

「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 生命分子科学研究所 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いる。特に適当なリン脂質を加えた条件での結晶化を集中的に検討した。いくつかの結晶様構造物が生成したが、回折点の観察には至っていない。ムスカリン受容体に結合したメタコリンとムスカリンの立体構造 ($C\alpha$ - $C\beta$ 内部回転角) を TRNOE (Transferred Nuclear Overhauser Effect) を用いてゴーシュ型と決定した。G タンパク質共役受容体のリガンドスクリーニング系として受容体・ $G\alpha$ 融合タンパク質を用いる系を確立した。ノシセプチン受容体と $Gi2\alpha$ の融合タンパク質を用いて、ブタ脳抽出液中のノシセプチンを高い S/N 比で検出できることを示した。ゲノム配列より G タンパク質共役受容体を検索する系を開発し、ヒトゲノムより新規 G タンパク質共役受容体 350 - 400 種を同定した。

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 - 60mg の膜受容体を発現させ、10 - 15mg 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 種の受容体を調製した。

ムスカリン受容体変異体をジギトニン中で可溶化、アフィニティーカラムで精製後、高親和性リガンド QNB を結合させて受容体を安定化させ、その後ジギトニンを他の界面活性剤に変える方法を採用した。主としてアルキルマルトシドを用いて、大部分のジギトニンを置換させ、かなり安定な受容体精製標品が得られた。いくつかの結晶様生成物が得られ、X 線回折を試みたが回折点は観測されなかった。また、ロドプシンの結晶化が成功したと同じあるいはその類似の条件を

網羅的に検討したが、結晶あるいは結晶様生成物は得られなかった。現在は、精製受容体に種々のリン脂質を加える条件での結晶化を試みている。また、従来の標品では C 末端側に 6 X His のタグが付いていたが、それを外した標品についても十分精製が可能であることを確認し、その結晶化の検討を始めた。

(2) リガンドスクリーニンググループ

ノシセプチン受容体と Gi2 α の融合タンパク質を用い、脳の抽出物にわずかに含まれる内在性のノシセプチンを高い S/N 比で検出することができた。この結果は、受容体 - G α 融合タンパク質がオーファン受容体のリガンド検索系として使用可能であることを示唆する。

生体内にはリガンドが知られていないオーファン受容体が多数存在する。オーファン受容体のリガンド及び機能の同定は、全ゲノム塩基配列決定後の重要な研究課題の 1 つである。我々は、G タンパク質共役受容体遺伝子の多くがそのタンパク質コード領域にイントロンを含まないことおよび G タンパク質共役受容体が 7 回膜貫通という共通構造を持つことを利用して、ヒトゲノムから G タンパク質共役受容体遺伝子を網羅的に検索した。その結果、匂い受容体 322 個 (既知のもの 44 個を含む)、味受容体 22 個 (既知のもの 11 個を含む)、その他の受容体 178 個 (既知のもの 128 個を含む) を同定した。これら以外に、既知の受容体とは相同性を持たないが、G タンパク質共役受容体の遺伝子である可能性のあるもの 59 個を同定した。この解析における既知受容体の検索効率から、ゲノム全体では約 1000 個の G タンパク質共役受容体の遺伝子が存在し、その半数は匂い受容体であると推測した。

PC12D 細胞を用いて、ムスカリン M1 受容体刺激から ERK1/2 の活性化への新しい経路を見いだした。M1 受容体が活性化されると Gq/11 を介してホスホリパーゼ C が活性化され、その結果、イノシトール三リン酸 (IP3) とジアシルグリセロール (DAG) が産生される。IP3 の産生に伴い、小胞体から Ca が放出され、また細胞外からの Ca 流入が引き起こされる。細胞内 Ca と DAG が増加すると、Ca と DAG 依存性のヌクレオチド交換因子 (CalDAG-GEFI) が活性化され、その結果、低分子量 G タンパク質 Rap1 が活性化される。Rap1 が活性化されることによって、B-Raf, MEK, ERK1/2 が次々に活性化される。本研究によって最近発見された CalDAG-GEFI の細胞内機能は始めて明らかになった。TRP6 Ca チャネルの三つのアイソホーム (TRPA, B, C) の cDNA のクローニングを行った。それらの性質を調べた結果、TRP6A と B は、mAChR の直接的な制御を受けること、TRP6A は N - 末端の部分を通じて DAG により活性化されることなどが明らかになった。

(3) 結晶解析グループ

当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、いかな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、非常に薄い三次元結晶しか得られなかったが、カルシウム ATPase のカルシウム結合状態の高分解能三次元構造解析を完成し、Nature 誌に発表した。同誌の表紙にもなり、多大なインパクトを与えることが出来た。さらにこの解析で成功した結晶化法を発展させ、他の2つの生理的状态の結晶を得ることも出来た。この結晶は環境変化に非常に弱かったため、低温室内での急速凍結技術を開発した。さらに、カルシウム ATPase の細胞質領域と良く似た蛋白質が古細菌の遺伝子解析から見つかったが、その機能は不明であった。そこで、この蛋白質が実際に P 型 ATPase であることを実験的に証明した。可溶性蛋白質であれば結晶化はずっと容易と期待されるので、このようなアプローチも構造情報を得る有効な手段と考えている。

(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を昨年度推定したが、それについて更に詳細な NMR(核磁気共鳴)法の解析を行った。また、本年度は新たにムスカリンの受容体結合時の立体構造の検討も行った。

方法は、昨年度と同様の方法を用いた。つまり、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 を観測した。そして、その TRNOE のシグナル強度から、個々のプロトン間の距離を求め、メタコリンの立体構造、特に C α -C β 内部回転角(O-C-C-N)を求めた。昨年度は測定の混合時間(NOEの待ち時間)を150ミリ秒と長めで測定したが、今回は、それを50ミリ秒と短くすることで、スピン拡散による間接的な NOE を除去し、より定量性の高いデータを得ることができた。

その結果、受容体結合時の(s)-メタコリンと(+)-ムスカリンの立体配座は両方とも *gauche* 型(二面角 O-C-C-N が約60°)であることが分かった。この立体配座は、溶液中のリガンドの立体配座(二面角 O-C-C-N が約90°)が約30°回転したものであり、以前予想されていた *trans* 型とは大きく異なっていた。今後は、更に立体選択的に重水素置換されたアセチルコリンについて TRNOE の測定を行う予定である。また、アゴニストに高親和性を示す受容体・Gタンパク質複合体を調製し、そこに結合したリガンドの構造決定を行う系の確立を目指している。

(5) 受容体構造解析グループ

(a) 受容体大量発現系の検討

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。使用されるコドンの頻度 (codon usage) は種によって異なり、codon usage は蛋白質の発現効率に大きく影響する。m2 ムスカリン受容体は maltose-binding protein (MBP) を N 末端に結合させた融合蛋白質として発現しているが、N 末端付近の codon usage は特に発現効率に影響するため、MBP の codon usage を大腸菌に合わせた。すると発現量が1.9倍に上昇した。しかしながら、NMR 測定に必要な量の安定同位体ラベルした m2 ムスカリン受容体を調製するにはまだ発現量が低いので、更なる発現効率の上昇を検討している。

(b) 受容体が G タンパク質を活性化する機構

前年度では、従来不明であった、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 $Gi1\alpha$ について解明した ($Gi1\alpha$ 分子中に存在する $\alpha 5$ ヘリックスと $\beta 2/\beta 3$ ループとの間の塩橋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)。 $Gi1\alpha$ で明らかにされたこの機構が他の G タンパク質についても働いているのかを G_s で調べた。発表されている G_s の α サブユニットの X 線結晶構造には塩橋が存在していないが、アミノ酸配列の保存性から塩橋を形成していると予測される残基を置換したところ、PACAP 受容体によって活性化されなくなった。そこで、 G_s でも塩橋が受容体による活性化に重要である事が確認された。

(c) Gi を選択的に活性化する m2 ムスカリン受容体部分ペプチドの発見

m2 ムスカリン受容体の細胞内第三ループ C 末端側の14残基のペプチドを調製し、G タンパク質活性化能を調べた。m2 ムスカリン受容体で活性化されない $Gi1$ のミュータントをこのペプチドは活性化しなかったが、野生型の $Gi1$ を非常に強く活性化した。また、活性化の程度は今まで知られているどの低分子化合物よりも大きかった。さらに、このペプチドは m2 ムスカリン受容体と同様に G_s を活性化しなかった。そこで、このペプチドは m2 ムスカリン受容体の非常に良い低分子モデルとなると期待される。このペプチドと G タンパク質との共結晶が作成できれば、受容体による活性化に伴う G タンパク質の立体構造が明らかにできるので、高度に精製された $Gi1\alpha$ の調製と結晶化条件の初歩的な検討を行った。また、G タンパク質に結合した時のペプチドの立体構造を決定するために必要な安定同位体ラベルしたペプチドを調製した。

(d) アミノ酸選択的に安定同位体でラベルした G タンパク質の NMR

受容体による活性化に伴う G タンパク質 α サブユニットの立体構造変化を解析するために、 ^{13}C と ^{15}N でアミノ酸選択的にダブルラベルした $Gi1\alpha$ を調製し溶液 NMR で解析した。m2 ムスカリン受容体部分ペプチドを加えると多くのシグナルの中で特定のシグナルだけが変化した。現在、その変化したシグナ

ルの帰属を行っている。溶液の NMR では蛋白質分子量に制限があるが、固体 NMR では制限がない。そこで、ラベルした Gi1 α の固体 NMR を測定したところ、Gi1 α 分子の 1 つの残基に由来するシグナルが観測された。受容体が充分量調製できれば、その構造や運動性の解析にも有用であると期待される。

(e) bicelle の characterization と NMR

bicelle は長い側鎖を持つリン脂質と界面活性剤とが構成する会合体で、中央部分は二重膜、端はミセルの構造を持つ円盤である。小さな bicelle に受容体を取り込めば、種々の溶液 NMR の手法が使える。そこで、受容体を取りこめる程度の大きさの bicelle について、基礎的な性質を光散乱と NMR で characterize した。dimyristoylphosphatidylcholine(DMPC)と CHAPSO で作った bicelle が NMR 測定に適していること、また、濃度や温度を変えても、ペプチドを取り込ませても bicelle のサイズが変わらないことがわかった。bicelle に組み込んだ蛋白質がどの程度のスペクトルを与えるのかを調べるために、¹⁵N でラベルしたマストパラン X を bicelle に入れて NMR を測定した。受容体を充分取りこめる直径約 100 の bicelle に組み込んだマストパラン X は 20 の低温でもシグナルを与えた。そこで、この bicelle にラベルした受容体を組み込んでもシグナルは充分観測できると期待される。

(f) 脂質二重膜に結合したマガイニン 2 の立体構造決定

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。その相互作用を受容体の部分ペプチドを用いて解析する方法を開発するために、マガイニン 2 の脂質二重膜中のダイマー構造を TRNOE で決定した。2 本の SS 結合で架橋され、決定したダイマーの立体構造を保持するようなペプチドをデザインして化学合成したところ、マガイニン 2 の活性を示したので、TRNOE で決定した構造の正しさが確認された。また、大腸菌での発現が従来困難であったペプチドを発現させる方法を見出した。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Okuda, T. and Haga, T. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett.*, 484 : 92-97 (2000)

Usui, H., Nishiyama, M., Moroi, K., Shibasaki, T., Zhou, J., Ishida, J., Fukamizu, A., Haga, T., Sekiya, S. and Kimura, S. RGS Domain in the Amino Terminus of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 Inhibits Gq-Mediated Signaling. *Int. J. Mol. Med.*, 5 : 335-340 (2000)

Hirabayashi, T and Saffen, D. M1 muscarinic acetylcholine receptors activate zif268 gene expression via small G protein Rho-dependent and -independent

pathways in PC12D cells. *Eur. J. Biochem.*, 267 : 2525-2432 (2000)

Zhang, L. and Saffen, D. Muscarinic acetylcholine regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms : molecular structures and functional characterizations. *J. Biol. Chem.*, 276 : 13331-13339 (2001)

C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura and H. Ogawa : Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405 : 647-655 (2000)

C. Toyoshima : Structure determination of tubular crystals of membrane proteins. I. Indexing of diffraction patterns. *Ultramicroscopy*, 84 : 1-14 (2000)

K. Yonekura and C. Toyoshima : Structure determination of tubular crystals of membrane proteins. II. Averaging of tubular crystals of different helical classes. *Ultramicroscopy*, 84 : 15-28 (2000)

K. Yonekura and C. Toyoshima : Structure determination of tubular crystals of membrane proteins. III. Solvent flattening. *Ultramicroscopy*, 84 : 29-45 (2000)

H. Ogawa, T. Haga, C. Toyoshima : Soluble P-type ATPase from an archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *FEBS lett.*, 471 : 99-102 (2000)

S. Hua, G. Inesi and C. Toyoshima : Distinct topologies of mono-and decavanadate binding and photooxidative cleavage in the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 275 : 30546-30550 (2000)

A. Zhang, D. Lewis, C. Strock, G. Inesi, M. Nakasako, H. Nomura, C. Toyoshima : Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca²⁺ binding and catalytic activation in the Ca²⁺ transport (SERCA) ATPase. *Biochemistry*, 39 : 8758-8767 (2000)

T. Hara, H. Kodama, M. Kondo, K. Wakamatsu, A. Takeda, T. Tachi, & K. Matsuzaki : Effects of peptide dimerization on pore formation : antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analog, *Biopolymers*, 58 : 437-446 (2001)