

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370070

研究課題名(和文) 構造ダイナミクスに基づく G 蛋白質共役型受容体の活性化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Activation mechanisms of G-protein-coupled receptors based on the structural dynamics

研究代表者

今元 泰 (Imamoto, Yasushi)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80263200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,700,000 円、(間接経費) 4,710,000 円

研究成果の概要(和文)：G蛋白質共役型受容体の活性化過程を、ロドプシンをモデルとして構造ダイナミクスの観点から解析した。高角X線溶液散乱、一分子蛍光計測、フーリエ変換赤外分光を用いて、活性状態の構造や平衡がリガンドの状態によってどのように変化するかを調べた。その結果、G蛋白質共役型受容体は、活性構造と不活性構造の間の平衡となっており、インバースアゴニストは不活性構造に、アゴニストは活性構造に平衡をシフトさせることで、活性を調整していることが示された。

研究成果の概要(英文)：The activation process of G protein-coupled receptors was investigated based on the structural dynamics using rhodopsin. The effect of the ligand on the structure and equilibrium of the active state was analyzed by high-angle solution X-ray scattering, single-molecule fluorometry, and Fourier-transform infrared spectroscopy. Our results demonstrated that G protein-coupled receptors are in the equilibrium between active and inactive conformations, and the inverse-agonist and agonist bias the equilibrium toward inactive and active conformations, respectively, to regulate the activity.

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：平衡 一分子計測 X線高角散乱 赤外分光 構造変化 アゴニスト 構成的活性変異

## 1. 研究開始当初の背景

細胞はさまざまな情報を外界から取り入れ、適切に応答しなければ正常に機能することができない。刺激は細胞表面にある受容体蛋白質で受容され、細胞内にシグナルが伝えられるので、受容体蛋白質による変換機構を明らかにすることができれば、不要な情報を効率よく遮断する阻害剤の開発や、細胞の活性化を促す薬剤の開発が可能となり、製薬分野での応用が期待される。

細胞表面受容体の中で、G蛋白質を活性化することで刺激を細胞内に伝えるものはG蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) と呼ばれ、細胞表面受容体の中でも最大のファミリーを形成する重要な蛋白質群である。視覚の光受容蛋白質・ロドプシンや $\beta$ アドレナリン受容体の結晶構造解析で示されたように、GPCRは7つの膜貫通ヘリックスをもつ共通の構造をもっている。また、G蛋白質と相互作用する活性状態の結晶構造解析から、刺激を受けたGPCRでは、膜貫通領域でヘリックスの配置が変化し、G蛋白質のC末端部位と相互作用する部位が開放されることでG蛋白質を活性化すると考えられている。

ロドプシンは発色団として11シス型レチナールと結合している。11シス型レチナールはインバースアゴニストとして機能し、暗状態でのG蛋白質活性化能を低く抑えている。光を吸収すると発色団は全トランス型レチナール (アゴニスト) に変化する。その後、いくつかの退色中間体をへて、メタロドプシンII (メタII) と呼ばれる中間体に変化し、視細胞のG蛋白質であるトランスデュシンを活性化する。メタIIの発色団は加水分解して解離し、活性をもたないアポ蛋白質 (オプシン) に変化する。また、メタIIはその前駆体のメタロドプシンI (メタI) と熱平衡にあり、この平衡が活性構造を獲得する上で重要であると考えられている。

GPCRの最近の研究により、リガンドが結合していなくてもG蛋白質を活性化する構成的活性変異体が多数報告されてきた。また、桿体視細胞が1個の光子でも検出できるように、ロドプシンでは暗ノイズの原因となる暗状態でのG蛋白質活性化能がきわめて低く抑えられているが、ロドプシンと錐体視物質では発色団は共通であるのにも関わらず、暗ノイズのレベルに大きな違いがある。以上の知見は、発色団の変化 (振れの緩和やプロトン化状態の変化) に追従して蛋白質部分の構造変化が順次起こり、最終的に活性構造を獲得するという、従来考えられてきたInduced-fitモデルよりも、ロドプシンの蛋白質構造はもともと潜在的に活性構造をとり得るが、アゴニストやインバースアゴニストの作用によって活性構造と不活性構造の平衡がシフトするというPre-existingモデルの方が、現象をよく説明できると考えられた。この仮説を

検証するためには、結晶構造解析によって活性状態と不活性状態の構造を明らかにするだけでなく、これらの構造間のダイナミクスに着目した解析が必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ロドプシンの活性化機構を活性構造と不活性構造の間の構造平衡に着目して解析することを目的として以下の研究を行った。

(1) ロドプシンが活性構造に変化すると、ヘリックスの再配置が起こると考えられている。そこで、ヘリックス間の距離情報が得られる高角X線溶液散乱法によって生理的条件における構造変化を観測することを試みた。また、X線結晶構造解析で示された構造変化が生理的条件でも起きているかどうかを確認した。

(2) ロドプシンの活性構造と不活性構造の変換を一分子計測で直接観測することで、平衡のダイナミクスを明らかにすることを試みた。活性構造に変化することによって蛍光強度が増加する蛍光ラベルの蛍光強度を一分子計測し、強度変化を統計的に処理してバルク測定の結果と比較した。

(3) システインのSH伸縮振動をプローブとして、構造変化を誘起する分子内相互作用の変化を観測する手法を開発した。さらに、システインを系統的に導入することで変化部位をスキャンすることを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 水溶性蛋白質に対するX線溶液散乱測定法は確立しているが、膜蛋白質では界面活性剤の存在により精度よい測定が困難であった。そこで、ウシロドプシンを水溶性の膜細片であるナノディスクに組み込んで測定に用いた。暗状態とメタII、および暗状態とオプシンの散乱強度の変化を $Q=0.1 \sim 1 \text{ \AA}^{-1}$  ( $d=60 \sim 6 \text{ \AA}$ ) の範囲で測定するため、試料と検出器の距離を540 mmとした。結晶構造から計算された散乱カーブと比較し、溶液中の構造変化と結晶中の構造が同じかどうかを検討した。なお、実験はSPring-8のビームラインBL40B2で行った。

(2) 構造変化を一分子レベルで解析するため、ロドプシンの細胞質側にあるCys316を蛍光色素Alexa594でラベルした。Alexa594の蛍光強度は、メタIIの生成にともなって増加するので、一分子蛍光測定で構造変化を観測できると期待された。Alexa594の蛍光が分散した輝点となるよう、試料を十分に希釈

してガラス基板に吸着させ、全反射型蛍光顕微鏡を用いて50ミリ秒間隔で画像を取得した。各輝点の蛍光強度を画像ごとに計算し、時間に対してプロットすることで、輝点の蛍光強度の時間変化を求めた。蛍光強度が強い状態 ( $F_{\text{high}}$ )、蛍光強度が弱い状態 ( $F_{\text{low}}$ )、およびAlexa594が退色して蛍光が観測されない状態が主に見られたので、 $F_{\text{high}}$ と $F_{\text{low}}$ の変換頻度を熱変性試料と比較し、構造変化に由来するかどうかを検証した。また、 $F_{\text{high}}$ と $F_{\text{low}}$ の滞留時間から平衡における $F_{\text{high}}$ と $F_{\text{low}}$ の量比を求めた。

(3) システインのSH伸縮振動モードをプローブとして、分子内環境の変化を調べた。まず、天然のウシロドプシンに存在するシステインに由来するSH伸縮振動モードを同定するため、これらをセリンに置換した変異体を作成した (C140S、C167S、C185S、C222S、C264S、C316S)。また、構造変化に重要と考えられているヘリックスIII周辺の環境変化をスキャンするため、ヘリックスIIIにシステインを系統的に導入した (A117C、T118C、E122C、I123C、A124C、L125C、W126C、S127C、L128C、V129C、V130C、L131C、A132C、I133C、E134C)。これらをフォスファチジルコリンのリポソームに組み込み、水和フィルムとして測定に用いた。バソロドプシンは80K、メタIIaは280Kで試料を光照射して生成させた。光照射前後のSH伸縮振動モードの変化は、フーリエ変換赤外分光法を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) X線溶液散乱法は、X線結晶構造解析法と比べて分解能は低いが、水溶液という生理的状態での構造情報を得られることから、X線結晶構造解析を補完する方法として広く用いられている。水溶性蛋白質への応用は確立しているが、膜蛋白質試料では界面活性剤ミセルによってX線が散乱されることや、疎水的な凝集によって単分散しにくいことなど、技術的な問題が多く存在する。そこで本研究では、水溶性の膜細片であるナノディスクにロドプシンを組み込むことで、膜蛋白質のX線溶液散乱を精度よく測定することを試みた。

ロドプシンが活性構造に変化すると、ヘリックスの再配置が起こると考えられている。ヘリックス間の距離情報は、 $Q=0.1\sim 1\text{Å}^{-1}$  ( $d=60\sim 6\text{Å}$ ) 程度の領域にあらわれると期待される。しかし、この領域の散乱強度は、通常のX線小角散乱法で測定する原点付近の散乱強度より数桁弱い。そこで、強いX線源を使用するため、SPring-8のビームラインBL40B2で測定した。また、この領域の散乱パターンを精度よく測定するため、試料と検出器の距離を通常よりも短くした (540

mm)。ロドプシンを反応させるため、試料を可視光照射した。その前後にX線散乱パターンを測定し、照射による散乱強度の変化を計算した。pH 6.0の試料を用いて暗状態とメタII、ヒドロキシルアミンを添加した試料を用いて暗状態とオプシンの散乱変化を測定した。

暗状態からオプシンへの変化では、 $0.2\sim 1.0\text{Å}^{-1}$ の領域で散乱強度の変化は観測されなかった。そのため、オプシンのヘリックス配置は暗状態とほぼ同じであると推測された。一方、暗状態からメタIIへの変化では、 $0.2\text{Å}^{-1}$ 付近にシャープな増加、 $0.6\text{Å}^{-1}$ 付近にブロードな減少が見られ、大きな構造変化が起こっていることが確認された。

メタIIの結晶構造が報告されているので、生理的条件の構造変化が結晶中の構造変化と同じかどうかを検証した。解析プログラム・CrySolを用いて、暗状態、メタII、オプシンの結晶構造から予測される散乱変化を計算し、今回得られた変化と比較した。その結果、暗状態とメタIIの散乱変化は溶液中と結晶中でよく一致し、生理的条件下で生成するメタIIの構造は、結晶構造と同じであると考えられた。一方、結晶中のオプシンは、メタIIとほぼ同じ構造となっており、暗状態とオプシンのヘリックス配置はほぼ同じであるというわれわれの結果とは一致しなかった。これは、オプシンの構造アンサンブルの中にメタIIと同様の活性構造が含まれており、それが他の状態よりも安定であるために選択的に結晶化したためであると推測された。

(2) 活性構造と不活性構造の間のダイナミクスを、細胞質側に結合させた蛍光ラベル・Alexa594に対する一分子蛍光計測で観測した。Cys316に結合したAlexa594の蛍光強度は、メタIIの生成にともなって20~30%増加する。そこで、メタIとメタIIの平衡混合物に対して一分子蛍光観測を試みたところ、Alexa594分子がデジタルな蛍光増減を示すことを見いだした (図1)。この蛍光増減の強度変化は約20%であり、バルク測定でメタIIが生成したときの蛍光強度の増加と一致することから、蛍光強度が強い状態 ( $F_{\text{high}}$ ) が活性構造、弱い状態 ( $F_{\text{low}}$ ) が不活性構造に対応すると考えられた。

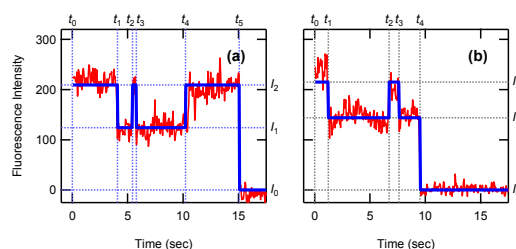


図1: ロドプシン活性化の一分子蛍光計測の例。

メタIとメタIIの平衡混合物での蛍光増減の頻度は、熱変性試料の蛍光増減の頻度 (ノイ

ズ成分) よりも十分に大きいことから、構造変化に由来することを確認した。

次に、 $F_{high}$ と $F_{low}$ の滞留時間から $F_{high}$ と $F_{low}$ のpH平衡を解析した。 $F_{high}$ と $F_{low}$ は、それぞれ活性構造と不活性構造に対応すると考えられたが、 $F_{high}$ と $F_{low}$ のpH平衡は紫外可視分光から見積もったメタIとメタIIの平衡とは有意なずれがあった。このことから、メタIとメタIIは均一に $F_{low}$ あるいは $F_{high}$ になっているのではなく、 $F_{high}$ と $F_{low}$ の平衡にあると考えられた(図2)。発色団のシッフ塩基結合は、メタIからメタIIへの過程で脱プロトン化し、大きな構造変化の原因となると考えられている。今回の結果は、発色団の状態変化によって一方向的に構造変化が起こるのではなく、もともとある活性構造と不活性構造の平衡がシフトすることで、活性構造の割合が増加することを示唆している(図2)。

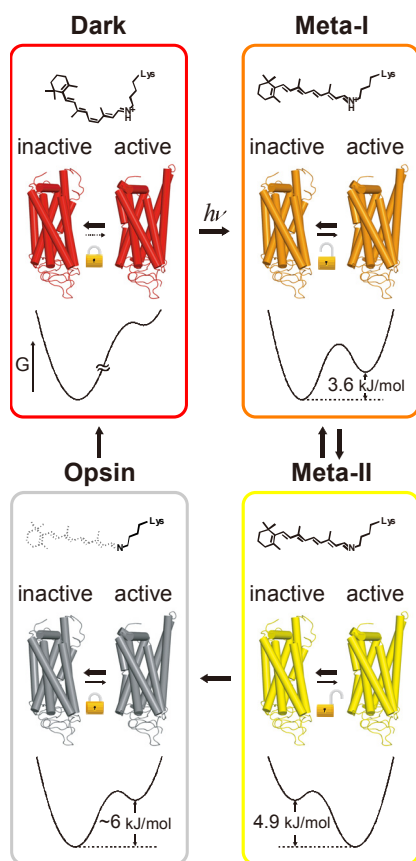


図2：構造ダイナミクスに基づいたロドプシンの活性化機構。活性状態 (Meta-II) だけでなく、その前駆体 (Meta-I) やリガンドを含まない状態 (Opsin) でも活性構造と不活性構造の間の平衡が見られた。また、暗状態 (Dark) では、活性構造への変換がほとんど見られなかった。

このことを検証するため、暗状態とオプシンの一分子計測を試みた。これらの状態では蛍光増減の頻度が低かったため、ノイズ成分と分離して滞留時間から平衡定数を求めることが困難であった。そこで、各状態で活性構造と不活性構造の間で構造変化が生じる頻度を解析した。その結果、オプシンでは熱変

性試料と比べて有意に高い頻度で構造変化が生じることが分かったが、暗状態では有意差はなかった。さらに、各状態のG蛋白質活性化能を生化学的に測定したところ、構造変化の生じる頻度とG蛋白質活性化能に相関が見られた。これらの結果から、ロドプシン分子は常に活性構造と不活性構造の間の平衡にあり、その構造平衡がリガンドである発色団の状態に応じてシフトすることで活性を調節していると考えられた(図2)。

さらに、リガンドに依存せずにG蛋白質を活性化する構成的活性化変異体 (CAM) に着目した。ロドプシンの代表的なCAMであるM257Yは、オプシン状態において野生型よりも高いG蛋白質活性化能を示す。一分子蛍光計測によりM257Yの構造変化を観測したところ、M257Yオプシンでは野生型オプシンに比べて有意に高い頻度で構造変化が生じていることが分かった。この結果から、CAMでは高頻度な構造変化が生じており、それが高いG蛋白質活性化能につながると考えられた。

(3) 蛋白質の高次構造は、アミノ酸側鎖間の水素結合など、分子内相互作用によって維持されている。そのため、蛋白質の高次構造に変化が現れるときには、このような分子内相互作用の組み換えが起こっていると考えられる。そこで、分子内相互作用の変化をモニターする方法として、以下のようにシステインスキャン法を開発した。

メタIIで生じる大きな構造変化によって、ヘリックスIIIとVIの距離が離れることが知られている。また、ヘリックスIIIにはカウンターイオンやERY配列など、ロドプシンの構造や機能に重要なアミノ酸残基が含まれている。そこでヘリックスIIIにシステイン残基を系統的に導入し、ヘリックスIII周辺の環境変化を調べた。また、天然ロドプシンに元からあるシステインはセリンに変異させることにより、これらに由来するSH伸縮振動を同定した。

まず、初期中間体であるバソロドプシンの生成時に、SH伸縮振動の変化が観測されるかどうかをフーリエ変換赤外分光法で確認した。その結果、今回測定した中で117、118、122の3つの部位でのみSH伸縮振動の変化が見られた。バソロドプシンと暗状態の結晶構造を比較すると、117、118、122の部位は発色団と直接相互作用しており、バソロドプシンで発色団との距離が変化する部位であることがわかる。一方、他の部位は相互作用が変化していないと考えられるが、これらの部位のSH伸縮振動には変化が見られなかった。以上のことから、システインのSH伸縮振動を用いた解析は、環境変化を正確に反映していることが確認された。

次に、ヘリックスの再配置を含む大きな構造変化が起こるメカニズムを調べるため、システインスキャンを適用した。メタIIが生成

するとき大きな構造変化が起こるが、メタIIの生成過程の詳細な解析から、メタIIには少なくともメタIIa、メタIIb、メタIIbH<sup>+</sup>の3状態があると考えられている。このうち、メタIIaの構造は暗状態に近いと考えられているので、構造変化はメタIIaからメタIIbへの過程で起こると考えられる。そこで、ヘリックス再配置の直前の状態であるメタIIaの分子内相互作用をシステインスキャンによって解析した。

メタIIaでは、バソロドプシンよりも広範囲でSH伸縮振動の変化が見られた。そこで、メタIIaの生成にともなってSH伸縮振動の波数がシフトするような大きな環境変化が見られた部位、波数はほとんど変化しないが強度が変化する部位、および変化が見られなかった部位に分類し、結晶構造上にマッピングした(図3)。その結果、環境が変化する部位はAla164、His211、Phe261の周辺に局在していることがわかった。これらの残基を含む分子内相互作用が、活性構造と不活性構造の間の構造平衡を制御していると考えられる。

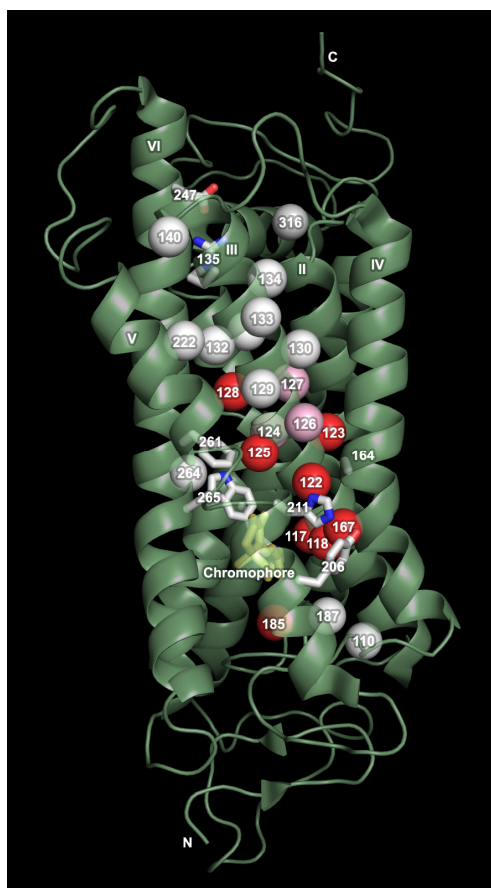


図3：メタIIaで環境が変化する部位。メタIIaの生成にともなってSH伸縮振動の波数シフトがみられた部位を赤、波数変化はなく強度変化のみがみられた部位をピンク、変化が見られなかった部位を白で示した。

(4) (4) 本研究によって、リガンドによる活性構造と不活性構造の構造平衡シフトという観点からGPCRの活性制御メカニズムを理解

することが可能となった。この考え方は、ロドプシンの構成的活性にも拡張できたため、従来の二状態モデルの概念を実証したといえる。今後は錐体視物質や非視覚オプシン類など、ロドプシンとは機能が異なるオプシン類の活性化機構にも拡張し、一般性を検証する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

- ① Kimata, N., Yamashita, T., Matsuyama, T., Imamoto, Y., and Shichida, Y. (2012) The C-terminus of the G protein  $\alpha$  subunit controls the affinity of nucleotides. *Biochemistry* **51** (13), 2768-2774 (査読有)  
DOI: 10.1021/bi201702d
- ② Sato, K., Yamashita, T., Imamoto, Y., and Shichida, Y. (2012) Comparative studies on the late bleaching processes of four kinds of cone visual pigments and rod visual pigment. *Biochemistry* **51** (21), 4300-4308 (査読有)  
DOI: 10.1021/bi3000885
- ③ Imamoto, Y., Seki, I., Yamashita, T., and Shichida, Y. (2013) Efficiencies of activation of transducin by cone and rod visual pigments. *Biochemistry* **52** (17), 3010-3018 (査読有)  
DOI: 10.1021/bi3015967
- ④ Yamazaki, Y., Nagata, T., Terakita, A., Kandori, H., Shichida, Y., and Imamoto, Y. (2014) Mapping of the local environmental changes in proteins by cysteine scanning. *Biophysics* **10**, 1-7 (査読有)  
DOI: 10.2142/biophysics.10.1
- ⑤ Maeda, R., Hiroshima, M., Yamashita, T., Wada, A., Nishimura, S., Sako, Y., Shichida, Y., and Imamoto, Y. (2014) Ligand-induced population shift leads to the activation of rhodopsin, a G-protein coupled receptor. *Biophys. J.* **106** (4), 915-924 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.bpj.2014.01.020
- ⑥ Kojima, K., Imamoto, Y., Maeda, R., Yamashita, T., and Shichida, Y. (2014) Rod visual pigment optimizes active state to achieve efficient G protein activation as compared to cone visual pigments. *J. Biol. Chem.* **289** (8), 5061-5073 (査読有)  
DOI: 10.1074/jbc.M113.508507
- ⑦ Yamazaki, Y., Nagata, T., Terakita, A., Kandori, H., Shichida, Y., and Imamoto, Y. (2014) Intramolecular interactions that induce helical rearrangement upon rhodopsin activation: Light-induced structural changes in metarhodopsin IIa probed by cysteine S-H stretching vibrations. *J. Biol. Chem.* **289** (20), 13792-13800 (査読有)  
DOI: 10.1074/jbc.M113.527606

[学会発表] (計 11 件)

- ① Imamoto, Y. "Activation mechanism of visual transduction studied by fluorescence spectroscopy", Symposium "Chemical Approaches to Photobiology" in 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, Nara Prefectural New Public Hall, Nara, Japan, July 30, 2011.
- ② 今元 泰 「ロドプシン活性化の一分子計測」第 49 回日本生物物理学会年会シンポジウム「膜タンパク質の構造変化を研究するための新しい実験ツール」、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、2011 年 9 月 17 日
- ③ Imamoto, Y., Yamazaki, Y., Nagata, T., Terakita, A., Kandori, H., and Shichida, Y. "Light-induced structural changes of rhodopsin probed by cysteine S-H stretching vibrations." 15th International Conference on Retinal Proteins, Monte Verità, Ascona, Switzerland, October 1, 2012.
- ④ Imamoto, Y., Kojima, K., Maeda, R., Oka, T., Yamashita, T., and Shichida, Y. "Characterization of visual pigments in membrane environment using nanodiscs." The 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology, Novotel Sydney Central, Sydney, Australia, November 11, 2013.
- ⑤ 今元 泰、前田 亮、廣島通夫、佐甲靖志、七田芳則 「構造ダイナミクスからみたロドプシンの活性化機構」分子研研究会「ロドプシン研究の故きを温めて新しきを知る」、自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター大会議室、2013 年 11 月 19 日

[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

今元 泰 (IMAMOTO, Yasushi)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：8 0 2 6 3 2 0 0

### (2) 研究分担者

七田 芳則 (SHICHIDA, Yoshinori)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：6 0 1 2 7 0 9 0

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：5 0 3 7 8 5 3 5

### (3) 連携研究者

佐甲 靖志 (SAKO, Yasushi)

理化学研究所・主任研究員

研究者番号：2 0 2 1 5 7 0 0

岡 俊彦 (OKA, Toshihiko)

静岡大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：6 0 3 4 4 3 8 9