

学位申請論文要約

ロドプシンをモデルとした G タンパク質共役型受容体の構造平衡シフトの一分子観測

前田 亮

背景・目的

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は生体内に広く存在するタンパク質ファミリーで、これまで 1000 以上が同定されている。GPCR は 7 本膜貫通ヘリックスからなる共通の構造をもち、外部から刺激を受け G タンパク質を活性化する。GPCR はこれまで活性構造や不活性構造、また G タンパク質との複合体の結晶構造が解かれてきたが、これらはある条件下における安定状態を反映している。そのため、GPCR の活性化メカニズムを詳細に理解するには、構造変化を動的に捉えることが必要であった。そこで本研究では、各タンパク質分子の状態を区別して観察するため、全反射蛍光顕微鏡を用いた一分子計測法に着目した。そして、ロドプシンをモデルとして GPCR の活性化メカニズムを構造ダイナミクスという観点から理解することを目指した。

ロドプシンは脊椎動物網膜の桿体視細胞に局在する光受容タンパク質であり、アポタンパク質オプシンに発色団である 11 シス型レチナールが結合した構造を有する。11 シス型レチナールは暗状態においてインバースアゴニストとして働き、活性が非常に低く抑えられている。光を受容するとレチナールは全トランス型へ異性化し、複数の中間体を経た後、不活性中間体メタ I と活性中間体メタ II の熱平衡状態に達する。その後、レチナールが解離しオプシンが生成する。本研究では、これらロドプシンの各状態に対して一分子観測を試み、オプシンとリガンドであるレチナールの結合状態が構造変化に及ぼす影響を検証した。

さらに本研究では、ロドプシンを含めた GPCR に見られる構成的活性変異体 (CAM) に着目した。CAM はリガンド非結合 (オプシン) の状態における G タンパク質活性化能が上昇する変異体で、ロドプシンでは多数の CAM が報告されているが、その活性化メカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では、一分子観測によって CAM オプシンの構造変化を捉え、G タンパク質活性化能との関連を検証した。

研究方法

本研究では G タンパク質との相互作用に重要な細胞質側の構造変化を捉えるため、天然ウシロドプシンの細胞質側ヘリックス VIII にある Cys316 を蛍光色素 Alexa594 でラベルした。この蛍光色素は、ロドプシンの活性化に伴い蛍光強度が増加する。本研究ではこの性質を利用し、全反射蛍光顕微鏡を用いてロドプシン構造変化の一分子観測を試みた。また、発現系で調製した CAM の Cys316 を特異的に Alexa594 でラベルするため、Cys140 をセリンに置換した変異体 C140S を作製した。そこに CAM の一つである M257Y 変異を導入し、Alexa594 でラベルした。

結果

本研究ではまず、光反応中間体メタ I とメタ II の pH 依存的な熱平衡状態における構造変化の観測を試みた。その結果、ロドプシン分子が経時的にデジタルな蛍光増減を示した。これら蛍光増減を統計的に解析した結果、高蛍光状態 (F_{high}) が活性構造を、また低蛍光状態 (F_{low}) が不活性構造を反映していることが示された。そこで、様々な pH において $F_{\text{high}} \cdot F_{\text{low}}$ の滞留時間を解析し、構造変化の速度を算出した。そして、レチナールをプローブとした分光学的知見と一分子解析の結果を比較したところ、これまでメタ I は不活性状態、メタ II は活性状態であると考えられてきたが、両者とも一つの構造のみを有するのではなく、活性構造と不活性構造の間の平衡状態にあることが示唆された。

次に、暗状態・光活性化状態・リガンドであるレチナール非結合型オプシンの各状態に対して一分子計測を試みた。そして、 F_{high} と F_{low} の間の変換頻度を解析・比較したところ、光活性化状態では非常に高い頻度で構造変化が生じることが分かった。一方、オプシンでは低頻度ではあるものの、コントロールである熱変性試料に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。しかしながら、暗状態においては有意な構造変化が見られなかった。また、ロドプシンの各状態における G タンパク質活性化能を生化学的手法により測定したところ、構造変化の生じる頻度と相関が見られることを発見した。

さらに本研究では、CAM の一つである M257Y オプシンの構造変化を Alexa594 をプローブとした蛍光変化によって解析した。まず、蛍光光度計を用いて M257Y オプシンの蛍光を測定したところ、野生型オプシンに比べ高い蛍光強度を示すことが分かった。さらに、一分子解析の結果、M257Y オプシンでは野生型オプシンに比べ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。

考察・結論

本研究の一分子観測から、ロドプシンはメタ I 中間体、メタ II 中間体、リガンド非結合型オプシンの各状態において、活性構造と不活性構造の間に変換が生じることが示された。この結果から、ロドプシンは各状態で一つの構造のみを有しているのではなく、活性構造と不活性構造の間の平衡状態にあり、それら構造平衡がオプシンとリガンドであるレチナールの結合状態によってシフトするというモデルを提唱した。これは、一般の GPCR の薬理的応答を説明する上で提唱されている「二状態モデル」に繋がる考え方である。

さらに、M257Y 変異体の一分子観測から、CAM ではオプシンにおいて高頻度に構造変化することが分かった。これは、天然ロドプシンで構造変化の頻度と G タンパク質活性化能が相関するという結果と一致し、CAM においても高頻度な構造変化が高い活性化能に繋がると考えられた。

以上のように、本研究の一分子解析から、ロドプシンをモデルとして GPCR の活性化を「構造平衡のシフト」という観点から理解することができた。