

論文の内容の要旨

論文題目 アロステリックモジュレーターによるアデノシン A_{2A} 受容体の活性制御機構の解明

氏名 近藤 啓太

【序】

G 蛋白質共役型受容体の一種であるアデノシン A_{2A} 受容体 (A_{2A}AR) は中枢神経系や血小板に多く存在し、神経伝達や炎症反応に寄与している。A_{2A}AR に作用する化合物はパーキンソン病や炎症、喘息などに対する治療薬になると期待されている。

これまでにさまざまな A_{2A}AR リガンドが報告されているが、その中でもアミロライドやその誘導体は通常のリガンドとは異なる性質を持つことが知られている。それは、A_{2A}AR から逆アゴニストが解離する速度を変化させるという性質である。このことから、アミロライドは A_{2A}AR に非競合的に結合するリガンド、すなわちアロステリックモジュレーターであると考えられている (図 1)。このような化合物は、従来のオルソステリックな薬剤とは異なる特徴的な薬剤になる可能性がある。そのような薬剤を理論的に開発する上で、アミロライドによる A_{2A}AR の活性制御機構を解明することは有用である。

しかし、アミロライドと A_{2A}AR の結合様式や活性制御のメカニズムは不明であった。そこで本研究では、アミロライドの結合部位や結合に伴う A_{2A}AR の構造変化を解析することで、アミロライドが A_{2A}AR の活性をアロステリックに制御する機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】

NMR 解析は以下のように行った。均一 ²H, メチル ¹³C メチオニン標識または均一 ²H, ¹⁵N 標識ヒト A_{2A}AR を酵母 *Pichia pastoris* に発現させ、界面活性剤で可溶化してリガンドアフィニティークロマトグラフィーなどによって精製した。精製した A_{2A}AR に対して、アミロライド、(N, N-ヘキサメチレン) アミロライド (HMA)、およびオルソステリックリガンドである逆アゴニスト ZM241385、部分アゴニスト regadenoson と LUF-5834、アゴニスト NECA と UK-432097 のいずれかを添加して、¹H-¹³C HMQC スペクトルと ¹H-¹⁵N CRINEPT-HMQC-TROSY スペクトルを測定した。野生型と変異体のスペクトルを比較することで NMR シグナルを帰属した。

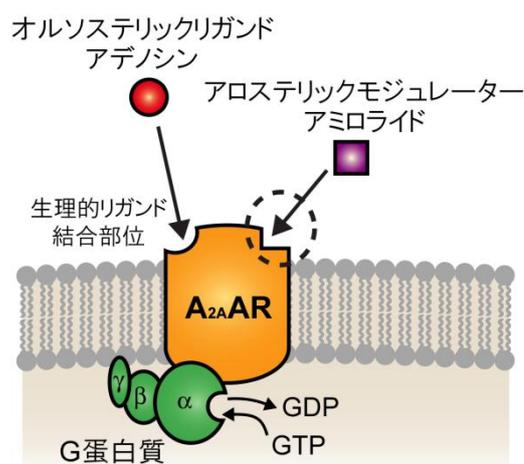


図 1 A_{2A}AR リガンドの分類。

細胞外アデノシンの結合によって A_{2A}AR は活性化し、G 蛋白質を介して細胞内にシグナルを伝達する。生理的リガンド結合部位またはそれ以外の部位に結合して A_{2A}AR の活性を変化させる化合物は、それぞれオルソステリックリガンド、アロステリックモジュレーターと呼ばれる。

オルソステリックリガンドの解離速度を測定するために、ヒト $A_{2A}AR$ を一過的に発現させた HEK293T 細胞の膜画分に 3H 標識リガンドを結合させ、過剰量の非標識リガンドを加えたときの 3H 標識リガンド結合量の経時変化を測定した。また、リガンド依存的な $A_{2A}AR$ のシグナル伝達活性を測定するために、ヒト $A_{2A}AR$ 発現 HEK293T 細胞にアゴニストまたは部分アゴニストを添加してインキュベートし、蛍光標識 cAMP と抗 cAMP 抗体を用いた競合法によって cAMP 産生量を測定した。

【結果】

1. アミロライド結合部位の同定

リガンド結合活性を保持した $A_{2A}AR$ を 95 % 以上の精製度、約 0.8 mg/L culture の収量で得た。そこで次に、アミロライドとオルソステリックリガンドが同時に結合した状態が実際に存在するのか調べた。アミロライド存在下、逆アゴニスト ZM241385 存在下、および両者が存在する状態における均一 2H , メチル ^{13}C メチオニン標識 $A_{2A}AR$ の 1H - ^{13}C HMQC スペクトルを比較したところ、リガンド結合部位に隣接する M140 の化学シフトが非直線的に変化していた (図 2)。このことから、アミロライドと逆アゴニストが同時に結合した状態が実際に存在すると結論した。

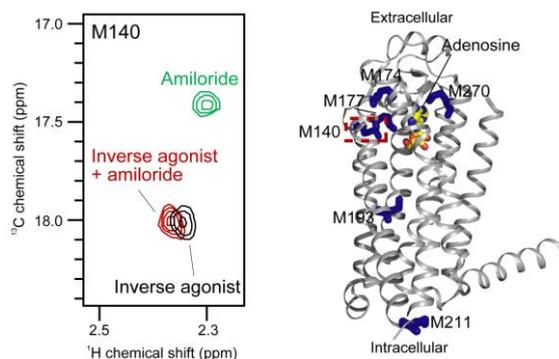


図 2 アミロライド存在下における $A_{2A}AR$ の生理的リガンド結合部位周辺の変化。

アミロライド存在下 (緑)、逆アゴニスト ZM241385 存在下 (黒)、両者の存在下 (赤) における M140 の NMR シグナルを重ねて示した。右側には、 $A_{2A}AR$ の結晶構造 (PDB ID: 2YDO) 上の M140 の位置を示した。

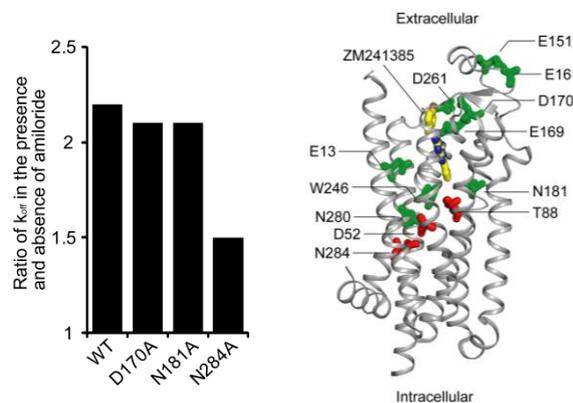


図 3 アミロライド結合部位の同定。

(左) アミロライド存在下と非存在下における野生型または変異体 $A_{2A}AR$ からの ZM241385 解離速度の変化。(右) アミロライドによる ZM241385 解離速度の増加率が 1.5 倍以下に低下した残基を赤色、それ以外を緑色で $A_{2A}AR$ の結晶構造 (PDB ID: 4E1Y) 上にマッピングした。

続いて、アミロライドの結合部位の同定を行った。まず、逆アゴニスト ZM241385 存在下で均一 2H , ^{15}N 標識 $A_{2A}AR$ の 1H - ^{15}N CRINEPT-HMQC-TROSY 測定を行ったところ、トリプトファン残基の側鎖に由来するシグナルが観測された。さらにアミロライドを添加したところ、生理的リガンド結合部位より細胞内側に位置する W129 と W246 のシグナルが顕著に先鋭化した。次に、アミロライドおよび HMA の存在下もしくは非存在下において、様々な $A_{2A}AR$ 変異体と野生型の ZM241385 解離速度を測定した。その結果、D52N, T88A, N284A などの変異体では、アミロライドや HMA による ZM241385 解離加速の程度が顕著に低下した (図 3)。NMR 解析と変異体解析で顕著な変化を示した残基は、生理的リガンド結合部位よりも細胞内側の領域に集まっていた。以上の結果から、生理的リガンド結合部位よりも細胞内側の領域がアミロライド結合部位であることが示された (図 3 右)。

2. アミロライドによる A_{2A}AR のリガンド解離速度およびシグナル伝達活性の変化

これまで、アミロライドが A_{2A}AR のシグナル伝達活性やアゴニストとの結合に与える影響については不明であった。そこで次に、アミロライドが A_{2A}AR の活性に与える作用について詳細に解析した。まず、A_{2A}AR を一過的に発現させた HEK293T 細胞とアゴニスト NECA を用いて cAMP 産生アッセイを行ったところ、アミロライド存在下では NECA 依存的な cAMP 産生が抑制された (図 4a)。

次に、アミロライドや HMA の存在下または非存在下において、A_{2A}AR からアゴニスト NECA または逆アゴニスト ZM241385 が解離する速度を測定した。その結果、アミロライドや HMA の存在下では非存在下と比較して、ZM241385 の解離速度は増加し、NECA の解離速度は減少した (図 4b)。

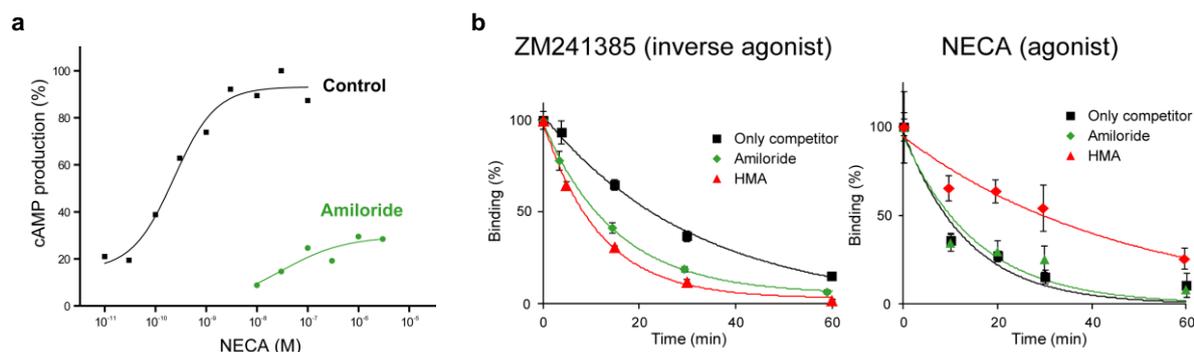


図 4 アミロライドによる A_{2A}AR の活性の変化。

a. アミロライド存在下 (緑) と非存在下 (黒) での A_{2A}AR 発現 HEK293T 細胞のアゴニスト NECA 依存的な cAMP 産生量を示した。b. アミロライド (緑) または HMA (赤) 存在下、非存在下 (黒) で逆アゴニスト ZM241385 (左) および NECA の結合量の経時変化を測定した。

3. アミロライドによる A_{2A}AR の構造変化の解析

アミロライドの結合に伴う A_{2A}AR の構造変化様式を NMR によって解析した。はじめに、A_{2A}AR のシグナル伝達活性に重要な細胞内側領域について調べることにした。そこで、活性化によって大きく構造変化する細胞内側の部位にある M211 に着目した。

均一 ²H, メチル ¹³C メチオニン標識 A_{2A}AR に様々なオルソステリックリガンドを結合させて ¹H-¹³C HMQC 測定を行った。その結果、M211 のシグナルの化学シフトは連続的に変化した (図 5a, b)。また、その化学シフトは逆アゴニスト、部分アゴニスト、アゴニストの順に並んでいた。次に、アゴニスト UK-432097 とアミロライドが同時に存在する状態で ¹H-¹³C HMQC スペクトルを測定した。すると、UK-432097 のみが存在するときと比較して M211 の化学シフトは逆アゴニスト結合状態の方向にシフトした (図 5c)。

続いて、A_{2A}AR の細胞外側の構造変化について調べることにした。そこで、分子中腹にあり、オルソステリック部位とアミロライド結合部位の両方に隣接している W129 に着目した (図 5b)。まず、アゴニスト UK-432097 または逆アゴニスト ZM241385 存在下における均一 ²H, ¹⁵N 標識 A_{2A}AR の ¹H-¹⁵N CRINEPT-HMQC-TROSY スペクトルを測定したところ、各状態で W129 は異なる化学シフトを示した。次に、逆アゴニスト ZM241385 存在下にさらにアミロライド誘導体 HMA を添加したところ、W129 の化学シフトは、逆アゴニストのみが存在する時と比較してアゴニスト存在時の方向にシフトしていた。

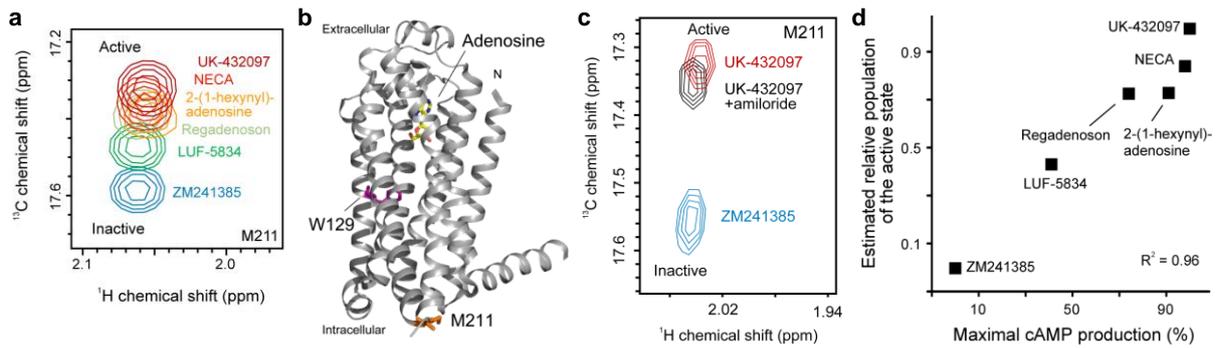


図5 A_{2A}ARの細胞内側領域における動的構造のNMR解析。

a. 各オルソステリックリガンドが結合した状態の M211 シグナルの重ね合わせ。b. アデノシン結合状態 A_{2A}AR の結晶構造 (PDB ID: 2YDO) における M211 (橙) と W129 (紫) の位置を示した。c. 逆アゴニスト ZM241385 またはアゴニスト UK-432097 結合時、UK-432097 とアミロライドの共結合時の M211 シグナルの重ね合わせ。d. M211 の化学シフト変化量から見積もった活性化コンフォメーション比率と、各リガンド結合時の最大 cAMP 産生量の相関。

【考察】

M211 の NMR シグナルの挙動から (図 5a)、A_{2A}AR の細胞内側領域は不活性型と活性型の二つの状態の平衡にあり、結合するリガンド依存的にその量比が変化することが示された。そこで、M211 の化学シフト変化量から見積もった活性化コンフォメーションの比率と、各リガンド結合時の A_{2A}AR 依存的な最大 cAMP 産生量の相関を調べたところ、両者の間には高い相関があった (図 5d)。このことから、A_{2A}AR の細胞内側領域の構造平衡における活性化コンフォメーションの比率がリガンド依存的に変化することで、シグナル伝達強度が調節されると考えた。我々は近年、G 蛋白質共役型受容体に属するβ₂ アドレナリン受容体のシグナル伝達活性が、その細胞内側領域の構造平衡の変化によって調節されることを明らかにした。よって、このような構造平衡の変化によるシグナル伝達活性の制御という機構は、G 蛋白質共役型受容体に共通する性質であることが考えられる。

そして、アミロライド結合に伴う M211 の NMR シグナルの変化から (図 5c)、アミロライドによっても細胞内側の構造平衡が不活性价態側にシフトすることが分かった (図 6)。一方、W129 のシグナルの挙動から、アミロライドや HMA の添加によってオルソステリック部位周辺の構造平衡は、アゴニストの結合に有利な活性化状態側にシフトすると考えた (図 6)。実際、アゴニストが結合しているのに細胞内側が不活性な構造をした A_{2A}AR の結晶構造が報告されていることから、アミロライド結合状態ではこのようなコンフォメーションが形成されると推測した。このような構造平衡の変化により、アミロライドや HMA の結合に伴ってアゴニストの解離速度の低下とシグナル伝達活性の抑制が起きると考えた。

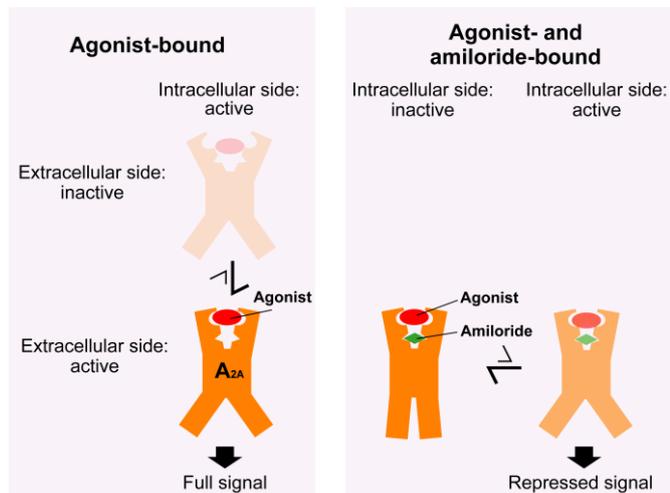


図6 アゴニスト結合状態 (左) およびアゴニストとアミロライドの共結合状態 (右) の A_{2A}AR の構造平衡の模式図。