

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	前田 亮
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、生体内に広く存在する一大タンパク質ファミリーである。GPCRは7本の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てGタンパク質を活性化する。そして、細胞内の下流シグナル伝達系が駆動し、様々な応答を示す。GPCRはこれまで不活性状態・活性状態・Gタンパク質との複合体の結晶構造が解かれてきたが、これらは結晶化条件における安定状態を反映しており、生体内の反応を理解するためには、動的な解析が不可欠である。本論文では、全反射蛍光顕微鏡を用いた一分子計測法を用いて、GPCRの一つである光受容タンパク質ロドプシンの構造変化を動的に観測した実験結果と活性化メカニズムに関する考察が述べられている。</p> <p>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体である。ロドプシンは暗状態では、発色団である11シス型レチナールがインバースアゴニストとしてはたらき、Gタンパク質活性化能が非常に低く抑えられている。光を受容すると11シス型レチナールが全トランス型へと異性化し、メタI中間体と活性状態構造をもつメタII中間体の平衡状態に達する。その後、レチナールが解離してアポタンパク質オプシンが生成し、不活性構造に戻る。本研究では、Gタンパク質と相互作用する細胞質側の構造変化を検出するため、ロドプシンの細胞質側ヘリックスVII I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ことが知られている。本研究ではこの性質を利用し、全反射蛍光顕微鏡を用いたロドプシン構造変化の一分子観測を試みた。</p> <p>本研究では最初に、光反応中間体メタIとメタII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すことを見いだした。この蛍光増減を統計的に解析した結果、高蛍光状態が活性構造を、また低蛍光状態が不活性構造を反映していることが示された。そこで、高蛍光状態および低蛍光状態の滞留時間を解析し、構造間の遷移速度を算出した。その結果、これまでメタIは不活性状態、メタIIは活性状態と考えられてきたが、両者ともに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された。</p> <p>次に、暗状態とオプシン状態に対して一分子計測を試みた。各状態において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、比較したところ、光活性化状態 (メタIとメタIIの平衡状態) 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。また、暗状態では構造変化が見られなかったが、オプシン状態</p>			

においては低頻度ではあるものの、熱変性試料に比べ有意に高い頻度で構造変化が生じることが分かった。さらに、ロドプシンの各状態のGタンパク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相関が見られた。これらの結果から、ロドプシンは常に活性構造と不活性構造の間の平衡にあり、そのような構造平衡がリガンドであるレチナールの状態に応じてシフトすることが分かった。

本研究では次に、GPCRにおいてリガンド非依存的に活性が上昇する構成的活性化変異体（CAM）に着目し、その活性化メカニズムを構造平衡のシフトという観点から解明することを目指した。ロドプシンのCAMはオプシン状態において高いGタンパク質活性化能を示すが、その構造学的なメカニズムに関しては不明な点が多い。そこで本研究では、CAMの中でも高い活性を示すM257Y変異体に着目し、一分子計測により構造変化を観測した。その結果、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タンパク質活性化能に繋がることが示唆された。

以上のように、ロドプシンをモデルとしてGPCRの活性制御メカニズムをリガンドによる構造平衡シフトという観点から理解することが可能となった。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

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ロドプシンは、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) の一つであり、レチナールが発色団として結合している。レチナールは同時にリガンドとしてもはたらくが、その構造やアポタンパク質であるオプシンとの結合状態に応じてリガンドとしての機能が変化する。ロドプシンを含め、GPCRは過去に多くの結晶構造が解かれてきたが、それらは特定の条件下における安定状態を反映している。したがって、生理条件下におけるGPCRの活性化メカニズムを詳細に理解するには、構造変化を動的に観測することが不可欠であった。そこで申請者は、ロドプシンの構造変化を直接的に検出するため、ロドプシンの活性化に伴い強度が増加する蛍光色素Alexa594で修飾し、全反射蛍光顕微鏡を用いた一分子計測法で構造変化を一分子レベルで観測した。

申請者はまず、不活性中間体Meta-Iと活性中間体Meta-IIのpH平衡混合物を一分子観測し、蛍光強度の増減によって構造変化を一分子レベルで観測できることを示した。次に、一分子計測を暗状態やリガンド非結合型のオプシンにも適用したところ、このような構造変化は暗状態ロドプシンでは見られなかったものの、オプシンにおいては低頻度で見られることを示した。さらに、Meta-IとMeta-IIの平衡状態で見られた蛍光変化を速度論的に解析したところ、メタIとメタIIは両者ともに活性構造と不活性構造の間の平衡状態にあり、その平衡がリガンドによってシフトしていることが示された。

申請者は次に、リガンド非依存的に活性が上昇する構成的活性化変異体 (CAM) に着目した。ロドプシンのCAMは、オプシン状態でも高いGタンパク質活性化能を示す変異体であるが、その構造生物学的なメカニズムに関しては不明な点が多い。そこで申請者は、CAMの中でも高い活性を示すM257Y変異体に着目し、一分子計測法を用いて構造変化を動的に観測した。その結果、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活性構造と不活性構造の間の構造変化が生じていることが分かった。この結果から、CAMではリガンド非依存的に活性構造が生じており、それがCAMの高いGタンパク質活性化能に繋がることが示唆された。

以上の結果から申請者は、ロドプシン分子は活性構造と不活性構造の間の平衡状態にあり、そのような構造平衡がリガンドであるレチナールの状態に応じてシフトするという活性化モデルを提唱した。これは、これまでGPCRについて概念的に提唱されてきた二状態モデルを実証するものであり、本論文を通じて、GPCRの活性制御メカニズムをリガンドによる構造平衡シフトという観点から詳細に理解することが可能となった。よって、本論文は博士 (理学) 学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年2月19日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降