1E1100

細胞外第2ループ領域のアミノ酸残基によるピノプシンメタII中間体の安定性制御

○仲村 厚志^{1,3}、小島 大輔^{1,3}、岡野 俊行^{1,3}、今井 啓雄^{2,3}、寺北 明久^{2,3}、七田 芳則^{2,3}、深田 吉孝^{1,3} (¹ 東大・院理・生物化学、² 京大・院理・生物物理、³CREST・JST)

ニワトリ松果体の光受容蛋白質ピノプシンは、概日時計の位相を外界の明暗周期に同調させる役割を果たすと考えられる。現在、概日時計への光入力系の分子メカニズムの多くは謎に包まれており、ピノプシンの機能を明らかにすることは、光入力メカニズム解明への第一歩になると考えられる。一次構造の比較から、ピノプシンは桿体視物質よりも錐体視物質に類似した光化学反応を示すと推測されていたが、ピノプシンの生理活性中間体であるメタII中間体は錐体視物質 (Green) に比べて極めて安定であり、桿体視物質 (ロドプシン) と同程度の速度で崩壊した [Nakamura et al. (1999)]。本研究では、ピノプシンのメタII中間体の安定化に寄与するアミノ酸残基を明らかにするため、部位特異的変異体を用いた分光学的解析を行った。変異体を作製するにあたり、ピノプシンと既知の錐体視物質の一次構造を比較したところ、171番目のSer、184番目のAsn、そして188番目から193番目までの配列 (6残基) を見出した。興味深いことに、これらの残基は全てピノプシンの細胞外第2ループに集中していた。ピノプシンの2重変異体171/184のメタII崩壊速度は野生型とはほぼ同じであったが、この変異体の188番目から193番目の配列 (6残基) をGreenの対応する配列 (8残基) と置換した3重変異体においては、メタIIの崩壊速度は野生型の約3倍となった。一方、Greenの同領域 (8残基) をピノプシンの対応する配列 (6残基) に置換した変異体を作成したところ、野生型のGreenに比べ変異体のメタIIは安定化された。これらの結果より、ピノプシンの細胞外第2ループに存在する188番目から193番目までの配列が、ピノプシンのメタII中間体の安定化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A.Nakamura, D.Kojima, T.Okano, H.Imai, A.Terakita, Y.Shichida and Y.Fukada : Role of second extracellular loop of pinopsin in stabilization of metapinopsin II

1E1130

ロドプシンと他の受容体とのキメラ変異体を用いたG蛋白質活性化メカニズムの比較解析

○山下 高廣¹、寺北 明久^{1,2}、七田 芳則¹ (¹ 京大・院理・生物物理、²CREST)

これまでに数百種以上のG蛋白質共役型受容体 (GPCR) が同定され、各々がどのようなメカニズムでG蛋白質を選択的に認識し活性化するかが精力的に研究されている。その中で、視覚の光受容体ロドプシンとG蛋白質との相互作用メカニズムについての研究は進んでいるが、他の受容体のメカニズムとの詳細な比較は行われていない。そこで我々は、異なるリガンドを結合する受容体とロドプシンとの間において、G蛋白質の選択的活性化機構を比較解析することを試みた。具体的には、ウシロドプシン (トランスデューシン [Gt] と共役) に、他の受容体のG蛋白質相互作用部位を導入したキメラ変異体を作製し、G蛋白質選択性を持ち込むことが可能かどうか、生化学的解析を行った。GPCRの中で、ロドプシンスーパーファミリーに属する多くの受容体では細胞質第3ループ (L3) がG蛋白質選択性に重要な役割を果たすことが報告されている。そこでまず、ウシロドプシンのL3をこのファミリーに属する受容体のL3と置換した。その結果、Gi/Go共役型のムスカリン受容体やアドレナリン受容体などとのキメラ変異体においてGtを活性化せず、Gi/Goを効率よく活性化した。さらに、ロドプシンスーパーファミリーに属さないGPCRの一つである代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) との間でキメラ変異体を作製した。mGluRでは細胞質第2ループ (L2) がG蛋白質選択性に重要であることが報告されている。そこで、ウシロドプシンのL3をmGluRのL2またはL3に置換したところ、L3を組み込んでもG蛋白質の活性化能は認められなかったが、Gi/Go共役型のあるサブタイプのmGluRのL2を組み込んだ場合に、Gtを活性化せずGiを効率よく活性化することを見いだした。これらの結果から、多様な七回膜貫通型受容体におけるG蛋白質の活性化機構を比較するとともに、受容体の多様化メカニズムとの関係についても議論したい。

T. Yamashita, A. Terakita and Y. Shichida : Comparative analysis of G protein activation mechanism of rhodopsin and other various receptors by using their chimeric mutants

1E1115

松果体細胞における光受容とG₁₁を介するの光情報伝達経路

○笠原 和起¹、岡野 俊行^{1,3}、吉川 朋子^{1,3}、松下 敦子^{1,3}、芳賀 達也^{2,3}、深田 吉孝^{1,3} (¹ 東大・院理・生化、² 東大・医・神経生化、³CREST・JST)

ニワトリの松果体細胞は概日時計の機能だけでなく光受容能を持っており、光刺激は概日時計の位相シフトとメラトニン分泌の急性抑制を引き起こす。これらの光効果は百日咳毒素 (PTX) に対する感受性が異なり、メラトニン分泌の急性抑制はPTX処理によって阻害されるが、位相シフトは影響を受けない。このことから我々は、サブタイプが異なる複数のGタンパク質が光受容タンパク質ピノプシンと相互作用していると考え、ニワトリ松果体に発現するGタンパク質 α サブユニット (G α) を調べた。その結果、PTX感受性のGt₁₁ α とPTX非感受性のG₁₁ α の細胞内局在がピノプシンと一致していることを見出した。

G₁₁ α を介した細胞内情報伝達経路が概日時計に入力している可能性を検討するため、Gq/11共役型受容体であるムスカリン性アセチルコリン受容体m1サブタイプ (m1 mAChR) を松果体細胞に発現させ、カルバコール刺激の効果を調べた。その結果、光刺激を与えた場合と同様に、メラトニン分泌リズムの位相シフトが観察された。一方、Gi/Go共役型受容体であるm2 mAChRやベクターのみを導入した細胞では、時計の位相は変化しなかった。このことから、G₁₁経路は概日時計に入力しており、「ピノプシン-G₁₁一時計発振系」という光入力系が存在すると推測された。次に、光による位相シフトとメラトニン分泌抑制という2つの効果の光強度 (照度) 依存性を調べた。その結果、両者の光強度依存性は非常に似ており、0.5 lux (白色光) という微弱な光に対しても感度よく反応した。以上の結果を考え併せると、ニワトリ松果体細胞における2つの光効果は、同一の光受容分子ピノプシンから2種類の細胞内情報伝達経路を介してもたらされていることが示唆された。

T. Kasahara, T. Okano, T. Yoshikawa, A. Matsushita, T. Haga and Y. Fukada : Photoreception and G₁₁-mediated phototransduction in the chicken pinealocyte

1E1145

合成ペプチドを用いたロドプシン・トランスデューシン相互作用機構の時分割解析

○森住 威文、今井 啓雄、七田 芳則 (京大・院理・生物物理)

脊椎動物のロドプシンは、光を吸収するとG蛋白質トランスデューシン (Gt) と結合し、その後、Gt α 上でのGDP/GTP交換反応を誘起してそれを活性化する。我々はこの過程を分光学的に解析し、ロドプシンの2つの中間状態 (Meta I, Meta II 中間体) がGtと相互作用し、またこれがGt α C末端との相互作用であることを発見した。そこで本研究では、この相互作用に関与するアミノ酸残基を同定することを目的として、種々の合成ペプチドを用いて実験を行った。その結果、Gt α C末端11残基ペプチドは、Meta I, Meta II 両中間体と結合する一方、349番目のロイシン残基をアラニンに置換したペプチド (L349A) は、Meta I 中間体には結合するが、Meta II 中間体には結合しないことを示した。この結果は、それぞれのロドプシン中間体と相互作用するアミノ酸配列が異なることを示唆している。

さらに我々は、ロドプシンとの相互作用にとって349番目のロイシンと同様に重要であるとされてきた344番目のロイシン残基をアラニンに置換したペプチド (L344A)、さらには、両方をアラニンに置換したペプチド (L344A/L349A) について、ロドプシンとの相互作用について検討した。その結果、アラニン置換の有無やアラニンに置換した残基の位置により、ロドプシンとの結合様式に明白な差異が生じることを見いだした。また、ロドプシンとの結合に重要な残基がペプチドの両端に別れて存在していることに着目し、このペプチドをN端側6残基・C端側5残基に分割したペプチドについて、ロドプシンとの相互作用について検討した。その結果、このような分割ペプチドにおいてもMeta I 中間体との結合能を保持していることが分かった。

以上の結果を解析することにより、Meta I・Meta II の各中間体とGt α C末端部位の段階的な結合が、どのようなアミノ酸配列のどのような構造によって制御され、実現されているのかを議論したい。

T. Morizumi, H. Imai, Y. Shichida : Time-resolved spectroscopic analysis of interaction mechanism between rhodopsin and synthetic peptides of the transducin alpha-subunit.