

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19370071

研究課題名（和文）モデルG蛋白質共役受容体を制御する水・結合分子の高分解能解析

研究課題名（英文） Analysis of water and molecules bound to a prototypical GPCR

研究代表者

岡田 哲二 (TETSUJI OKADA)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：10271545

研究成果の概要（和文）：主な薬剤標的であるGタンパク質共役受容体（GPCR）の活性は、アゴニスト結合により誘起されるが、その分子メカニズムは明らかでない。本研究では、モデルGPCRであるロドプシンに結合して活性に影響を及ぼす可能性のある分子を検索し、共結晶化・X線解析を行った。βイオノン（β-ionone）は、ロドプシン本来のリガンドであるレチナールの構造の一部が欠けた分子であり、活性への影響が示唆されている分子であるが、2.6 Å分解能のデータを収集して解析を行ったところ、ロドプシン分子表面への結合を明らかにすることができた。この結果は、GPCRの疎水性表面への特異的な分子結合を示す初めての例である。

研究成果の概要（英文）：Activity of a G protein-coupled receptor (GPCR) is evoked upon agonist binding via yet unknown dynamics of the protein moiety. We have crystallized prototypical GPCR rhodopsin, in the presence of some retinal derivatives that would bind to the surface of the protein and affect the activity. The binding of β-ionone, which is a truncated form of retinal and is supposed to have some allosteric effect, has been detected by X-ray diffraction analysis to 2.6 angstroms resolution. This is the first example demonstrating that the hydrophobic surface of a GPCR could be occupied by a specifically bound small molecule.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	10,400,000	3,120,000	13,520,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：生物物理、シグナル伝達、膜タンパク質、結晶構造、活性制御

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、生体膜内在性蛋白質で最大のファミリーを形成するG蛋白質共役型受容体

(GPCR) について、高分解能構造情報に立脚した機能解析を目的として研究を行っている。研究開始時点でGPCRの立体構造

解析は視覚の光受容体ロドプシン以外に成功例はなかったが、国内外で多大な労力・資源が費やされ、拡散性リガンドを結合するGPCRの結晶構造が過去3年の間に複数報告された。刺激受容に伴うGPCRの活性化・構造変化のメカニズムに関しては、ロドプシンの部位特異的スピンラベルなどにより光反応中間状態でのヘリックス間距離の変化などが推定されていた (Farrens DL et al, *Science* 274, 768, 1996)。また部位特異的変異体を用いた、所謂構成的活性の生じるサイトの同定なども、ロドプシンの系では詳細な研究が蓄積されていた (Rao VR et al, *Nature* 367, 639, 1994)。一方、蛍光性リガンド・ラベル等を用いた創薬標的GPCRの構造変化過程の研究から、複数の活性化状態というコンセプトが広まりつつあったが (Ghanouni P et al, *J Biol Chem* 276, 24433, 2001)、これはロドプシンで時系列的に生成・消滅する複数の光反応中間体に通ずるものがある (Okada T et al, *Trends Biochem Sci* 26, 318, 2001)。またムスカリン、グルタミン酸受容体などでは多数のアロステリックモジュレーターが知られ (Jensen AA and Spalding TA, *Eur J Pharm Sci* 21, 407, 2004)、ケモカイン受容体のように非拮抗型のアロステリック阻害剤が細胞・個体レベルで効果的に働くことが示された例も見受けられていたが (Bertini R et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 11791, 2004)、いずれも正確な結合様式が明らかになった例は現在でも存在しない。そのような天然・合成分子の中には、7回膜貫通ヘリックス領域に結合していることが示唆されるものもある。我々は、ロドプシンの結晶構造中の膜貫通領域に水分子4つのクラスターを包み込むスペースが存在していること、その近傍にはロドプシン様GPCRで保存性の高いアミノ酸が少なくないことを明らかにしており (Okada T et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5982, 2002)、その部位も関与するアロステリック制御・部分的な活性発現の可能性は明らかにすべき興味深いテーマとして挙げられていた。一方、主に水溶性蛋白質をターゲットとしてのハイスループットスクリーニング技術の発展などから、未知の結合分子を探索しようという“アロステローム” (Lindsley & Rutter, *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10533, 2006) の概念にも注目が寄せられる中、膜蛋白質特有の貫通疎水性外周部における制御は、受容体会合との関連からも重要と考えた。

2. 研究の目的

ロドプシンの7回膜貫通ヘリックス領域は、多くのGPCRとの相同性もあり、また情報受容機能上重要なリガンド結合部位も含まれているため、詳細な構造解析のターゲットと

して興味深い。本研究では、この領域における内在性水分子・水素結合の動態や活性制御部位について明らかにすることを目的とした。具体的には、発色団である11シスレチナールプロトン化シッフ塩基の不活性化状態での安定化機構やシストランス光異性化反応と後続の熱的反応における水を介した水素結合ネットワークの役割・再配置を明らかにすることや、既知のリガンド結合部位とは異なる新たな制御 (アロステリック) 部位を同定することで、情報伝達機能の本質的なメカニズムの理解を試みた。本研究提案では、これまでに改善を重ねてきた結晶試料や、制御部位結合候補因子との複合体結晶及びアナログ発色団置換型結晶等を併用し、X線結晶構造解析により、ロドプシン及びその活性化中間状態のモデル構築と発色団結合部位を含む膜貫通領域を中心として水分子の挙動を明らかにする一方、効率的スクリーニングによる結合分子検索・複合体構造解析により、GPCRにおける活性のアロステリック制御機構に関するモデル提出を試みることであった。

3. 研究の方法

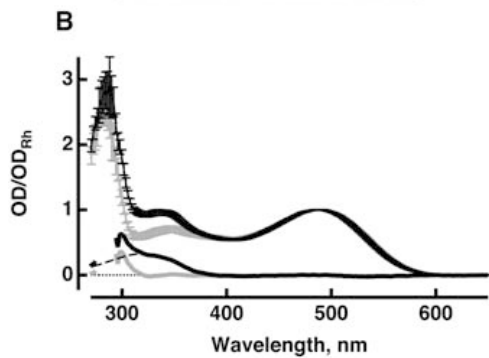
高等動物のロドプシンの結晶構造解析は、ウシ網膜試料から膜画分を調製し、独自に考案した選択的可溶化法による蛋白質精製、3次元結晶化という各ステップを改善しつつ行った。一方、既知の高分解能結晶化条件において、レチナール類縁体やクロリン類似の分子など、これまでの知見から候補として考えられる活性制御因子の存在下で検索を行い、複合体結晶からのデータ収集を行った。また、実際に結晶中に目的分子が含まれていることを確認する別の方法として、近紫外領域までの感度をもつ顕微分光測定を、Harvard Medical School の Clint L. Makino 氏との共同研究により行った。

光反応中間体としては、これまでに解析を行ったバソロドプシン、ルミロドプシンに関して分解能の向上を試みるとともに、活性状態 (M II) の前駆体である M I の補足条件検討を詳細に行い、データを取得するに至った。X線回折は、主に高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory のビームライン NW-12A 等において測定した。

4. 研究成果

まず、これまでに解析を行った共結晶のうち、構造精密化まで完了した、 β イオンノードロドプシン複合体について以下にまとめる。

図1Aは、この共結晶を顕微分光装置で観察した写真である。横方向に長い棒状の一部を拡大しており、棒の太さ (図の縦方向) はおよそ 0.1 mm 以下である。中央やや右の白いスポットが測定光を示している。図1Bは、



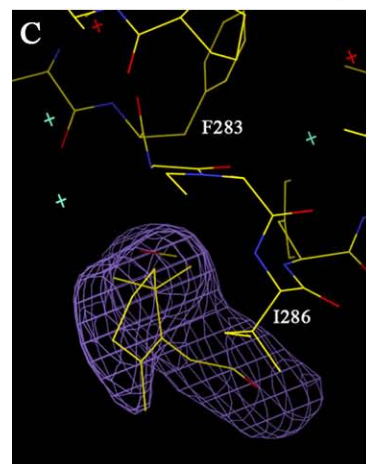
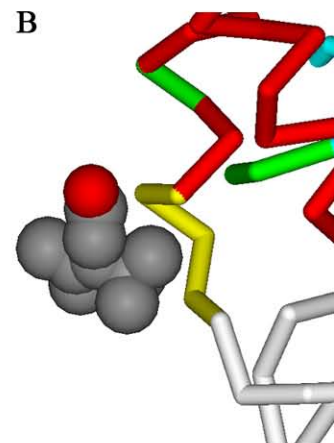
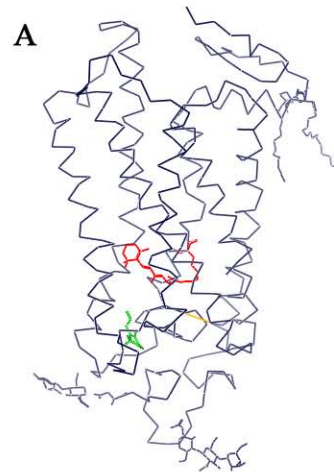
ロドプシンのみの結晶（太い灰色線）と共結晶（太い黒線）の吸収スペクトル、および両者の差（細い黒線）と 330 nm 付近にピークを持つ成分を補正した後の β イオノン（吸収極大が約 295 nm）由来の吸収（細い灰色線）である。

表 1 Data set 1

Data collection	
Resolution range, Å	50 – 2.6
Unit cell (a=b, c), Å*	96.99, 149.8
Twin fraction	0.017
Mosaicity, °	0.326
Total observations	185254
Unique observations	39801
R_{merge} , % (outer shell)	9.50 (50.4)
Completeness, % (outer shell)	93.6 (67.9)
$I / \sigma(I)$, (outer shell)	14.1 (1.56)
Wilson B factor, Å ²	60.7
Refinement	
R_{work}	22.3
R_{free}	26.0
Rmsd bonds	0.008
Rmsd angles	1.20
Occupancy (β -ionone)	0.97, 0.94

これらの吸収強度と、モル吸光係数、結晶格子に由来する二色性を考慮してロドプシン 1 分子当たりの β イオノン結合数を見積もると、0.4~1.6 個という値が得られる。この結果は、次に示すように結晶データ解析の結果ともよく一致するものである。

表 1 は、ロドプシン- β イオノン共結晶から得られた最も高分解能なデータの詳細と、 β イオノンモデルを組み込んで行った構造精密化の結果を示している。



また、図2Aはロドプシン分子（上が細胞質側）中のレチナール発色団（赤）とβイオン（緑）の相対的な位置関係を示す。図2Bは拡大したβイオン（空間充填表示）結合部位（黄色のペプチド領域）であり、膜貫通ヘリックスVとVIをつなぐループ（白のペプチド領域）のC末端側に位置している。図2Cは、モデルからβイオンを除去して計算した、いわゆるオミットマップと、精密化後モデル中のβイオンとを重ねて表示している。表1に記載のβイオン占有率は、結晶の非対称単位を構成するロドプシン2分子それぞれについて得られた値である。

βイオンや、別のレチナール関連分子であるレチノール（ビタミンA）による、ロドプシンのアポタンパク質（オプシン）の活性への影響が、最近調べられてきている。特に興味深いのは、明暗視・色覚という異なる機能を担う桿体・錐体のオプシンにおいて、これらのレチナール関連分子が異なる作用を示す可能性が示唆されていることである。今回明らかになったβイオン結合部位は、ロドプシンの発色団である11シスレチナールが存在する状態で、それとは異なる部位にレチナール関連分子が結合することを示しており、今後活性発現との関連を更に明らかにする必要がある。

最後に簡単ではあるが、光反応中間体に関する研究において、MIの補足条件を最適化することができたのには、温度条件として230K前後で用いることのできるクライオ凍結溶媒の組成が重要であった。その結果、既に良質なX線回折データを得ることができ、これまでには見られなかった部位に電子密度の差を検出している。これを解析することにより、活性状態への変化に重要なタンパク質のダイナミクスに関する知見が得られるであろう。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計6件）

1. Do vertebrate rhodopsins contain an allosteric binding site(s) for retinoids?
T. Isayama, S. Miyazono, T. Okada, M. Kono, R.K. Crouch, A.L. Zimmerman, C.L. Makino
FASEB JOURNAL 24, 1b590 (2010)
査読無
2. ロドプシンの構造・機能における特殊性と一般性
川元・尾崎洋子、岡田哲二
医学のあゆみ 233, 662-667 (2010)
査読無
3. An Additional Retinoid Binding Site in

Rhodopsin

T. Isayama, T. Okada, J. D. Looney, R. K. Crouch, A. L. Zimmerman, C. L. Makino
Biophys. J. 96 (3), Suppl. 1, Feb. 2009, 528a

査読無

4. ロドプシンおよび関連受容体結晶解析の進展

岡田哲二

日本結晶学会誌 50(6), 359-364 (2008)

査読無

5. X-ray crystallographic analysis of 9-cis-rhodopsin, a model analogue visual pigment

Nakamichi H, Okada T.

Photochem Photobiol 83, 232-235 (2007)

査読有

6. Photoisomerization mechanism of rhodopsin and 9-cis-rhodopsin revealed by X-ray crystallography.

Nakamichi H, Buss V, Okada T.

Biophys J 92, L106-L108 (2007)

査読有

〔学会発表〕（計4件）

1. ロドプシン結晶構造解析の最近の進展

岡田哲二

第5回GPCR研究会

平成20年5月、東京

2. SPring-8 GPCR symposium

Feb 26, 2008, Harima

Structure and function of bovine rhodopsin

Tetsuji Okada

3. ウシロドプシンの結晶構造と光反応

岡田哲二

蛋白質研究所セミナー 生物における光情報変換の一般性と多様性

平成20年4月、大阪

4. Structures of the chromophore in rhodopsin and bathorhodopsin

Sugihara M, Okada T., Entel P, Buss V

International symposium on retinal proteins: experiments and theory, Sep 24, 2007, Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 哲二 (TETSUJI OKADA)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：10271545

(2) 研究協力者

小田俊一郎 (SHUNICHIRO ODA)

学習院大学・理学部・科研費技術員

ライリーケント (CHARLES K. RILEY)

学習院大学・理学部・科研費技術員