

「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。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。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。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。いくつかの結晶様構造物が生成したのでX線回折実験を試みたが、回折点が観察されるものはまだ見出されていない。膜タンパク質の結晶化条件については豊島近が筋小胞体カルシウムATPaseを用いて検討し、2.6Å分解能での3次元構造の決定に成功した。ムスカリン受容体に結合したメタコリンの立体構造をTRNOE (Transferred Nuclear Overhauser Effect)を用いて推定した。新しいリガンドスクリーニング系として受容体・Gα融合タンパク質を用いる系を検討した。Giに共役した受容体については、簡便な結合実験でアゴニストとアンタゴニストを識別できるリガンド検索系として利用可能と考えられる。

2. 研究実施内容

(1) 発現・結晶化グループ

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る系を確立した。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、約10mgの精製受容体の調製が可能である。

Gタンパク質共役受容体はジギトニン中で安定だが、ジギトニンは受容体に多量に結合し、受容体の2次元及び3次元結晶化を阻害する。不可逆的リガンド結合後可溶化しコバルトカラムで精製する方法、あるいはジギトニン中で可溶化・精製後他の界面活性剤に置き換える方法で、ほぼジギトニンフリーの精製受容体が調製出来るようになった。この標品はリン脂質2重膜にうまく再構成された。しかし、まだ規則的な配列を取るまでには至っていない。タンパク質に対するリピドの比率を徐々に下げた状態で再構成する条件を探している。3次元結晶化条

件ではいくつかの結晶用生成物が得られ、低温X線回折を試みたがまだ回折点は観測されない。このような構造物が出来た周辺の条件を集中的に検討している。

(2) リガンドスクリーニンググループ

受容体とGタンパク質 α サブユニットの融合タンパク質を用いたリガンドスクリーニング系を確立するために、多数の融合タンパク質を作成し、解析した。受容体としてはムスカリン受容体M1-M5サブタイプ、 β 2アドレナリン受容体、ノシセプチン受容体、Gタンパク質としてはGs、G11、Gi1、Gi2、G16などを用いた。GsやGiと共役する受容体については、融合タンパク質を発現させた膜標品を用いた $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S結合実験により、アゴニスト、アンタゴニスト、部分アゴニストを識別したスクリーニングが可能であることがわかった。融合タンパク質は受容体とGタンパク質相互作用のモデル系としても有用で、両者の相互作用にMgイオンが必要であることが分かった。Gqと共役する受容体についてはアゴニストの効果が小さく、リガンドスクリーニング系としては適当ではなかった。ノシセプチン受容体-Gi2を用いて、ファージディスプレイ法による6個のアミノ酸からなるランダムペプチドのスクリーニングを行った。その結果、ノシセプチンに一部相同性をもつペプチドなどがアンタゴニスト活性を持つものとして同定された。しかし現在のところ、それをもとに合成したペプチドには弱いアンタゴニスト活性しか観察されていない。今後長いランダムペプチドについて同様な実験を行う予定である。

(3) 結晶解析グループ

発現・結晶化グループで得たムスカリン受容体の結晶生成物を低温X線結晶回折装置にかけた。サンプルは、(1)大きさ100ミクロン四方、不定形、複屈折なし、(2)大きさ10数ミクロン、球状、複屈折あり、(3)大きさ200ミクロン四方、四角、複屈折あり、の3種類であった。(1)、(2)からは明瞭な回折パターンを得ることができなかったが、8 Å 分解能付近に、タンパク質に特徴的なリングパターンを確認することができた。(3)は明らかに塩であることが判明した。

豊島らは筋小胞体カルシウムATPaseの結晶構造解析を進めている。X線結晶解析にかかるまでに板状結晶を厚くできたので、Spring-8でデータ収集を行い、2.6 Å 分解能の構造解析に成功した。この結晶はカルシウム存在下のものではあったが、非存在下で得られるチューブ状結晶構造と比較したところ、低分解能での比較ではあるが大きな構造変化が認められた。この結果はNatureに投稿中である。また、微小結晶の解析に電子線回折を利用できるよう、回転カメラの設計・製作を進めてきたが一応の完成を見ることが出来た。

(4) リガンド構造解析グループ

ムスカリン受容体に結合したメタコリンの立体構造、特に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昨年度に引き続き行った。メタコリンとの非特異的相互作用が強く、NMR測定の妨害となるジギトニンの量を、コール酸ナトリウムで極力置換することにより、NMRによる定量的な解析が可能になった。試料溶液のNOESY測定（2次元NMRの一手法）後に、アンタゴニストであるアトロピンを加えて同条件でNOESYを測定し、両者の差をとることで受容体に結合したメタコリン由来のTRNOEが定量できた。それに基づき、受容体に結合したメタコリンの立体構造を解析したところ、 $C\alpha-C\beta$ 内部回転角（ $N-C\alpha-C\beta-O$ ）が0度に近いシス型の立体配座であることが明らかになった。この立体配座は、従来予想されていたトランス型のものとは大きく異なっている。メタコリンはアセチルコリンの1つの水素がメチル基で置換された同族体であるが、このメチル基が同一分子内のトリメチルアミノ基と立体障害を起こして立体配座に影響を与えている可能性も考えられる。そこで、重水素置換されたアセチルコリンについてTRNOEの測定を今後行う予定である。

(5) 受容体構造解析グループ

ムスカリン受容体の大腸菌での発現量を向上させる試みを行った。GoおよびGi1 α サブユニットの共発現、可溶化時にGi1 α およびGo α の添加を試みたが、効果は小さかった。BL21（DE3）の代わりにC41（DE3）とC43（DE3）で受容体を発現させたが、発現量は増加しなかった。大腸菌で使用頻度の低いArg, Ile, Leu, Proのコドンに対応するtRNAを過剰発現させる宿主BL21（DE3）CodonPlus—RILと—RPでの受容体の発現を調べた。CodonPlus—RILは効果がなかったが、CodonPlus—RPは0.10 mg/Lから0.15 mg/Lへと50%ではあるが発現量が増加した。

受容体がGタンパク質を活性化する機構（Gタンパク質 α サブユニットからのGDPの解離を促進させる機構）を研究した。Gi1 α 分子中に存在する $\alpha 5$ ヘリックスと $\beta 2/\beta 3$ ループとの間のイオンペアが受容体による構造変化情報をGDP結合部位へと伝達していることが明らかとなった。受容体分子の中でGタンパク質と結合する細胞内第二ループと第三ループとはお互いに相互作用していると考えられている。その相互作用を解析する方法を開発するために、リン脂質二重膜中でダイマーを形成すると考えられているマガイニン2の脂質二重膜中の立体構造をTRNOEで解析した。 α ヘリックスを形成した2つの分子が逆平行に結合している事が明らかとなった。

(6) その他

コリン作動性神経に特異的に発現している高親和性コリントランスポーターのクローニングに成功した。線虫及びヒトのゲノム情報を利用したクローニングで、この方法は他のタンパク質のクローニングにも応用可能と考えられる。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Iwata, K., Ito, K., Fukuzaki, A., Inaki, K. and Haga, T. Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur.J.Biochem.*, 263, 596-602 (1999)
- Shibasaki, T., Moroi, K., Nishiyama, M., Zhou, J., Sakamoto, A., Masaki, T., Ito, K., Haga, T. and Kimura, S. Characterization of the carboxyl terminal-truncated endothelin B receptor coexpressed with G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochem.Mol.Biol.Int.*, 47, 569-577 (1999)
- Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T., and Katsura, I. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nature Neurosci.*, 3, 120-125 (2000)
- Furukawa, H. and Haga, T. Expression of functional M2 muscarinic acetylcholine receptor in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 127, 151-161 (2000)
- Shiozaki, K., Iseki, E., Uchiyama, H., Watanabe, Y., Haga, T., Kameyama, K., Ikeda, T., Yamamoto, T. and Kosaka, K. Alterations of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in diffuse Lewy body disease: relation to Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg.Psychiatry*, 67, 209-213 (1999)
- Kassack, M., Hogger, P., Gschwend, D., Kameyama, K., Haga, T., Graul, R. and Sadee, W. Molecular modeling of G-protein coupled receptor kinase 2: Docking and biochemical evaluation of inhibitor. *AAPS Pharmsci*, 2(1), article 2 (<http://www.phamasci.org>) (2000)
- Ogawa, H., Haga, T., and Toyoshima, C.:Soluble P-type ATPase from an Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *FEBS Lett.*, 47, 99-102 (2000)