

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770130
 研究課題名(和文) 光受容体ロドプシンを用いたG蛋白質共役型受容体の多量体形成の機能的意義
 研究課題名(英文) Functional analysis of dimer formation of G protein-coupled receptors, rhodopsin
 研究代表者
 山下 高廣 (YAMASHITA TAKAHIRO)
 京都大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号：50378535

研究成果の概要：近年、多くのGタンパク質共役型受容体において多量体を形成することが報告されているが、その機能的意義について明らかになっている例は少ない。そこで、二量体形成がGタンパク質活性化制御を行っているのか検討するため、ロドプシンと代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)を用いて2分子間の構造変化伝搬とそこに関わる構造変化について解析した。その結果、ロドプシンでは構造変化伝搬は見られなかったが、mGluRでは観測できた。さらに、mGluRの1分子内構造変化、2分子間構造変化伝搬に関わる可能性のある残基を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

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：光生物、細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞外からの刺激を細胞内へ伝達する重要な膜タンパク質である。ヒトゲノム上にも1,000種類程度存在し、そのアミノ酸配列からいくつかのグループに分類できる。これらGPCRが刺激受容後にどのように構造変化し後続のGタンパク質を活性化するののかについては多くの報告がある。研究代表者もこれまでに、多様なGPCRの構造変化を比較し、共通点と相違点を明らかにすることを行ってきた。しかし、これらの研究の大半が

GPCRの機能単位を単量体として考えている。近年、これまで単量体で機能すると考えられていたロドプシンを含むいくつかのGPCRにおいて多量体を形成していることが報告され、ホットトピックの一つになっている。ただ、GPCRの機能発現における多量体化の重要性について明らかになっている例はまだわずかにすぎない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ロドプシンをモデルに

用いて、二量体化が刺激受容からG蛋白質活性化に至る機能発現メカニズムに果たす役割を明らかにすることを目的とする。さらに、ファミリー3のmGluRについても二量体を形成すると報告があるので同様の解析を進めロドプシンと比較することにより、GPCRの多量体化の意義の一般性を明らかにすることを旨とする。具体的には、二量体を形成するこれらの受容体において、1分子が受容するシグナルをもう一方の分子に伝達し、その分子のシグナル受容能やG蛋白質活性化能をコントロールするのかを検討する。さらに、そのような伝達が起こる際に必要な構造変化はどのようなものか、1分子内での構造変化と2分子間での構造変化はどのような連関があるのかを明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 光受容タンパク質ロドプシンにおいて、二量体を形成した際に、一方の分子への光受容がもう一方の分子の構造変化を誘起してGタンパク質を活性化できるのか検討する。そのために、ロドプシンの発色団レチナル近傍に位置するアミノ酸残基に変異を施し、野性型から吸収極大波長を長波長側・短波長側にずらした変異体を作製し、培養細胞において共発現させる。そして、このヘテロ二量体に対して一方だけを選択的に光刺激し構造変化を誘起した後、残りの分子の細胞質側でGタンパク質を活性化できるか検討する。構造変化伝搬が観測された場合には、これまでの報告で二量体のインターフェースであると思われる膜貫通領域に変異を施し、2分子間での構造変化伝搬が阻害されるかを検討し、重要なアミノ酸残基を探索する。

(2) mGluRにおいても、二量体形成時に一方の分子への刺激によってもう一方の分子の構造変化を誘起し、Gタンパク質を活性化できるのか検討する。そのために、リガンド結合能を失わせた変異体やGタンパク質活性化能を亢進させたり失わせたりした変異体を組み合わせる。さらに、二量体を形成する各分子内での構造変化と2分子間での構造変化伝搬との連関について検討するため、1分子内での構造変化に関わるアミノ酸残基、二量体の形成面に関わるアミノ酸残基をそれぞれ探索する。

4. 研究成果

(1) ロドプシン (500nm に吸収極大) に少数の変異を施し吸収極大波長を約 450nm に短波長シフトさせた変異体A、約 515nm に長波長シフトさせた変異体Bを作製し、共発現した。そして、長波長側の光を照射することにより、

変異体Bのみを選択的に光刺激した。受容体を発現させた培養細胞の形質膜試料及びそこから界面活性剤により受容体を精製した試料を用いてGタンパク質の活性化能の測定を行ったところ、変異体Aに由来する活性化のシグナルは有意に認められなかった。この結果は、一方の分子の構造変化によってもう一方の分子の細胞質側を活性状態に誘起できないことを示しており、ロドプシンにおいては二分子間での構造変化の伝搬はほとんど起こっていないと考えられた。

(2) mGluR において、リガンド結合能を失わせた変異体AとGタンパク質活性化能を失わせた変異体Bを作製し、共発現した。そして、アゴニスト刺激によりGタンパク質の活性化能が認められるか検討したところ、有意な活性化を観測できた。これは、アゴニストが変異体Bに結合し構造変化を誘起した後、変異体Aに伝搬されてその細胞質側においてGタンパク質を活性化したと考えられた。さらに、mGluR 二量体のそれぞれの分子内および二分子間での構造変化について解析をするため、膜貫通領域に網羅的に変異を導入し活性化能を比較した。その結果、1アミノ酸の置換によって、アゴニスト刺激をしなくてもGタンパク質を活性化する変異体(構成的活性化変異体)が形成される部位を複数同定した。そしてこれらの中の2残基が、1分子内で相互作用をし、受容体の活性・不活性状態の遷移を制御していることがわかった。また、別の1残基は二量体のインターフェースに関わる可能性が考えられた。今後、これらの残基の関わりを中心に、1分子内での構造変化と2分子間での構造変化伝搬との関連について検討する必要がある。

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. Morizumi, T., Kimata, N., Terakita, A., Imamoto, Y., Yamashita, T., Shichida, Y. (2009) G Protein subtype specificity of rhodopsin intermediates metarhodopsin Ib and metarhodopsin II. *Photochem. Photobiol.* 85, 57-62. (査読有)
2. Yamashita, T., Terakita, A., Kai, T., Shichida, Y. (2008) Conformational change of the transmembrane helices II and IV of metabotropic glutamate receptor involved in G protein activation. *J. Neurochem.* 106, 850-859. (査読有)
3. Yamashita, T., Tose, K., Shichida, Y.

- (2008) First cytoplasmic loop of glucagon-like peptide-1 receptor can function at the third cytoplasmic loop position of rhodopsin. *Photochem. Photobiol.* 84, 931-936. (査読有)
4. Terakita, A., Tsukamoto, H., Koyanagi, M., Sugahara, M., Yamashita, T., Shichida, Y. (2008) Expression and comparative characterization of Gq-coupled invertebrate visual pigments and melanopsin. *J. Neurochem.* 105, 883-890. (査読有)
 5. 山下高廣 (2008) 「代謝型グルタミン酸受容体の細胞質領域の構造変化」 *生物物理* 6, 338-339. (査読有)
 6. 山下高廣、七田芳則 (2008) 「視覚の光受容蛋白質ロドプシンの機能多様性」 *メディカルバイオ* 1月号 74-81. (査読無)

[学会発表] (計23件)

1. 山下高廣 「長波長感受性視物質における塩化物イオン依存的波長シフトメカニズム」 特定領域「細胞感覚」若手の会、2008/12/16、蒲郡
2. 山下高廣 「代謝型グルタミン酸受容体の膜貫通領域における構造変化解析」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/4、福岡
3. 筒井圭、今井啓雄、山下高廣、七田芳則 「脊椎動物の紫外光感受性視物質における高効率な光異性化の機構」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/4、福岡
4. 松山武オジョス、今井啓雄、山下高廣、七田芳則 「活性状態の生成におけるロドプシンとレチナルの共有結合の役割」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/4、福岡
5. 柳川正隆、山下高廣、七田芳則 「代謝型グルタミン酸受容体の活性に寄与する膜貫通領域における二量体インターフェース領域の探索」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/3、福岡
6. 中妻亜弥、川鍋陽、古谷祐詞、山下高廣、七田芳則、神取秀樹 「ppRにウシロドプシンの第3ループを組み込んだキメラタンパク質の研究」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/3、福岡
7. 佐藤恵太、森住威文、山下高廣、七田芳則 「活性中間体のpH依存的平衡に着目したロドプシンの活性化機構の解析」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/3、福岡
8. 関一郎太、今元泰、山下高廣、七田芳則 「錐体視物質のトランスデューシン活性化効率の解析」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/3、福岡
9. 酒井佳寿美、今元泰、山下高廣、塚本寿夫、寺北明久、Su C.Y., Yau K.W., 七田芳則 「パリエトプシンの光反応」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/3、福岡
10. 木股直規、山下高廣、森住威文、寺北明久、今元泰、七田芳則 「Gタンパク質 α サブユニットC末端部位におけるロドプシン中間体との結合および活性化制御部位の分離」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/3、福岡
11. 藤田彩理、山下高廣、今元泰、小柳光正、寺北明久、七田芳則 「オールトランスレチナルを発色団にもつオプシン、ペロプシンとレチノクロムの光反応の比較」日本生物物理学会第46回年会、2008/12/3、福岡
12. 山下高廣、柳川正隆、七田芳則 「ロドプシンと代謝型グルタミン酸受容体の機能発現メカニズムの比較解析」日本動物学会第79回大会、2008/9/7、福岡
13. 筒井圭、山下高廣、七田芳則 「紫外光感受性視物質における高い光感受性の分子メカニズム」日本動物学会第79回大会、2008/9/7、福岡
14. 中村修平、山下高廣、筒井圭、森住威文、七田芳則 「長波長感受性錐体視物質における塩化物イオン依存的波長シフトに関する残基の同定」日本動物学会第79回大会、2008/9/7、福岡
15. Matsuyama, T., Imai, H., Yamashita, T., Shichida, Y. 「The role of the covalent bond between rhodopsin and its retinal-ligand」 13th International Conference on Retinal Proteins, 2008/6/16, Barcelona
16. 山下高廣 「代謝型グルタミン酸受容体の細胞質領域の構造変化解析」特定領域研究「G蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」合同ワークショップ、2008/1/26、箱根
17. 戸瀬浩仁、山下高廣、七田芳則 「ロドプシン細胞内第3ループと機能的に相同な、ファミリー2 Gタンパク質共役型受容体の細胞内ループの探索」日本生物物理学会第45回年会、2007/12/23、横浜
18. 山下高廣、柳川正隆、七田芳則 「代謝型グルタミン酸受容体のヘリックスII及びIVを介した分子内構造変化伝達」日本生物物理学会第45回年会、2007/12/22、横浜
19. 佐藤恵太、森住威文、山下高廣、七田芳則 「メタロドプシンIとIIにおけるpH依存性平衡状態の直接観測」日本生物物理学会第45回年会、2007/12/22、横浜
20. 木股直規、森住威文、山下高廣、寺北明久、今元泰、七田芳則 「メタロドプシンI b中間体におけるGタンパク質 α サブ

ユニットC末端との選択的相互作用の解析」日本生物物理学会第45回年会、2007/12/22、横浜

21. 柳川正隆、山下高廣、七田芳則「代謝型グルタミン酸受容体の活性を制御する膜貫通領域における残基間相互作用の探索」日本生物物理学会第45回年会、2007/12/22、横浜
22. 酒井佳寿美、今元泰、山下高廣、七田芳則「ロドプシンの細胞外第二ループの構造・機能解析のための変異体作製」日本生物物理学会第45回年会、2007/12/22、横浜
23. 中村修平、山下高廣、森住威文、七田芳則「塩素イオン結合サイトを持つマウスの緑色錐体視物質の構築」日本動物学会第78回大会、2007/9/20、弘前

〔図書〕(計1件)

1. 山下高廣、七田芳則(2009)「脊椎動物の視細胞が光を受ける仕組み」シリーズ「動物の多様な生き方」(共立出版)印刷中

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://photo1.biophys.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 高廣 (YAMASHITA TAKAHIRO)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：50378535

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし