

審査の結果の要旨

氏名 奥出 順也

μ オピオイド受容体が細胞内シグナルを選択的に活性化する機構の解明と題する本論文は、G タンパク質共役型受容体(GPCR)の一種であるヒト由来 μ オピオイド受容体(μ OR)を、溶液 NMR 法を用いて解析した成果を述べたものである。本論文は全 4 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に材料と方法が記されている。第 3 章に実験結果がまとめられ、第 4 章でその結果に対する考察および今後の展望について記述されている。

第 3 章においては、まず、解析対象とする μ OR の調製を行っている。次に、アンタゴニストおよび部分アゴニスト、完全アゴニスト、G タンパク質をより活性化する部分アゴニスト存在下における μ OR のシグナル伝達活性を評価している。最後に、溶液 NMR 法を用いて、上述のリガンド存在下における μ OR の動的構造を解析している。

μ OR は、界面活性剤ラウリルマルトースネオペンチルグリコール(LMNG)のミセル中にて精製したのち、reconstituted high-density lipoprotein (rHDL)の脂質二重膜中に再構成している。そこで、rHDL に再構成された μ OR を用いて、アンタゴニストおよび部分アゴニスト、完全アゴニスト存在下における G タンパク質シグナルおよびアレスチンシグナルの活性を評価し、調製した μ OR がリガンドの efficacy 依存的に両シグナルを活性化することを示している。さらに、G タンパク質をより活性化する部分アゴニスト存在下およびアレスチンシグナルをより活性化する変異体についても、G タンパク質シグナルおよびアレスチンシグナルの活性を評価し、両状態のシグナル選択性の度合いすなわち bias factor を算出している。以上のようにより、各リガンドが結合した μ OR およびアレスチンシグナルをより活性化する変異体に関して、それぞれのシグナル伝達活性を定量的に評価することに成功している。

続いて、アンタゴニストおよび完全アゴニストを添加して、部分重水素化およびメチオニン

残基選択的標識を施した μ OR の HMQC スペクトルを取得している。立体構造上離れている M163、M245、M283 の化学シフトがアンタゴニスト存在下と完全アゴニスト存在下で異なり、活性化に伴う広範な領域の構造変化が NMR 法で観測されたことを示している。特に、TM5 に位置する M245 のシグナルに関して、アンタゴニスト結合状態では不活性化状態に対応する低磁場側のシグナルが、完全アゴニスト結合状態では活性化状態に対応する高磁場側のシグナルが強く観測されていることを示している。また、部分アゴニスト結合状態の μ OR についても HMQC スペクトルを取得し、活性化状態および不活性化状態に対応する M245 のシグナルが同程度の強度で観測されていることを示している。さらに、G タンパク質をより活性化する部分アゴニスト結合状態の μ OR およびアレスチンシグナルをより活性化する変異体の HMQC スペクトルを取得し、活性化状態に対応する M245 のシグナルの化学シフトが、G タンパク質をより活性化する部分アゴニスト結合状態、部分アゴニスト結合状態、アレスチンシグナルをより活性化する変異体とで連続していることを示している。以上のように、各リガンドが結合した μ OR およびアレスチンシグナルをより活性化する変異体に関して、溶液 NMR 法によりそれぞれの動的構造を解析することに成功している。

第 4 章では、各状態のシグナル伝達活性と動的構造との対応から、 μ OR が細胞内シグナルを選択的に活性化する機構について考察している。その内容は、活性化状態の μ OR が G タンパク質シグナルをより活性化する状態とアレスチンシグナルをより活性化する状態との間で交換しており、バイアスリガンドはこの両状態間の平衡を変化させることでシグナルの選択性を発揮しているという新しい概念を提唱するものである。

以上の成果は、これまで不明であった GPCR が細胞内シグナルを選択的に活性化する機構を動的構造の見地から明らかとしたものであり、これを行った学位申請者は博士（薬科学）の学位を得るにふさわしいと判断した。