

膜蛋白質の相互作用様式と遺伝子構造の比較研究

●今井 啓雄

京都大学大学院理学研究科

〈研究の目的と進め方〉

G蛋白質共役型受容体（GPCR）はポストゲノムの対象として注目を集めている膜蛋白質群である。部位特異的変異体などのよりその構造—機能相関が研究されてきたが、2000年に、この群に属する網膜の光受容蛋白質であるロドプシンのX線結晶構造が決定され、GPCRの研究も立体構造に基づく新たな段階に入った。本研究では、ロドプシン（明暗視に関わる光受容蛋白質）と、その相同蛋白質である錐体光受容蛋白質（昼間視、色覚に関与）の機能をアミノ酸残基のレベルで検討することにより、その機能発現メカニズムを検討し、構造—機能相関とその予測の手がかりを得ることを目指した。具体的には、光受容蛋白質単独の機能部位（発色団との相互作用による光吸収波長の制御、構造変化速度）、光受容蛋白質と相互作用するG蛋白質やリン酸化酵素との相互作用部位の同定などを通して、膜蛋白質の機能を制御するメカニズムを解明し、遺伝子構造との比較によりゲノム上のGPCRの機能について予測する基盤を作製することを目指した。

〈研究開始時の研究計画〉

ロドプシンの立体構造は研究開始時では解明されていなかったため、変異体を用いてそれぞれの蛋白質領域の位置関係を機能的な観点から解明しようと試みた。また、光受容蛋白質は内部の発色団を置換できるため、合成発色団との組み合わせも含めて機能解析を行う計画であった。

〈研究期間の成果〉

ロドプシンのX線結晶構造が解明されたとき、もっとも大きなトピックの一つは、発色団（リガンド）を包み隠すようにβシート構造を形成している第2細胞外ループの存在であった。実際我々の解析によると、この領域にはいくつかの機能性アミノ酸残基が存在し、光受容蛋白質の構造や性質を制御していることがわかった。例えば、赤色感受性錐体光受容蛋白質ではこの領域にCl⁻イオンが結合し、吸収波長を制御することにより赤色光を受容するメカニズムを提供している。我々は、このCl⁻イオンの結合機構について分光学的手法により構造解析を行い、発色団との相互作用機構、吸収波長の制御機構を解明することに成功した（論文2）。

また、この部位には錐体光受容蛋白質で高度に保存されているプロリン残基（P189）が存在する。部位特異的変異蛋白質を用いた実験から、この残基の置換により蛋白質の構造変化速度（中間体の生成・崩壊速度）が大きく変化することがわかった。具体的には、このプロリン残基の置換により錐体光受容蛋白質の反応速度が著しく減少することが判明し、昼間視という錐体の生理機能に大きく関わっているアミノ酸残基であることを見いだすことができた。また、その構造変化も赤外分光法により追跡することができた（論文1）。さらに、生体リズムに関わる蛋白質ピノプシンについてもこの部位に反応速度

を制御するアミノ酸残基が存在することを同定した（論文3）。

一方、これらの中間体の生成・崩壊に際して光受容蛋白質内部で発色団と蛋白質部分がどのような相互作用を行っているかを解明するため、発色団にフォトアフィニティーラベルを導入した変異蛋白質を用いて、分光学的・生化学的解析を行った。その結果、元々の状態では6番目の膜貫通領域に結合していた発色団の先端（βイオン環）部分はメタ中間体では4番目の膜貫通領域に存在するアミノ酸残基の近傍に移動することを見出した。この結果は、GPCRの中間体における発色団との相互作用部位を同定した最初の例として、発表することができた（論文4、5）。

〈国内外での成果の位置づけ〉

蛋白質の構造変化過程を可視化する先駆的研究として、これらの研究は引用件数も多く評価されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

発現蛋白質の調製が遅れ、蛋白質内の相互作用に留まり、蛋白質間の相互作用については十分な解析ができなかった。

〈今後の課題〉

機能的側面から研究を進めたため、中間体における機能部位の予測はできたが実際の立体構造上でどのような位置関係にあるのか、今後の立証が待たれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. H. Imai, T. Hirano, H. Kandori, A. Terakita, and Y. Shichida. Difference in Molecular Structure of Rod and Cone Visual Pigments Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry* 40, 2879-2886 (2001).
2. T. Hirano, H. Imai, H. Kandori and Y. Shichida. Chloride Effect on Iodopsin Studied by Low-Temperature Visible and Infrared Spectroscopies, *Biochemistry* 40, 1385-1392 (2001).
3. A. Nakamura, D. Kojima, T. Okano, H. Imai, A. Terakita, Y. Shichida and Y. Fukada. Regulatory Mechanism for the Stability of the Meta II Intermediate of Pinopsin. *J. Biochem (Tokyo)* 129, 327-332 (2001).
4. A. Wada, M. Tsutsumi, Y. Inatomi, H. Imai, Y. Shichida and M. Ito. Retinoids and related compounds. Part 26. Synthesis of (11Z)-8,18-propeno- and methano-retinals and conformational study of the rhodopsin chromophore. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2430-2439 (2001).
5. B. Borhan, M. L. Souto, H. Imai, Y. Shichida, and K. Nakanishi. Movement of Retinal Along the Visual Transduction Path. *Science* 288, 2209-2212 (2000).
6. H. Imai, A. Terakita and Y. Shichida. Analysis of Amino

- Acid Residues in Rhodopsin and Cone Visual Pigments that Determine their Molecular Properties. (in *Methods in Enzymology* 315, pp293-312), Academic Press (2000).
7. Y. Shichida, S. Tachibanaki, H. Imai and A. Terakita. Heterogeneity of Rhodopsin Intermediate State Interacting with Transducin. (in *Methods in Enzymology* 315, pp347-363), Academic Press(2000).