

「脳を知る」

平成9年度採択研究代表者

芳賀 達也

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

「Gタンパク質共役受容体の高次構造」

1. 研究の概要

本研究はGタンパク質共役受容体の高次構造を明らかにし、それによって受容体の作用機構を知ると同時に、理論的にリガンドを推定し創薬への道を開くことを目標としている。またGタンパク質共役受容体の新しいリガンド検索系の構築も目指している。最初に受容体の大量発現系を検討し、バキュロウイルス・Sf9細胞系を用いてムスカリン受容体変異体を1ヶ月に約40mg発現させる系を確立した。定常的に供給される受容体を用いて、リン脂質膜中への2次元結晶化および3次元結晶化条件の検討、特に受容体を安定に保つ界面活性剤の検索を広範囲に行っている。膜タンパク質の結晶化条件については筋小胞体カルシウムATPaseを用いても検討し、8Å分解能での3次元構造を得た。新しいリガンドスクリーニング系として受容体・Gタンパク質アルファサブユニット融合蛋白質を用いる系の構築を始めた。現在数種の融合蛋白質を作成し、その性質を検討している。結晶化の試みと検索系の構築を今後も継続する。

2. 研究実施内容

(1) 受容体大量発現系の検討

バキュロウイルス・Sf9細胞系を用いて、ムスカリン受容体変異体を定常的に発現させる系を確立した。東大での培養と受託培養の併用により、1ヶ月約40リットルの培養液、約40mgの膜受容体を発現させている。リガンド結合能、Gタンパク質活性化能いずれも正常なムスカリン受容体を、大腸菌で発現できることが分かった。生成量が約0.1mg/lと低く、生成量を向上させる試みは現在のところ成功していない。

(2) 2次元結晶化条件の検討

ジギトニン中で精製した標品には、受容体重量の数倍以上の重量のジギトニンが結合していることが分かった。また、ジギトニンは2重膜生成を妨害した。ジギトニンを他の界面活性剤に置き換える試みを継続的に行っている。ジギトニンほど受容体を安定に保つ界面活性剤は見つかっていないが、アルキルマルトシド中で比較

的安定で、脂質 2 重膜の生成も妨害されないことが分かった。数種のアルキルマルトシド中で 2 次元結晶化の条件を検討している。

(3) 3 次元結晶化条件の検討および膜タンパク質結晶の解析

ジギトニン中で可溶化・精製したムスカリン受容体標品から、ジギトニンを除去しアルキルマルトシドに置換・濃縮する過程で、結晶様構造の生成が見られた。大きさは 20 x 200 x 200 (μm) 程度で、10 ヶほどの試料の SDS-PAGE 分析でムスカリン受容体のバンドが検出された。これが結晶性のものかどうかを判定するために、低温 X 線回折実験を行ったが、蛋白質結晶である証拠は得られなかった。しかし、界面活性剤の結晶とも考えられない。この条件周辺で、結晶化条件を詳細に検討する予定である。

また、筋小胞体カルシウム ATPase の構造解析を進めている。カルシウム非存在下で筋小胞体膜そのものから得られるチューブ状結晶を用い、8Å 分解能での 3 次元構造を発表した。この結果、膜内の 10 本の α ヘリックスを可視化でき、具体的なモデルを提出できた。さらに、カルシウム存在下で精製標品を脂質二重膜に再構成して得られる三次元微結晶からは、膜に平行な方向 (b 軸) に投影した像を得ることが出来た。この結果、カルシウムの結合によって大きな構造変化が起こることが判明した。さらに、X 線結晶解析にかかる三次元結晶を得ることが出来、個々のアミノ酸を解像できる見通しがたった。現在 SPring 8 を中心にデータ収集を進めている。

(4) リガンドスクリーニング系の開発

$G_i \cdot G_o$ に共役した受容体で活性化され、アデニル酸シクラーゼを活性化する G_i と G_s のキメラの作成を試みた。種々のキメラを作成・検討したが目的のものは得られなかった。この過程で、 $G_i \cdot G_o$ に共役したムスカリン m_2 , m_4 受容体を CHO 細胞に発現させると、受容体刺激を細胞内 Ca 上昇として検出できることが分かった。この系を用いて、ムスカリン受容体 m_1 - m_5 サブタイプのアロステリックリガンドを検索する系を構築した。また、ムスカリン受容体、コレシストキニン受容体などについて、CHO への発現による細胞内 Ca の測定と、メラノフォア細胞への発現による色素顆粒凝集による検出系を比較検討した。後者は G_q と共役したコレシストキニン受容体のリガンド検索系として有用であることが分かった。

ムスカリン受容体 m_2 サブタイプと G タンパク質 α_{i1} サブユニットとの融合タンパク質を Sf9 細胞に発現させた。この融合タンパク質は、ムスカリン性リガンドに応答してグアニンヌクレオチドとの結合が制御されることが確認された。受容体と G タンパク質相互作用のモデル系になると同時に、リガンドスクリーニング系として有用と考えられる。現在、ムスカリン受容体 m_1 - m_5 サブタイプ、ノシ

セプチン受容体、コレシストキニン受容体などについて、G タンパク質 α サブユニットとの融合タンパク質の調製を試みている。また、m2 受容体・Gi 融合タンパク質について、ランダムペプチドのフェージディスプレイ法で、ペプチドリガンドの検索の試みを行っている。

(5) 受容体に結合したリガンドの解析

ムスカリン受容体に結合したメタコリンのC α -C β 内部回転角を核磁気共鳴法(NMR; TRNOE 法)により決定する試みを継続している。ジギトニン存在下では、メタコリンとジギトニンとの非特異的相互作用が強く NMR 測定の結果を定量的に解析できないことが明らかになった。そこで、受容体標品中のジギトニンの量を減らす試みをすると同時に、界面活性剤の濃度、種類および測定温度などを変化させ、NMR 測定のための最適条件の検討を行った。コール酸などの界面活性剤を中心に条件検討を行った。5℃ ではどの条件でも界面活性剤とメタコリンとの相互作用が強くてだが、25℃ ではコール酸共存下でジギトニンとの相互作用をかなり抑えることができた。アルキルマルトシドは温度に依らず、メタコリンと非特異的相互作用を示した。リピドへの受容体の組み込みなども含め、定量的な解析が可能な条件の検討を継続する予定である。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

- Haga, K., Ogawa, H., Haga, T. and Murofushi, H.: GTP-binding-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin. *Eur. J. Biochem.* 255,363-368(1998).
- Jakubik, J., Haga, T. and Tucek, S.: Effects of an agonist, allosteric modulator, and antagonist on [35S]GTP γ S binding to liposomes with varying muscarinic receptor to Go protein stoichiometry. *Mol. Pharmacol.* 54, 899-906 (1998)
- Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Honma, T., Lameh, J. and Sadee, W.: Internalization and down-regulation of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes: Role of third intracellular m2 loop and G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* 273,5323-5330(1998)
- Tsuga, H., Kameyama, K. and Haga, T.: Desensitization of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes is caused by their sequestration/internalization. *J. Biochem. (Tokyo)* 124,863-868(1998)
- Tsuga, H., Okuno, E., Kameyama, K. and Haga, T.: Sequestration of human muscarinic acetylcholine receptor hm1-hm5 subtypes: Effect of G protein-coupled receptor kinases GRK2, GRK4, GRK5 and GRK6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284,1218-1226(1998)

- Ito, K., Haga, T., Lamah, J. and Sadee, W. Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 and 5.,*Eur.J.Biochem.*259, 112-119 (1999)
- Touhara, K., Sengoku, S., Inaki, K., Tsuboi, A., Hirono, J., Sato, T., Sakano, H., and Haga, T. : Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 96, 4040-4045 (1999)
- Saffen, D., Mieda, M., Okamura, M. And Haga, T. : Control elements of muscarinic receptor gene expression. *Life Sciences*, 64, 479-486 (1999)

他 19 件