの見かけの分子量を求めたところ、113 kDa であった。これは、ナノディスクを構成するロドプシンと MSP の合計 (108 kDa) に近く、X 線散乱測定で定量的な解析が可能なが確認された。

次に、非リン酸化ロドプシン、あるいはリン酸化ロドプシンを含むナノディスクをアレスチンと混合し、光による散乱強度の変化を測定した。さまざまなアレスチン濃度における原点散乱強度を求めたところ、リン酸化依存的、光依存的に散乱強度が増加したが、その割合はアレスチン濃度によって大きく異なっていた。

アレスチンは濃度依存的に 4 量体化するが、一部がリン酸化ロドプシンと結合すると、フリーのアレスチンの濃度が低下するため、4 量体は解離する。試料内にはアレスチン単量体、アレスチン 4 量体、ロドプシンを含むナノディスク、ロドプシン/アレスチン複合体を含むナノディスクが共存している。これを、アレスチンの自己会合とロドプシンとアレスチンの結合を含む平衡モデルで解析したところ、アレスチンの 4 量体と単量体の平衡の中の単量体のみがリン酸化ロドプシンと結合すること、リン酸化ロドプシンとアレスチンの結合定数は、光刺激で約 7 倍大きくなることが示された。

4. 2. アレスチンのスプライズバリエーションである p44 を大腸菌で発現させた。また、比較のために全長のアレスチンも大腸菌で発現させた。まず、大腸菌で発現させたアレスチンの濃度依存的な自己会合を X 線溶液散乱で解析し、ウシ網膜由来のアレスチンと比較したところ、同様の結合定数で二量体化することが確認された。次に、p44 の自己会合を解析した。

p44 はアグリゲートしやすく、X 線小角散乱データのギニエ領域の直線性が見られなかった。そこで、アグリゲートを含んだ見かけの分子量を解析したところ、濃度依存的な上昇が見られたことから、多量体化が示唆された。

アグリゲートと自己会合を区別するため、アグリゲートによる散乱の影響を受けにくい、高角側の散乱パターンに着目した。アレスチンの結晶構造から 4 量体の散乱パターンを予測すると、単量体には見られない特徴的なショルダーがあり、アレスチン 4 量体の実験で得た散乱パターンでも同様のショルダーが確認できる。そこで、p44 の高角側の散乱パターンを各濃度で比較したところ、濃度依存的に 4 量体に特徴的な散乱パターンが観測されたので、p44 においても濃度依存的に全長アレスチンと同様の 4 量体を形成していることが示唆された。

4. 3. リン酸化ロドプシン、および非リン酸化ロドプシンと p44 との相互作用を X 線溶液散乱法で解析した。まず、非リン酸化ロドプシンと p44 を混合し、ロドプシンを光活性化したが、見かけの分子量は上昇せず、複合体を形成しないことが示された。これは、従来の報告とは異なる結果であった。

次に、リン酸化ロドプシンと p44 を混合して X 線散乱カーブを測定したところ、光刺激前でも見かけの分子量が増加していた。また、光照射しても見かけの分子量はそれ以上増加しなかったため、従来の報告の通り、ロドプシンがリン酸化していれば、光活性化しなくても p44 と結合すると考えられた。一方、リン酸化した暗状態ロドプシンと p44 の複合体を光照射すると、慣性半径の有意な減少が見られた。これは、不安定なプレカプトル状態から強固な結合状態への移行が実験的に観測されたものと考えられた。

4. 4. ウシ由来の錐体アレスチンを大腸菌の発現系を用いて調製することを試みたが、桿体アレスチンや p44 と同じ条件では解析に十分な量を得ることができなかった。これは錐体アレスチンが変性して不溶性となり、水溶性蛋白質として回収できなかったためであると考えられた。一般に、水溶性蛋白質が不溶性画分に含まれるのは、大腸菌の中でのフォールディングが追いついていないことが原因であると考えられる。そこで、培養温度を下げることで蛋白質合成を遅くしたところ、収量の大幅な増加が見られた。今後は、この測定系を錐体型アレスチンや β アレスチンにも拡張することで、多様化したアレスチンの機能の違いを考察できると期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Shen, Y.-C., Sasaki, T., Matsuyama, T., Yamashita, T., Shichida, Y., Okitsu, T., Yamano, Y., Wada, A., Ishizuka, T., Yawo, H., and Imamoto, Y. (2018) Red-tuning of the channelrhodopsin spectrum using long conjugated retinal analogues. *Biochemistry* **57**, 5544-5556 (査読有)
DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00583.

Maeda, R., Hiroshima, M., Yamashita, T., Wada, A., Sako, Y., Shichida, Y., and Imamoto, Y. (2018) Shift in conformational equilibrium induces constitutive activity of G-protein-coupled receptor, rhodopsin. *J. Phys. Chem. B* **122**, 4838-4843 (査読有)
DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b02819. doi:10.1021/bi5003772.

Sato, K., Yamashita, T., Ohuchi, H., Takeuchi, A., Gotoh, H., Ono, K., Mizuno, M., Mizutani, Y., Tomonari, S., Sakai, K., Imamoto, Y., Wada, A., and Shichida, Y. (2018) Opn5L1 is a retinal receptor that behaves as a reverse and self-regenerating photoreceptor. *Nat. Commun.* **9**, 1255 (査読有)
DOI: 10.2142/biophysico.14.0_183.

沖津貴志, 松山武, 山下高廣, 石塚徹, 八尾寛, 今元泰, 七田芳則, and 和田昭盛. (2017) レチナル由来エナミン型 Schiff 塩基を発色団とする非共有結合型チャンネルロドプシンの開発. *ビタミン* **91**, 426-429 (査読有)

Kojima, K., Yamashita, T., Imamoto, Y., Kusakabe, T. G., Tsuda, M., and Shichida, Y. (2017) Evolutionary steps involving counterion displacement in a tunicate opsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 6028-6033 (査読有)
DOI: 10.1073/pnas.1701088114.

Kojima, K., Matsutani, Y., Yamashita, T., Yanagawa, M., Imamoto, Y., Yamano, Y., Wada, A., Hisatomi, O., Nishikawa, K., Sakurai, K., and Shichida, Y. (2017) Adaptation of cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 5437-5442 (査読有)
DOI: 10.1073/pnas.1620010114.

Okitsu, T., Matsuyama, T., Yamashita, T., Ishizuka, T., Yawo, H., Imamoto, Y., Shichida, Y., and Wada, A. (2017) Alternative formation of red-shifted channelrhodopsins: noncovalent incorporation with retinal-based enamine-type Schiff bases and mutated channelopsin. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **65**, 356-358 (査読有)
DOI: 10.1248/cpb.c17-00054.

[学会発表](計5件)

今元 泰 「ロドプシン活性化の一分子ダイナミクス」大阪大学蛋白質研究所セミナー「膜タンパク質の構造ダイナミクス」大阪大学蛋白質研究所1階講堂、2016年5月12日

Imamoto, Y., Kojima, K., Oka, T., Yamashita, T., Shichida, Y. 「Self-association of p44, a splice variant of visual rod arrestin (桿体アレステチンのスプライスバリエーション・p44の自己会合の解析)」第54回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、2016年11月26日

Imamoto, Y. "Single molecule observation of the activation dynamics of rhodopsin", International Symposium on Biophysics of Rhodopsins, Science Seminar House, Kyoto University, Kyoto, Japan, May 11, 2017.

Imamoto, Y., Kojima, K., Oka, T., Maeda, R., Shichida, Y. 「Effect of dimerization on the light-induced helical rearrangement of visual rhodopsin (二量体化がロドプシンの光構造変化に与える影響)」第55回日本生物物理学会年会、熊本大学、2017年9月21日

Imamoto, Y. "Development of red-shifted channelrhodopsin variants using long-conjugated retinal analogues. 18th International Conference on Retinal Proteins. Hockley Valley Resort, Ontario, Canada, September 25, 2018.

[図書](計1件)

今元 泰 他、朝倉書店、光と生命の事典 (日本光生物学協会 光と生命の事典 編集委員会 編)、2016

[産業財産権]

なし

〔その他〕
ホームページ等

http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/mp/home_jp.html

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。