

様式2

平成28年度 生体医歯工学共同研究実施報告書

受理年月日	
受理番号	2037

平成 29 年 3 月 31 日

生体医歯工学共同研究拠点 研究所長会議 議長 殿

共同研究代表者

所属機関 京都大学

職 名 准教授

氏 名 今元 泰

勤務先所在地 〒606-8502

京都市左京区北白川追分町

電話番号 075-753-4243

FAX番号 075-753-4210

E-mailアドレス : imamoto@rh.biophys.kyoto-u.ac.jp



下記により、共同研究の実施報告を致します。

記

研究題目	(和)X線散乱測定によるG蛋白質共役型受容体活性化メカニズムの解析 (英)X-ray scattering analysis of the activation mechanism of G protein coupled receptor		
研究領域	1. 生体材料に関する基礎・応用研究 2. 生体工学に関する基礎・応用研究 3. 生体機能分子に関する基礎・応用研究 4. 化学・電気・機械・材料工学の生体応用研究		
研究期間	平成 28 年 6 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日		
研究組織			
氏名	所属機関・部局等	職名	役割分担
今元 泰	京都大学大学院理学研究科	准教授	実験・解析
小島 慧一	京都大学大学院理学研究科	学振特別研究員	実験・解析
沈 宜中	京都大学大学院理学研究科	博士課程1年	実験・解析
岡 俊彦	静岡大学電子工学研究所	准教授	実験・解析
所要経費			
旅費総額	研究・会議費総額	消耗品費総額	
148,440 円	0 円	51,217 円	
生体医歯工学共同研究拠点内対応教員	(共同研究をした教員名を記載) 岡 俊彦		
共同研究継続の希望について	有 ・ (無)	平成29年度研究費 総額(千円)	
		※継続を希望される場合記入してください	

研究成果

1. 研究目的

X線小角散乱法は生理的条件にある蛋白質の解析に有力な手法であるが、膜蛋白質への応用例は少ない。これは、界面活性剤で可溶化した場合でも単分散しにくいことや、ミセル由来の散乱が重なるために定量的な解析が困難であることが原因であると考えられる。われわれは膜蛋白質をナノディスク(ND)と呼ばれる膜小片に埋め込むことで、X線小角散乱法を膜蛋白質に適用することを試みている。NDとは、脂質二重膜を Membrane Scaffold Protein (MSP) と呼ばれる繊維状蛋白質 2 分子でバンドルしたもので、直径は 10 Å 程度になる。NDには G 蛋白質共役型受容体クラスの膜蛋白質を 1~数個組み込むことができること、サイズが揃っていること、可溶性が高いことなどの特長があり、X線小角散乱法に適した試料であると考えられた。今回は、動物の視覚に関与する光受容蛋白質であるロドプシンを用いた解析について報告する。

2 研究成果

2. 1. ロドプシンとアレスチンの相互作用

X線小角散乱法では、原点散乱強度から見かけの分子量を見積もることができるため、蛋白質の会合・解離を直接観測することができる。ロドプシン 1 分子を ND に組み込んだ場合、ロドプシンの分子量は 42 kDa、MSP の分子量は 33 kDa なので、ひとつの ND は 108 kDa 相当になる。そこで ND をひとつの散乱体とみなすことで、ND とアレスチン(45 kDa、リン酸化ロドプシンに結合する調節蛋白質)との結合を観測することを試みた。アレスチン存在下で ND 中のロドプシンを光刺激したところ、ロドプシンをリン酸化した場合にのみ原点散乱強度の増加が見られた。原点散乱強度の増加のアレスチン濃度依存性をシミュレーションしたところ、フリーでは 4 量体化しているアレスチンが、ロドプシンと結合する時には単量体化するというモデルとよく一致した。

2. 2. ロドプシンの構造変化

ロドプシンは 7 つの膜貫通ヘリックスからなる。光で活性化したロドプシンでは、ヘリックスが外側に移動して G 蛋白質と結合できるキャビティが生じることが結晶構造解析から提唱されている。そこで、生理的な条件における構造変化を $0.1 < Q < 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ 程度の高角領域の X 線散乱法を用いて検証した。ロドプシンを ND に組み込み、光刺激の前後に散乱カーブを測定した。ヘリックスのパッキングを示すと考えられる高角領域の散乱強度の変化は微小(数%)であったが、再現性のよいデータが得られた。次に、暗状態ロドプシンと活性化ロドプシンの結晶構造から CRYSOLE を用いて散乱パターンを計算し、その差を今回測定した散乱パターンの変化と比較したところ、よい一致が見られた。以上のことから、結晶構造解析で示された構造変化は、生理的な構造変化を反映していると考えられた。

使用した設備・資料・試料等

X線散乱測定装置
データ解析のためのソフトウェア
構造シミュレーションのためのソフトウェア

本研究成果に関連する論文発表状況