

「脳を知る」

平成9年度採択研究代表者

芳賀 達也

(学習院大学理学部 教授)

## 「Gタンパク質共役受容体の高次構造」

### 1. 研究実施の概要

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主目標としている。

バキュロウイルス・Sf9 細胞系を用いて発現させたムスカリン受容体変異体のリン脂質膜中での2次元結晶化および3次元結晶化条件の検討を広範囲に行ってきた。特定の条件で3次元結晶の生成が再現的に観察された。X線回折で、20 Å付近にいくつかの回折点が観察された。またGタンパク質共役受容体の新しいリガンド検索系を構築し、オーファン受容体の内在性リガンドの同定も目指している。ヒトゲノムから検索した新規のGタンパク質共役受容体約30種についてGタンパク質 $\alpha$ サブユニットとの融合タンパク質を調製し、そのアゴニストを既知化合物約900種から検索した。いくつかの代替アゴニスト、1種類の内在性アゴニストと考えられる化合物を同定した。

### 2. 研究実施内容

#### (1) 発現結晶化、リガンドスクリーニング、コリントランスポーターグループ

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た。受託培養の併用により、1ヶ月 40-60 リットルの培養液、40-60 mg の膜受容体を発現させ、20 - 30 mg の精製受容体を調製した。C末端にヒスチジンタグをつけたものとつけないもの、2種類の受容体を調製した。アフィニティーカラムでの精製条件を検討し、ヒスチジンタグが付いていない標品でも十分な精製度が得られる条件を設定した。受容体をアフィニティーカラムあるいはアフィニティーカラムとNiカラムを併用して精製後、高親和性リガンドQNBを結合させた。種々の界面活性剤に変換したのち、結晶化を試みた。代替界面活性剤、添加物、沈殿剤、緩衝液、塩などの種類・濃度を網羅的に検討した。一つの条件で、結晶様構造物が再現的に観察された。条件を細かく変えることにより、結晶の性状は顕著に改善された。中迫雅由氏に依頼して、東大分生研、理研、SPring 8で結晶のX線回折を行った。いくつかの回折点が観察されたが、高い分解能のものは得られていない。結晶を抗凍結剤存在下でも安定に保つ条件を検討している。3次元結晶化と並行して2次元結晶化も試みていたが昨年度以上の進展が見られなかった。平成13年10月以降は、精製受容体を3次元結晶化に集中使用することとした。細胞内第三ループ、Gタンパク質共役受容体キナーゼ、受容体・G $\alpha$ 融合タンパク質の大量発現・精製系を確立するための実験を行ったが、結晶化の

試みを開始するには至っていない。

ヒトゲノムから検索した新規 G タンパク質共役受容体(約 30 種)と G タンパク質  $\alpha$  サブユニット(主に Gi1、一部 Gs)との融合遺伝子を昆虫細胞 Sf9 に発現させた。これらの融合タンパク質を発現している細胞膜標品に約 900 種類の既知化合物を作用させ、アゴニスト活性があるか否かを検討した。5 種類の受容体についてアゴニストを同定できた。2 種類の受容体は構成的活性を示し(constitutive active)、インバースアゴニストが同定できた。このうち 6 種類の受容体に対するアゴニスト、アンタゴニストは 0.1 - 1mM という高濃度でしか活性を持たず、それらの受容体に対する内在性リガンドや創薬に向けてのリード化合物の化学構造を推定、設計するには不十分な情報であった。しかしこの結果は、これら受容体-G  $\alpha$  融合タンパク質が機能的に活性であること、内在性リガンド検索に利用可能であることを示している。さらに 1 種類の融合タンパク質については、ある化合物が数 nM でアゴニストとして働くことが見いだされた。この物質に対して、百日咳毒素感受性の G タンパク質共役受容体が存在することは従来から推測されていたが、受容体は同定されていなかった。今回我々が同定したものがこの物質の受容体である可能性は極めて高い。現在確認を急いでいる。受容体への刺激を遺伝子発現として出力する試みとして、 $\beta$  ガラクトシダーゼの刺激依存性発現を一過性にする等の開発を行なった。しかし、リガンド検索系として確立するには至らなかった。

前年度にヒト高親和性コリントランスポーター(CHT1)をクローニングし、機能解析を行った。今年度、ヒト CHT1 遺伝子に機能の異なる単一塩基多型が存在することを明らかにした。細胞膜貫通部位の 1 つのアミノ酸がイソロイシンからバリンに変わることで、コリン取り込み活性が野生型の 60% になることが分かった。都神経研の三澤日出巳氏、杏林大学小林靖氏との共同研究により、抗 CHT1 抗体を用いた免疫組織化学によりラット、サル、ヒト中枢神経系における CHT1 発現分布を調べ、コリン作動性神経に局限していることを詳細に明らかにした。CHT1 と相互作用する新規分子を酵母のツーハイブリッド法で探索する試みを開始した。細胞膜貫通部位での酸性アミノ酸残基に的を絞って、部位特異的変異導入により機能に必須な残基を同定する試みを開始した。発現調節機構については、ヒト CHT1 遺伝子の 5' 上流部分とレポーター遺伝子(ルシフェラーゼあるいは  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子)をつないだベクターを培養細胞あるいはマウスに導入し、プロモーター活性を持つ領域を同定する試みを行った。培養細胞に導入した実験から、翻訳開始点から 5 キロ以内にプロモーター活性があることが分かった。トランスジェニックマウスについては現在活性を検索中である。

## (2) 結晶解析グループ

豊島・中迫グループはムスカリン性アセチルコリン受容体の結晶ができた場合、いかようなものであっても直ちに解析できるよう膜蛋白質結晶の解析技術の開発を担当している。その為の材料としては、これ迄に多くの経験を積んでいる筋小胞体カルシウム ATPase を用いている。本年度はカルシウム非結合状態の結晶化とその解析を行った。カルシウム非結合時には膜貫通ヘリックスの動きが大きいため、阻害剤を加えることで著しい改善を見た。また、環境変化に弱いため急速凍結が困難であったが、昨年度開発した装置にさらに改良を加えることで、再現性を著しく向上させることが

出来た。また、別の生理的状态では透析速度の違いによって結晶性が著しく異なることも判明したので、その改善のための方策を考案した。この場合も電子顕微鏡レベルの結晶から出発して3Åを越えるX線回折パターンを与える結晶を得ることが出来た。従って、出発点となる電子顕微鏡レベルの結晶ができれば、このようなアプローチが大変有効であることを示せたと考えられる。

### (3) リガンド構造解析グループ

昨年度までに、ムスカリン受容体に結合した(s)-メタコリンと(+)-ムスカリンの立体構造解析を Transferred Nuclear Overhauser Effect (TRNOE) 法を用いて行ってきた。その結論である両者共に gauche 型(二面角 O-C-C-N が約 60°)の立体配座をとるとするのは、薬理的知見から予想された trans 型(二面角 O-C-C-N が約 180°)とは大きく異なっていた。そこで、サントリー研究所の石黒正路氏の協力を得て、X線結晶構造解析により決定されたロドプシンの構造をもとにムスカリン受容体と(s)-メタコリンとの複合体の分子モデルを構築した。その結果、複合体において(s)-メタコリンは gauche 型の立体配座の方が trans 型よりもエネルギー的に安定であることがわかり、TRNOE 解析の結果が支持された。また、メタコリンはアセチルコリンの1つの水素がメチル基に置換した化合物であるが、このメチル基の嵩高さが上記結果を生んでいる可能性もある。すなわち、受容体に結合したアセチルコリンにおいては trans 型をとっている可能性がある。このことの確認のために、立体選択的に重水素置換されたアセチルコリンを合成し、その TRNOE の測定を試みた。結合定数、結合速度が TRNOE 測定に不相当のためか、現在までのところ TRNOE 由来のシグナルを得ることが出来ていない。一方、受容体とGタンパク質の複合体は、受容体単独の時に比べてアゴニストに親和性が高いことが知られている。受容体・Gタンパク質複合体は遷移状態に対応するが、その時リガンドはトランス型の立体配座を取るという可能性が考えられる。そこで、ムスカリン受容体変異体・G $\alpha$ 融合タンパク質を大量に発現し、精製する試みを行った。予備的実験で精製に成功したが、精製標品はアゴニストに高親和性を示さなかった。そこで、改めてアゴニストに高親和性を示す条件の検討を膜標品で行った。ムスカリン受容体でも受容体変異体(細胞内第三ループ欠損)でも、Gタンパク質 $\beta\gamma$ サブユニットを共発現したときに著名な高親和性結合が見られることが分かった。また、恒常的活性を示すムスカリン受容体変異体を調製する試みも行った。

### (4) 受容体構造解析グループ

#### ① m4 ムスカリン受容体の細胞内第三ループC末端の部分ペプチド(m4I3C)の活性と応用

m4I3C が Gi の  $\alpha$  サブユニットを特異的に活性化することを既に示しているが、さらに生理的条件下でG蛋白質を特異的に活性化できることを明らかにした。

すなわち、脂質小胞に再構成した三量体の Gi1, Go, Go5q(Go $\alpha$  サブユニットのC末端5残基を Gq $\alpha$  の配列に置換してレセプター特異性を Gq タイプに変えた物)への効果を調べたところ、m4I3C は Gi, Go を強く活性化したが、Go5q の活性化には高濃度を要した。なお、従来 Gi/o の活性化剤として頻用されてきたマストパランに比べて低濃度で活性化した。また、マストパランは牛大脳膜画分に存在する三量体G蛋白質と低分子量G蛋白質の両方を活性化したが、m4I3C は三量体G蛋白質を特異的に活性化した。更に、m4I3C(14)をヒト好中球由来の K562 細胞に作用させたところ、おそらく Gi の活性化を介して、活性酸素を発生させた(この反応は PTX で阻害

された)。m4I3C はマストパランに比べて格段に細胞毒性が低いので、生理的な Gi/o 活性化剤として非常に有用であると期待される。

## ② Gi1 $\alpha$ と m4I3C との共結晶の作成

レセプターのG蛋白質活性化部位がG蛋白質に結合した時の立体構造および活性化状態でのG蛋白質の詳細な立体構造を解析するために、Gi1  $\alpha$  と m4I3C との共結晶の作成を試みている。full-length の Gi1  $\alpha$  は m4I3C が共存すると会合・沈殿してしまうが、N末端 29 残基を削った Gi1  $\alpha$ - $\Delta$ N は m4I3C を入れても単分散状態であることがわかった。また、結晶化のために Gi1  $\alpha$ - $\Delta$ N を高度に精製した。今後、質の良い共結晶を作成してX線で複合体の構造を決定する。

## ③ 安定同位体ラベルペプチドの発現系の改良

レセプターのG蛋白質活性化部位がG蛋白質に結合した時の立体構造は TRNOE という NMR の手法でも解析できる。そのためには m4I3C を大腸菌で発現させて安定同位体ラベルする必要があるが、従来の方法では発現効率が悪かった。mRNA の分解が少ないホストと codon usage を大腸菌に合わせた plasmid を用い、更に精製方法を改良することによって、ペプチドの発現効率を3倍に向上させる事ができた。今後、Gi1  $\alpha$ - $\Delta$ N に結合した m4I3C の構造を TRNOE により決定する。

## 3. 研究実施体制

### (1) 発現・結晶化、リガンドスクリーニング、コリントランスポーターグループ

#### 1. グループ長

芳賀 達也(学習院大学理学部生命分子科学研究所:教授)

#### 2. 研究項目

受容体などの大量発現・結晶化、リガンドスクリーニング系の確立・リガンド同定、コリントランスポーター

### (2) 結晶解析グループ

#### 1. グループ長

豊島 近(東京大学分子細胞生物学研究所:教授)

#### 2. 研究項目

電子顕微鏡・X線による構造解析

### (3) リガンド構造解析グループ

#### 1. グループ長

廣田 洋(理化学研究所ゲノム科学総合研究センター:チームリーダー)

#### 2. 研究項目

TRNOE によるリガンドの構造解析

### (4) 受容体構造解析グループ

#### 1. グループ長

若松 馨(群馬大学工学部:助教授)

## 2. 研究項目

受容体構造変化の NMR による解析

## 4. 研究成果の発表

### (1) 論文発表

- Guo, Z.-D., Suga, H., Okamura, M., Takeda, S. and Haga, T. : Receptor-G alpha fusion proteins as a tool for ligand screening. *Life Sci.*, 68, 2319-2327 (2001)
- Shui, Z., Khan, I.A., Haga, T., Benovic, J.L. and Boyett, M.R. : Control of the cardiac muscarinic K<sup>+</sup> channel by beta-arrestin2. *J.Biol.Chem.*, 276,11691-11697(2001)
- Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H., and Touhara, K. : Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J. Neurosci.*, 21, 6018-6025 (2001)
- Shiina, T., Arai, K., Tanabe, S., Yoshida, N., Haga, T., Nagao, T., and Kurose, H. : Clathrin Box in G Protein-coupled Receptor Kinase 2. *J. Biol. Chem.*, 276, 33019-33026 (2001)
- Haga, T., Haga, K. Kameyama, K., Tsuga, H. and Yoshida, N. : Regulation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Methods in Enzymol.*, 343, 559-577 (2001)
- Furukawa, H., Haga, T., Muto, Y., Yokoyama, S., Hamada, T. and Hirota, H. : Conformation of (S)-methacholine bound to the M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor. *Life Sci.*, 68, 2621 (2001)
- Zhang, L. and Saffen, D.W. : Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms: molecular structures and functional characterization. *J.Biol.Chem.*, 276, 13331-13339 (2001)
- Guo, F.-F., Kumahara, E. and Saffen, D.W. : A CalDAG-GEFI/Rap1/B-Raf cassette couples M1 muscarinic acetylcholine receptors to the activation of ERK1/2. *J.Biol.Chem.*, 276,25568-25581 (2001)
- Misawa, H., Nakata, K., Matsuura, J., Nagao, M., Okuda, T. and Haga, T. : Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*, 105,87-98 (2001)
- Kobayashi, Y., Okuda, T., Fujioka, Y., Matsumura, G., Nishimura, Y. and Haga, T. : Distribution of the high-affinity choline transporter in the human and macaque spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 317, 25-28 (2002)
- Hua, S., Ma, H., Lewis, D., Inesi, G. and Toyoshima, C. : Functional role of “N” (Nucleotide) and “P” (Phosphorylation) domain interactions in the sarcoplasmic reticulum (SERCA) ATPase. *Biochemistry*, 41, 2264-2272 (2002)
- Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., Suzuki, H. and Toyoshima, C. : Organization of

cytoplasmic domains of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in E1P and E1ATP states: a limited proteolysis study. FEBS Lett., 505, 129-135 (2001)

- Danko, S., Daiho, T., Yamasaki, K., Kamidochi, M., Suzuki, H. and Toyoshima, C. : ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase has a compact conformation resistant to proteinase K, V8 protease and trypsin. FEBS Lett., 489, 277-282 (2001)
- Zhang, Z., Lewis, D., Sumbilla, C., Inesi, G. and Toyoshima, C. : The role of the M6-M7 Loop (L67) in stabilization of the phosphorylation and  $\text{Ca}^{2+}$  binding domains of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA). J. Biol. Chem., 276, 15232-15239 (2001)
- Motoyama, T., Nakasako, M. and Yamaguchi, I. : Crystallization of scytalone dehydratase F162A mutant in the unligated state and a preliminary X-ray diffraction study at 37 K. Acta Cryst. Sect., D58, 148-150 (2002)
- Nakasako, M. : Large-scale networks of hydration water molecules around proteins investigated by cryogenic X-ray crystallography. Cell. Mol. Biol., 47, 767-790 (2001)
- Nakasako, M., Fujisawa, T., Adachi, S., Kudo, T. and Higuchi, S. : Large-scale domain movements and hydration structure changes in the active-site cleft in unligated glutamate dehydrogenase from Thermococcus profundus studied by cryogenic X-ray crystal structure analysis and small-angle X-ray scattering. Biochemistry, 40, 3069-3079 (2001)
- Endo, I., Nojiri, M., Tsujimura, M., Nakasako, M., Nagashima, S., Yohda, M. and Odaka, M. : Fe-type Nitrile Hydratase. J. Inorg. Biochem., 83, 247-253 (2001)

#### 総説、単行本など

- 芳賀達也「Gタンパク質共役受容体:最近の進歩」蛋白質・核酸・酵素 46,1764-1771 (2001)
- 豊島 近、中迫雅由、野村博美、小川治夫「筋小胞体カルシウムポンプの構造決定」蛋白質・核酸・酵素 46, 1374-1380 (2001)
- 豊島 近、「カルシウムポンプの構造と能動輸送のメカニズム」現代化学 8月号(通巻365号), 22-28 (2001)
- 豊島 近、中迫雅由、野村博美、小川治夫「筋小胞体カルシウムポンプの構造決定」日本放射光学会誌 14, 42-48 (2001)

#### (2) 特許出願

国内2件