S3D03

Class A GPCR の分子系統解析

○藤 博幸（生物分子工研・情報解析）

分子系統解析は、生物の進化を配列データから再構築する手段である。しかし、分子進化的解析からは、進化的情報のみではなく、解析の対象となっている蛋白質の機能に関する情報も得ることができる。本発表では、分子系統解析の応用による、Class A GPCR ファミリーの配列データからの、進化や機能に関する情報抽出について議論する。 Class A GPCR (ロドプシン・スーパーファミリー) は、広く生物に分布している蛋白質であり、多くの配列データが蓄積されてきている。このような配列データを利用した分子系統解析から、生体の有する機能がどのように進化してきたかを推定することができる。本発表では、まず、Class A GPCR に属しているエイコサノイド受容体を例にとって、脂質に由来する物質による情報伝達（アラキドン酸カスケード）が、どのように進化してきたかを議論する (1, 2)。 Class A GPCR の分子系統解析では、その系統樹中に表れるクラス（サブファミリー）と、リガンドの性質の間に、比較的良好な対応関係が得られることが知られている。系統関係と機能的な差異との間に、そのような対応関係がある場合、分子系統樹の作成を行うことにより、配列からの詳細な機能解析を行うことができる。今回は、分子系統樹による機能解析の応用として、やはり Class A GPCR に属しているエンドセリン受容体のアンタゴニストの設計について報告する (3)。引用文献 (1) Toh, et al. FEBS Lett. 361, 17 (1995). (2) Kikuno, et al. In: Comprehensive Natural Products Chemistry. (Eds. Barton et al.) Volume I, Elsevier, Amsterdam, pp273 (1999). (3) Fruh, et al. Bioorganic & Medical Chemistry Lett. 6, 2323 (1996).

H. Toh : Molecular Phylogenetic Analysis of Class A GPCR

S3D05

GPCR のリガンド 認識と構造変化

○石黒 正路（サントリー生有研）

部位特異的なアミノ酸変異によって、GPCR ではアゴニストとアンタゴニストの認識部位が異なることが示されている。例えば、ムスカリン性アセチルコリン受容体ではアゴニストとアンタゴニスト共にカチオン部は TM3 上の Asp 残基と相互作用するが、TM6 上の Tyr 残基はアゴニストの認識のみに関与し、アンタゴニストの結合には全く影響しない。一方、アンタゴニストの認識に関与する Asn はアゴニストの認識には関係しない。 ロドプシンの構造変化の研究から、GPCR におけるアンタゴニストが結合するレセプターの構造とアゴニストが結合する構造では相当に相違があり、不活性構造であるロドプシンに類似した構造のみでは全てのリガンドとレセプターの複合体構造モデルを作成できないことが示唆されている。 オプシンの構造変化と G 蛋白質との相互作用そして活性化というイベントが Lumi から Meta II のステップで生じる。特にシスレチナールからトランスレチナールへの構造変化に伴った立体的な因子による TM3 や TM4 の動きと最終的な活性化状態の生成に必須な TM6 の回転はレセプターのリガンド認識に重要な構造的な特異性を与える。すなわち、TM6 の回転の前後ではリガンド結合部位における TM6 が関与するアミノ酸残基が異なり、フルアゴニストとアンタゴニストを認識するアミノ酸残基が異なることが示唆される。 このような一連の構造変化において、レチナールの光シーストランス異性化モデルから立体的構造因子を推測し、さらに TM6 の回転をもたらし構造的因子を保存されたアミノ酸残基の役割として推測することにより、GPCR における共通の構造変化を推測できる。また、構造変化がもたらすリガンド結合部位の特異性の変化から、薬理学的に分類された各種の GPCR リガンドの機能に対応してそれぞれ異なるレセプターの構造が推測された。

M.Ishiguro : ligand Recognition and Structural Change of GPCR

S3D04

ロドプシンの結晶構造

○岡田 哲二^{1,2} (¹ 京大院・理・生物物理、² バイオ産業情報化コンソーシアム)

ロドプシンは、視覚（明暗視）における光受容を担う膜蛋白質であり、真核生物中に広く存在する。ヒトやウシなどでは 348 残基のポリペプチドに発色団 11 シスレチナール、糖鎖、パルミチン酸が共有結合し、分子量約 42 kDa である。網膜の桿体細胞外節中では、ロドプシンが光を吸収して構造変化を起こすと、三量体 G 蛋白質トランスデューシンを活性化する。一般の G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) では、拡散性のリガンド結合がトリガーとなり、同様の情報伝達系が機能する。ロドプシンファミリーに属する受容体は GPCR の大部分を占め、主に 7 本の膜貫通ヘリックス領域に、多くの共通するアミノ酸・モチーフを有するため、基本構造は類似したものと推測されている。最近提出したウシ網膜由来のロドプシンの X 線結晶構造モデルは、これまでの様々な GPCR に関する研究とも相容れ、そのような推測を支持するものであった。即ち、ファミリーに属する受容体間で保存性の高い部位は、膜貫通領域の構造形成に重要な相互作用に関与している。一方、明暗視機能に最適化されたロドプシンは、リガンドとして発色団 11 シスレチナールを内包しており、その状態では極めて不活性である。つまり、現在得られている構造は、一般の GPCR における所謂 inverse agonist 結合型に対応する。また、内在性の 11 シスレチナールを保持するために、細胞外領域が非常に折り畳まれた構造をとっている点も、おそらくロドプシンや色覚を担う視物質などに特有のものであると考えられる。このように、GPCR 一般の基本構造として重要な部分と、光情報伝達や吸収波長制御といった視覚機能に特有と思われる構造について概観し、光活性化とリガンド結合による活性化・構造変化の共通点、メカニズムを考察する。

T. Okada : Crystal structure of bovine rhodopsin

S3D06

G タンパク質共役型走化性受容体シグナルの局在化機構：G タンパク質活性化の 1 分子可視化解析

○笠井 倫志^{1,2}、村越 秀治^{1,2}、飯野 亮太¹、藤原 敬宏¹、中西 華代¹、吉住 玲¹、伊丹 憲史²、小林 剛¹、芳賀 達也³、Prossnitz Eric⁴、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技振・ERATO、² 名大・院・生命理学、³ 学習院大・理、⁴ Dept. of Cell Biol. and Phys., Univ. of New Mexico Health Science Ctr.)

フォルミルペプチド受容体 (FPR) は 7 回膜貫通型受容体で、白血球の長距離、長時間にわたる移動を誘導する。このような走化性の理解には、短時間のシグナル伝達と同時に、ダウンレギュレーションやリサイクルについても十分な知見を得ることが必要である。我々はこれらの過程の全容の解明を目指しているが、本発表では、以下の 2 点について述べる。(1) FPR-GFP を CHO 細胞に発現させ、FPR の運動を一分子蛍光法によって追跡した。リガンド刺激後約 1 分で、約半数の受容体の拡散係数はリガンド刺激前の約 1/10 に減少した。この原因として、G タンパク質、アレスチン、GRK の結合などが考えられ現在検討中である。5 分後には、約 80% の受容体がクラスリン被覆ピットに、約 20% がカベオラに入った。(2) 活性化された受容体による G α の活性化の瞬間を生細胞内で 1 分子画像化できた。すなわち、G α -GFP を CHO 細胞に発現させ、蛍光ラベルされた GTP (F-GTP) を顕微注入して、リガンド刺激した。細胞膜上の G α -GFP への F-GTP の結合を一分子蛍光共鳴エネルギー移動法 (一分子 FRET) によって一分子ごとにイメージングした。エネルギー移動を起こしている輝点は静止していた。すなわち、走化性信号は空間的に制御されていた。

R.Kasai, H.Murakoshi, R.Iino, T.Fujiwara, H.Nakanishi, R.Yoshizumi, N.Itami, T.Kobayashi, T.Haga, E.Prossnitz and A.Kusumi : Localization mechanism for G protein-chemotactic receptor signaling: single molecule imaging of G-protein activation