

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770129

研究課題名（和文） イカロドプシンのX線結晶構造解析

研究課題名（英文） X-ray crystallographic study of squid rhodopsin

研究代表者

村上 緑(Midori Murakami)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：20324387

研究成果の概要：視物質ロドプシンは網膜視細胞に存在する光受容膜蛋白質である。無脊椎動物のロドプシンは、脊椎動物のロドプシンとは対照的に光活性型アシッドメタ中間体が安定であり、また、生体内に普遍的に存在する Gq 型 G 蛋白質と共役するという特徴をもつ。研究代表者らはスルメイカのロドプシンについて X 線結晶構造解析を行い、2007 年度までに基底状態の立体構造を 2.5Å 分解能で決定し、無脊椎動物型ロドプシンの機能を裏付ける以下のような特徴的な構造を解明した。1) GPCR の膜貫通領域はほぼ保存されている、2) 細胞質側の G 蛋白質共役部位が堅いドメイン構造である、3) 9 個の水分子クラスターが活性部位と G 蛋白質共役部位を結ぶ水素結合網を形成し、細胞内シグナル伝達に寄与している、4) 発色団レチナールのプロトン化シッフ塩基とその対イオン Glu180 は 5Å 離れている、5) GPCR の生理的な二量体がヘリックス 4 と 5 を接合面として会合している、6) 細胞外側領域どうしの塩橋による相互作用が無脊椎動物の目が偏光を検出するのに寄与している。2008 年度は光反応初期中間体であるバソロドプシンの結晶構造解析を目指し、イカロドプシン結晶中でバソ反応中間体を捕捉する条件検討を行った。すなわち、液体窒素温度に冷却した結晶に対し、青色光照射によりバソ反応中間体(全トランス型)と、橙色光照射によりロドプシン(11-cis 型)とイソロドプシン(9-cis 型)の混合状態とを可逆的に生成することを見出した。バソ中間体の生成率が高めた結晶を用いて回折データセットを収集し、構造解析に着手した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

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：ロドプシン、X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ロドプシンに代表されるG蛋白質共役型受容体(GPCR)は、ヒトゲノム中で最大のスーパーファミリーを形成し、生体内で感覚受容や情報伝達など多種多様な生命機能を担う。また、ヒトの疾患にも大きく関わるために創薬の標的の半数以上を占め、産業分野においても非常に重要なタンパク質であると言える。その重要性にも関わらず、構造が決定されたGPCRはウシロドプシンが唯一の例であった。GPCRに共通する、あるいは異なる機能発現に必要な構造モチーフを特定するためには、ウシロドプシンに続くGPCRの構造決定が必要不可欠であり、世界中で熾烈な競争が繰り広げられていた。

2. 研究の目的

ロドプシンが担うG蛋白質活性化の分子機構の全容を構造学、分光学の両面から解明することを目指し、以下の2点を本課題の研究目的とした。(1) 2 Å台の分解能でイカロドプシン基底状態の構造を決定する。(2) イカロドプシン結晶を用い低温下で光反応初期中間体(バソ中間体)を捕捉し構造決定する。

3. 研究の方法

スルメイカの網膜から単離した微絨毛膜面分から、ロドプシンを選択的に可溶化し結晶化を行う。得られた結晶について、X線回折実験および顕微分光実験を行う。

4. 研究成果

(1) イカロドプシン基底状態の構造解析精製・結晶化条件の精密化を行った結果、良質な結晶を得、最終的にイカロドプシンの立体構造を2.5 Å分解能で決定することに成功した。この構造から、1) GPCRの膜貫通領域はほぼ保存されていること、2) 細胞質側のG蛋白質共役部位が堅いドメイン構造であること、3) 9個の水分子クラスターが活性部位とG蛋白質共役部位を結ぶ水素結合網を形成し、細胞内シグナル伝達に寄与していること、4) 発色団レチナールのプロトン化シッフ塩基とその対イオンGlu180は5 Å離れていること、5) GPCRの生理的な二量体がヘリックス4と5を接合面として会合していること、6) 細胞外側領域どうしの塩橋による相互作用が無脊椎動物の目が偏光を検出するのに寄与していること、が新たに明らかとなった。

(2) バソ中間体の構造解析

イカロドプシン結晶中でバソ反応中間体を捕捉する条件を検討した。すなわち、液体窒素温度に冷却した結晶に対して、適当な波長

の光を照射することで発色団レチナールの光異性を促した。その結果、青色光照射によりバソ反応中間体(全トランス型)と、橙色光照射によりロドプシン(11-cis型)とイソロドプシン(9-cis型)の混合状態とを可逆的に生成することに成功した。ロドプシンとイソロドプシンの存在比率は照射する光の波長で制御可能であり、バソ反応中間体とイソロドプシンのそれぞれを結晶中で効率良く捕捉できる条件を見出すことができた。バソ反応中間体についてX線回折実験を行い、回折データセットを収集し構造解析に着手した。

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)

①S. Kurosawa, R. Murakami, K. Onai, M. Morishita, D. Hasegawa, R. Iwase, T. Uzumaki, F. Hayashi, T. Kitajima-Ihara, S. Sakata, M. Murakami, T. Kouyama and M. Ishiura, Functionally important structural elements of the cyanobacterial clock-related protein Pex, *Genes Cells* 14, 1-16 (2009), 査読有

②村上緑, イカロドプシンの結晶構造と無脊椎動物の視覚, *生物物理* 49, 15-16 (2009), 査読有

③N. Hayakawa, T. Kasahara, D. Hasegawa, K. Yoshimura, M. Murakami and T. Kouyama, Effect of xenon binding to a hydrophobic cavity on the proton pumping cycle in bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.* 384, 812-823 (2008), 査読有

④村上緑, 神山勉, スルメイカロドプシンのX線結晶構造解析, *実験医学* 26, 2237-2240 (2008), 査読有

⑤M. Murakami and T. Kouyama, Crystal structure of squid rhodopsin, *Nature* 453, 363-367 (2008), 査読有

⑥M. Murakami, R. Kitahara, T. Gotoh and T. Kouyama, Crystallization and crystal properties of squid rhodopsin, *Acta Cryst.* F63, 475-479 (2007), 査読有

[学会発表] (計24件)

①村上緑, 神山勉: 「イカロドプシン光反応初期中間体の構造解析」、第4回日本生物物理学会中部支部討論会、名古屋、2009年3月31日

②村上緑：「イカロドプシン光異性化反応の構造解析」、シンポジウム：名大の生物物理の生誕 50 周年、名古屋、2009 年 3 月 26 日

③山本昌孝、村上緑、神山勉：「バクテリオロドプシンのアルカリ pH での光誘起構造変化」、日本生物物理学会第 46 回年会、福岡、2008 年 12 月 3-5 日

④村上緑、神山勉：「イカロドプシンの X 線結晶構造解析」、日本生物物理学会第 46 回年会、福岡、2008 年 12 月 3-5 日

⑤M. Murakami, "X-ray structure of squid rhodopsin", International symposium on membrane proteins and high resolution X-ray structural analysis, Hyogo, 2008 September 1

⑥T. Kouyama, M. Murakami, K. Yoshimura and M. Yamamoto, "Crystallization of visual pigments and archaeal rhodopsins", XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Osaka, 2008 August 23-31

⑦M. Murakami and T. Kouyama, "Dimeric structure of squid rhodopsin", 13th International conference of retinal proteins, Barcelona, 2008 June 15-19

⑧ T. Kouyama, M. Murakami and K. Yoshimura, "Protein-lipid interactions in 3D crystals of squid rhodopsin and archaeal rhodopsins", 13th International conference of retinal proteins, Barcelona, 2008 June 15-19

⑨村上緑、神山勉：「スルメイカロドプシンの X 線結晶構造解析」、第 8 回日本蛋白質科学会年会、東京、2008 年 6 月 10-12 日

⑩M. Murakami, "Crystal Structure of Squid Rhodopsin", Gordon Research Conference on "LIGAND RECOGNITION & MOLECULAR GATING", Ventura, CA, 2008 March 2-7

⑪ T. Kouyama and M. Murakami, "Crystal Structure of Squid Rhodopsin at 2.5 Å resolution", GPCR symposium - Frontier on Integral Membrane Proteins in Crystal Structure Determination -, Hyogo, 2008 February 26

⑫早川直紀、村上緑、神山勉：「バクテリオロドプシンの疎水キャビティに結合する希

ガスとその効果」、日本生物物理学会第 45 回年会、横浜、2007 年 12 月 21-23 日

⑬山本昌孝、早川直紀、村上緑、神山勉：「バクテリオロドプシン 3 次元結晶の M 中間体寿命に及ぼす格子力の影響」、日本生物物理学会第 45 回年会、横浜、2007 年 12 月 21-23 日

⑭村上緑、神山勉：「スルメイカロドプシンの X 線結晶構造解析」、日本生物物理学会第 45 回年会、横浜、2007 年 12 月 21-23 日

⑮藤井隆道、吉村恵子、村上緑、神山勉：「アーキロドプシン-2 の M 中間体の X 線構造解析」、日本生物物理学会第 45 回年会、横浜、2007 年 12 月 21-23 日

⑯村上緑、神山勉：「イカロドプシンの結晶構造」、日本結晶学会 2007 年度年会、東京、2007 年 12 月 21-23 日

⑰早川直紀、笠原隆史、長谷川大祐、村上緑、神山勉：「バクテリオロドプシンの光反応サイクルに及ぼす Xe ガスの影響」、日本結晶学会 2007 年度年会、東京、2007 年 12 月 21-23 日

⑱山本昌孝、早川直紀、村上緑、神山勉：「バクテリオロドプシンの光誘起構造変化に及ぼす結晶格子力の影響」、日本結晶学会 2007 年度年会、東京、2007 年 12 月 21-23 日

⑲N. Hayakawa, M. Murakami, T. Kasahara, D. Hasegawa and T. Kouyama, "Binding of xenon to a hydrophobic cavity in the cytoplasmic half of bacteriorhodopsin & its effect to the absorption kinetics", Nagoya International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems, Nagoya, 2007 November 30 - December 1

⑳M. Yamamoto, N. Hayakawa, M. Murakami and T. Kouyama, "Decay kinetics of the M intermediate of bR in 3D crystals: Influence of the crystal lattice force", Nagoya International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems, Nagoya, 2007 November 30 - December 1

㉑M. Murakami and T. Kouyama, "Crystal Structure of Squid Rhodopsin", International Symposium on RETINAL PROTEINS: EXPERIMENTS AND THEORY, Bremen, Germany, 2007 September 23-26

②N. Hayakawa, M. Murakami, T. Kasahara, D. Hasegawa and T. Kouyama, "Binding of Noble Gases to a Hydrophobic Cavity in the Cytoplasmic Half of Bacteriorhodopsin", 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, Tokyo, 2007 September 10-13

③ M. Murakami and T. Kouyama, "X-ray crystallographic study of squid rhodopsin", 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, Tokyo, 2007 September 10-13

④M. Yamamoto, N. Hayakawa, M. Murakami and T. Kouyama, "Decay kinetics of the M intermediate of bR in 3D crystals: Influence of the crystal lattice force", 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, Tokyo, 2007 September 10-13

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: イカロドプシン複合体結晶及びその製造方法

発明者: 神山勉、村上緑

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願2008-58864

出願年月日: 2008年3月9日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 緑 (Midori Murakami)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 20324387