

博士論文

論文題目 Gタンパク質によるファミリー選択的な
Gタンパク質共役型内向き整流性
カリウムイオンチャネル活性制御機構の解明

氏名 加納 花穂

略語

β 2AR	β 2 adrenergic receptor
BRET	bioluminescence resonance energy transfer
CV	column volume
D2R	dopamine D2 receptor
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltopyranoside
DOR	δ -opioid receptor
DSS	2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FRET	Förster resonance energy transfer
GD	GTPase domain
GDP	guanosine diphosphate
GIRK	G protein-gated inwardly rectifying potassium channel
GPCR	G protein-coupled receptor
GRK	GPCR kinase
GTP	guanosine triphosphate
GTP γ S	guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate
HD	helical domain
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HRV 3C	human rhinovirus 3C
HSQC	heteronuclear single quantum coherence

IP	immunoprecipitation
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
K ⁺	potassium ion
Kir	inwardly rectifying potassium channel
LB	lysogeny broth
Luc	luciferase
MSP	membrane scaffold protein
MWCO	molecular weight cut off
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	NOE spectroscopy
OD	optical density
PBS	phosphate buffered saline
PDB	protein data bank
PIP ₂	phosphatidylinositol bisphosphate
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol
ppm	parts per million
PRE	paramagnetic relaxation enhancement
PLC	phospholipase C
RMSD	root mean square deviation
RR	reduction ratio
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SN	signal-to-noise
TB	terrific broth
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TROSY	transverse relaxation-optimized spectroscopy
ul	uniformly-labeled

目次

略語	1
目次	5
第 1 章 序論	7
1-1. G タンパク質共役型内向き整流性カリウムイオンチャネル (GIRK) の機能	7
1-2. GIRK の構造	9
1-3. G タンパク質の構造	13
1-4. $G\beta\gamma$ と GIRK の相互作用様式	19
1-5. $G\alpha(GTP)$ と GIRK の相互作用様式	20
1-6. $G\alpha$ のファミリー選択的な GIRK の活性制御	22
1-7. Gai/o による GIRK の活性制御機構のこれまでの研究	24
1-8. 本研究の目的	27
1-9. 本研究の概要	27
第 2 章 材料と方法	28
2-1. 試薬	28
2-2. 培地組成	28
2-3. BRET アッセイ	32
2-4. G タンパク質の調製	35
2-4-1. $G\alpha$ の発現と精製	35
2-4-2. $G\beta\gamma$ の発現と精製	37
2-4-3. $G\alpha\beta\gamma$ の精製	39
2-5. GIRK キメラ再構成ナノディスクの調製	40
2-5-1. GIRK キメラの発現と精製	40
2-5-2. MSP1E3 の発現と精製	41
2-5-3. ナノディスク再構成	42
2-6. NMR 測定	43
2-6-1. 測定・解析条件	43
2-6-2. $Gai3\beta\gamma$ の帰属	44
2-6-3. $Gaiqi\beta\gamma$ の帰属	48
2-6-4. $G\alpha\beta\gamma$ に GIRK キメラ-ナノディスクを添加する実験	50
2-6-5. PRE 実験	50
2-7. 構造計算	52
2-7-1. 初期構造の準備	52
2-7-2. ドッキングシミュレーション	52
2-7-3. アンサンブルの構築	54

第3章 結果	56
3-1. GIRK 開口におけるファミリー選択性を決定する部位の同定.....	56
3-2. $G\alpha\beta\gamma$ 中の $G\alpha$ のメチル基シグナルの帰属.....	63
3-3. GIRK との相互作用に伴う $G\alpha i3\beta\gamma$ の NMR シグナルの変化.....	69
3-4. 常磁性緩和促進 (PRE) による $G\alpha i3\beta\gamma$ -GIRK 間の近接部位の同定.....	75
3-5. $G\alpha i3\beta\gamma$ -GIRK 複合体モデル構造の構築	78
3-6. 変異体実験による複合体モデル構造の検証	84
第4章 考察	85
4-1. GIRK 活性制御の $G\alpha i/o$ 選択性を決定する構造的要因.....	85
4-2. $G\alpha i/o\beta\gamma$ と GIRK の親和性	87
4-3. 多様な配向を含む $G\alpha i/o\beta\gamma$ -GIRK 相互作用様式	88
4-4. 活性化サイクルを通じた $G\alpha i/o$ と GIRK の共局在.....	88
4-5. 不活性状態 $G\alpha i/o\beta\gamma$ と活性化状態 $G\alpha i/o(\text{GTP})$ の結合様式の違い	90
4-6. GPCR との共局在.....	93
第5章 総括	94
参考文献	95
謝辞	101

第1章 序論

1-1. G タンパク質共役型内向き整流性カリウムイオンチャネル (GIRK) の機能

G タンパク質共役型内向き整流性カリウムイオンチャネル (G protein-gated inwardly rectifying potassium channel, GIRK) は内向き整流性カリウムイオンチャネル (inwardly rectifying potassium channel, Kir) の一種であり、心臓や脳において細胞の興奮性を制御するカリウムイオンチャネルである (1)。GIRK は細胞表面の G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) の活性化に共役してカリウムイオン (K^+) を透過する開状態と透過しない閉状態の間を遷移し、 K^+ の膜透過を制御する。

GPCR にアゴニストが結合していない不活性化状態では、GPCR の下流にてシグナルを伝達する分子である三量体 G タンパク質が不活性化型の三量体 $G\alpha\beta\gamma$ を形成しており、GIRK は閉口している (Figure 1 上段)。GPCR がアゴニストと結合し活性化した時には、 $G\alpha\beta\gamma$ の α サブユニット ($G\alpha$) に結合しているグアノシン2リン酸 (GDP) が解離してグアノシン3リン酸 (GTP) に交換する反応を GPCR が触媒し、G タンパク質は活性型の GTP 結合型 $G\alpha(GTP)$ と $G\beta\gamma$ に解離する (2)。解離した $G\beta\gamma$ が GIRK に直接結合することによって GIRK の K^+ 透過路の構造変化が誘起され、GIRK が開口する (Figure 1 下段)。GIRK は心臓のパースメーカー細胞や脳の神経細胞に発現し、ムスカリン性アセチルコリン M2 受容体、 $GABA_B$ 受容体、ドパミン D2 受容体、オピオイド受容体などの GPCR と共役している (3)。生体内では、細胞内の K^+ 濃度は約 150 mM と、細胞外の K^+ 濃度約 4 mM よりも高く、静止膜電位は K^+ の平衡電位よりも高く保たれている。したがって、GIRK が開口すると外向きの K^+ 電流が誘起され、膜が過分極し細胞の興奮性が低下する結果、心拍数の低下や抑制性神経伝達が生じる (1)。

GIRK の機能異常は、てんかんやパーキンソン病の症状に類似したひきつけ、運動失調、神経細胞死を引き起こすことが知られている (3, 4)。このことから、GIRK の適切な活性制御が正常な生理機能の維持に重要であることが示唆される。薬理的には、GIRK はてんか

んや双極性障害の治療薬の標的分子として注目されている (5, 6)。

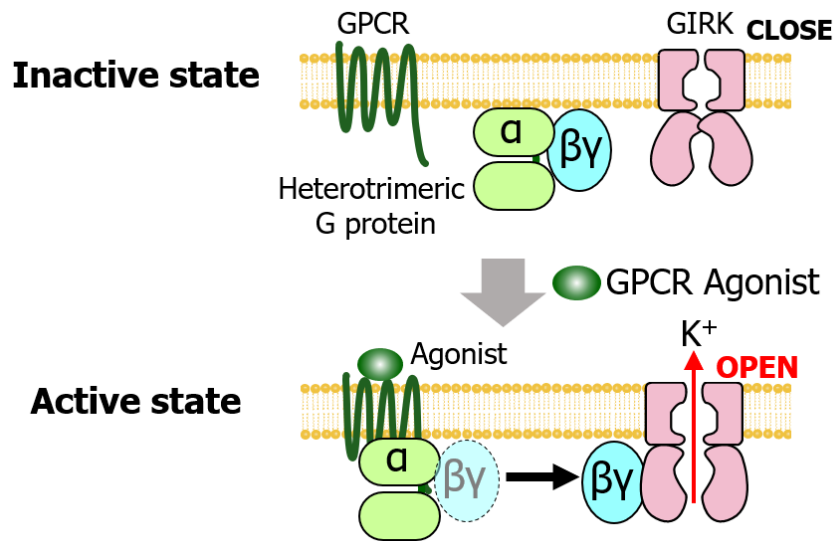


Figure 1 GPCR のアゴニスト刺激に応じた GIRK の開閉。(上段) GPCR のアゴニスト非存在時の不活性状態。(下段) アゴニスト存在時の活性化状態。

1-2. GIRK の構造

GIRK の構造として、マウス由来の GIRK2 ホモ四量体チャネルの結晶構造が明らかとなっている (Figure 2A) (7)。GIRK は膜貫通領域と細胞内領域からなるサブユニットが四量体を形成してチャネルとして機能する。1 個のサブユニットは GIRK1~4 のサブタイプにより約 390~500 残基からなり、四量体として分子量 170~230 K の膜タンパク質である。

GIRK の四量体の中央に K^+ 透過路が形成されており、膜貫通ヘリックスが集まって形成された inner helix ゲート、および細胞内領域上部の G ループにより形成される G ループゲートの 2 箇所を狭窄している (Figure 2B)。これらの部位が構造変化することで K^+ 透過を制御するゲートとして機能していると考えられている。

単一のサブユニットは、2 本の膜貫通ヘリックス (outer helix, inner helix) からなる膜貫通領域と、細胞内領域から構成される (Figure 2C, D)。細胞内領域は β ストランドに富み β シート構造を形成した領域 (β ストランド領域と呼ぶ) と C 末端ヘリックスからなる。 β ストランド領域には 14 個の β ストランドが存在し、N 末端側から $\beta A \sim \beta N$ と名付けられている (8)。 βH ストランドと βI ストランドの間のループ領域が G ループを構成する。結晶構造において、 β ストランド領域と C 末端ヘリックスの間はループで連結しているのみであり (Figure 3A)、また複数の GIRK の結晶構造 (7-9) の間で β ストランド領域に対する C 末端ヘリックスの角度が異なっていた (Figure 3B) ことから、両者の相対配置には自由度があることが予想される。

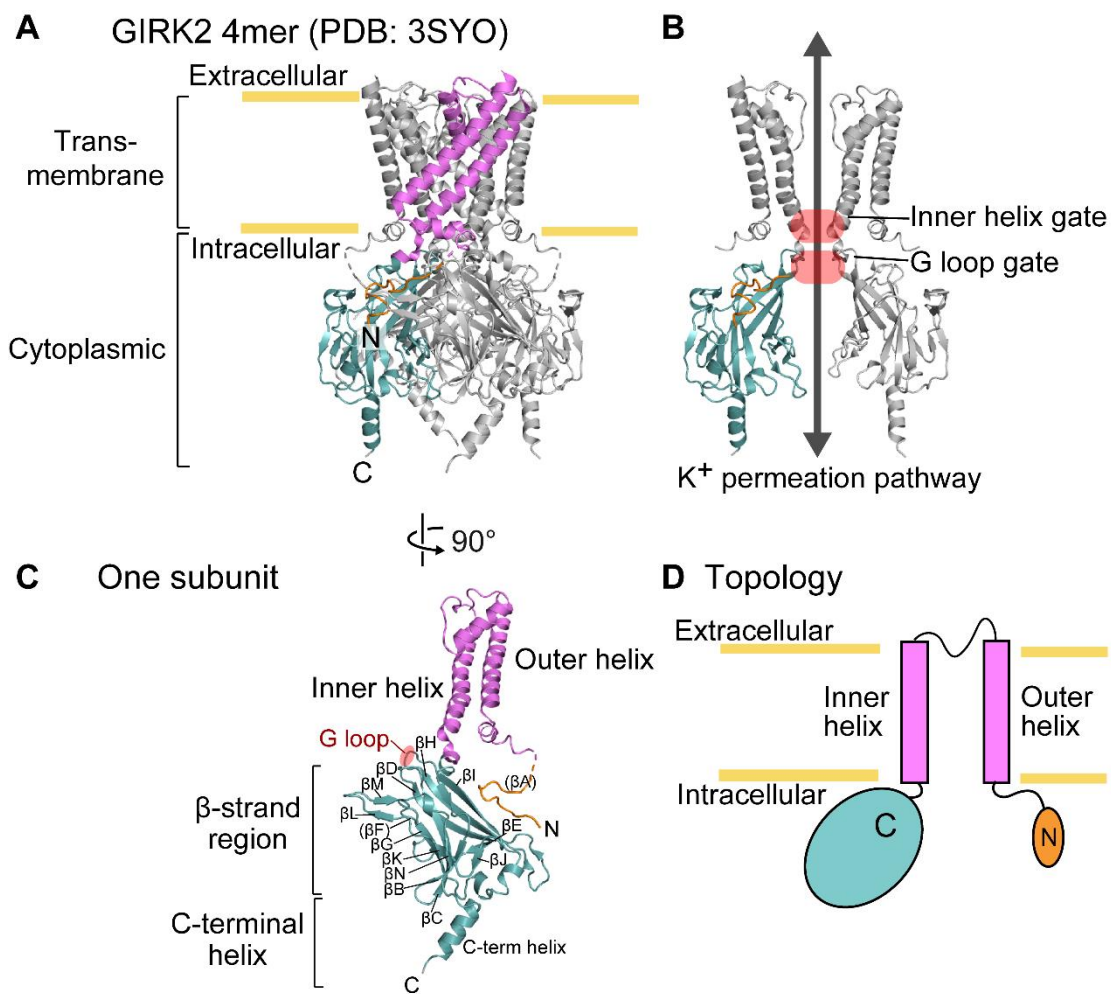


Figure 2 GIRK の構造。(A) GIRK2 ホモ四量体チャネルの結晶構造を示し、1 個のサブユニットのみ N 末端領域、膜貫通領域、細胞内領域をそれぞれ橙色、ピンク色、水色で色分けした (PDB ID: 3SYO) (7)。電子密度の観測されていない部位は点線で示した。(B) GIRK2 全長の四量体のうち、膜貫通領域と細胞内領域それぞれについて、向かい合う 2 つのサブユニットのみ表示し、イオン透過路を矢印で示した。(C) GIRK2 全長四量体の結晶構造のうち 1 個のサブユニットを示し、A と同様に色付けした。(D) GIRK のトポロジー図。

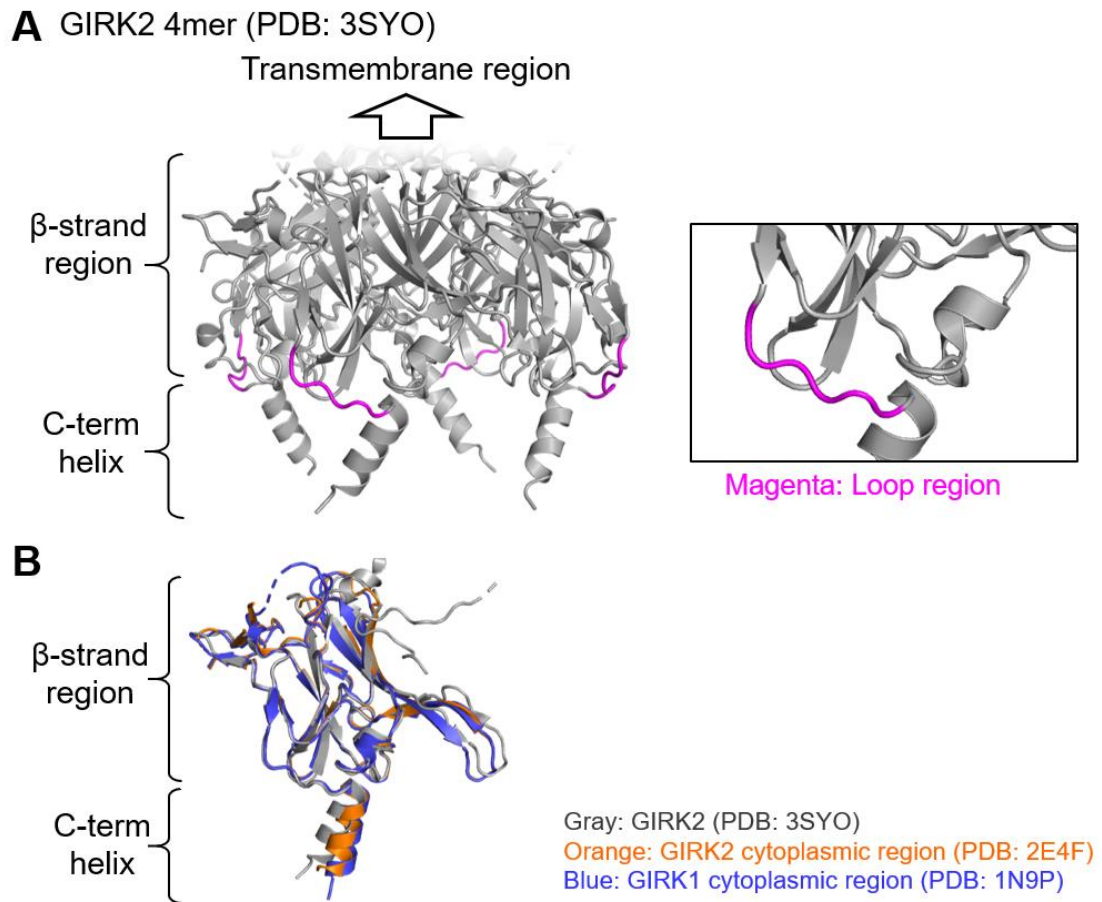


Figure 3 GIRK の細胞内領域の構造的自由度。(A) GIRK2 の結晶構造の細胞内領域を灰色のリボンで示し、 β ストランド領域と C 末端ヘリックスとの間のループ領域をマゼンタで色付けした。右にはループ領域の拡大図を示した。(B) GIRK2 全長 (7)、GIRK2 細胞内領域 (9)、GIRK1 細胞内領域 (8) のそれぞれの結晶構造における細胞内領域を、灰色、橙色、青色で重ねて示した。

マウス由来の GIRK1 の N 末端と C 末端の細胞内領域のみを切り出したタンパク質 (アミノ酸残基番号 41-63, 190-371; GIRK_{CP}) を用いた解析が行われており、その結晶構造が明らかとなっている (Figure 4)(8)。また当研究室では、GIRK_{CP} の C 末端を 15 残基延長させたタンパク質 (アミノ酸残基番号 41-63, 190-386; GIRK_{CP-L}) を用いた解析も行われている (10)。GIRK_{CP} および GIRK_{CP-L} は、全長と同様に四量体を形成する。GIRK_{CP} の構造は、マウス GIRK1 の細胞内領域と原核生物由来の KirBac1.3 の膜貫通領域からなるキメラ体チャンネル (11) あるいは GIRK2 全長 (7) における細胞内領域の構造に対して、主鎖の root mean square deviation (RMSD) 値がそれぞれ 1.3 Å、2.0 Å とよく一致していることから、GIRK の細胞内領域のみを切り出したタンパク質は、GIRK 全長における細胞内領域の構造を反映していることが分かっている。

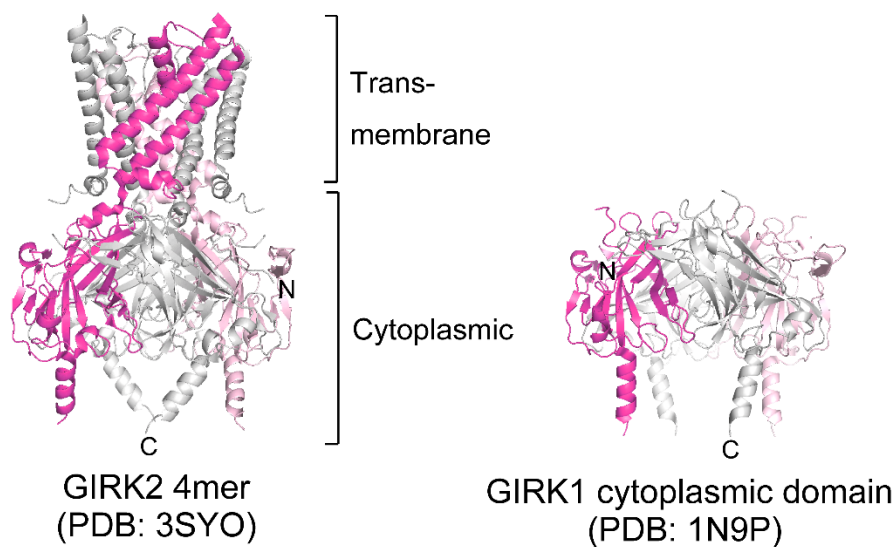


Figure 4 GIRK 細胞内領域の立体構造。左に GIRK2 全長の結晶構造 (7), 右に GIRK1 細胞内領域を切り出した GIRK_{CP} (8) の結晶構造を、それぞれサブユニットごとにマゼンタ、ピンク、灰、灰で色分けし並べて示した。

1-3. Gタンパク質の構造

G α は、約 350-400 残基からなる分子量 39K-46K のタンパク質である。ヒトの G α には 16 種類の遺伝子、21 種類のアイソフォームが知られており、アミノ酸配列の相同性に基づき s, i/o, q, 12/13 の 4 個のファミリーに分類されるが、いずれの G α も類似した立体構造を形成する (2, 12)。G α の立体構造は、6 本の β ストランド (β 1- β 6) からなる β シートを 5 本の α ヘリックス (α 1- α 5) が取り囲むように配置している GTPase ドメイン (GD) と、6 本の α ヘリックス (α A- α F) からなるヘリカルドメイン (HD) の 2 個のドメインから構成されている (Figure 5A) (PDB ID: 1GP2) (13)。グアニンヌクレオチド結合部位は、両ドメインの間に存在する。三量体 G α i1 β 1 γ 2 の結晶構造から、G α は GTPase ドメインの α F- β 2 ループ~ β 2 ストランド、 β 3 ストランド~ α 2/ β 4 ループを介して G $\beta\gamma$ と結合することが示された (Figure 5B)。また G α の N 末端領域は、G $\beta\gamma$ との結合時にはヘリックス (N 末端ヘリックスもしくは α N と呼ぶ) を形成し塩基性残基に富む面を有する (Figure 5B 青色)。G α のサブタイプのうち i/o ファミリーに属する G α t 以外は N 末端領域にパルミトイル化を受け、さらに i/o ファミリーに属する G α i, G α o, G α t はミリストイル化を受ける。これらの脂質修飾に加えて、N 末端ヘリックス上の塩基性残基が酸性脂質と相互作用することにより、G α は細胞膜にアンカーされる (14, 15)。また、GTP の非加水分解アナログである guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate (GTP γ S) が結合した活性化状態の G α (GTP γ S) の結晶構造からは (Figure 5C 左側) (PDB ID: 1GIA) (16)、G $\alpha\beta\gamma$ と比べて G α (GTP γ S) では GTPase ドメイン上の G $\beta\gamma$ 結合部位に構造変化が生じ、G $\beta\gamma$ との親和性が低下することが示された。このとき、G $\beta\gamma$ から解離するのに伴って G α の N 末端領域はランダムコイルに構造変化する (17)。

G α の 4 個のファミリーはそれぞれ異なる細胞応答を担っている。それらの違いに着目し、各ファミリーに属する G α のアミノ酸配列を比較した (Figure 6)。GTPase ドメインにおいては 53%の残基が完全または高度に保存されている (CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment Program version 1.83 により判定)。特にヌクレオチド結合部位を構成する β 1- α 1 ループ~ α 1 ヘ

リックス、 $\beta 3$ - $\alpha 2$ ループ、 $\beta 6$ - $\alpha 5$ ループ上の残基や、 $G\beta\gamma$ 結合面の中心となる $\beta 3$ ストランド~ $\alpha 2/\beta 4$ ループ上の残基、高次構造形成に関与する残基など、 $G\alpha$ に共通の機能に重要な残基は高度に保存されていることが知られている (18)。GTPase ドメインの中でも、GPCR 結合部位である $\alpha 5$ ヘリックスおよびエフェクター結合面を形成する $\alpha 3$ ヘリックスには保存性が低い部位が存在し、それらの部位の残基の違いにより、各ファミリーの $G\alpha$ が特定の GPCR やエフェクターと共役して機能を発揮することができると考えられている (18, 19)。ヘリカルドメインにおいては完全または高度に保存されている残基は 32% である。GTPase ドメインと比較してヘリカルドメインは保存性が低く、特に αA ヘリックスから αC ヘリックスにかけての領域が多様性を有している。

$G\beta$ には 5 種類、 $G\gamma$ には 11 種類の遺伝子が知られている。 $G\beta_{1-4}$ は互いに約 80% 以上の高い相同性を有する。 $G\beta_5$ のみ相同性が 50% 程度と低く、組織・細胞における分布や、regulator of G protein signaling (RGS) タンパク質と結合するなどの機能を持つ点で他の $G\beta$ サブタイプと異なっている (2)。本論文では特に断りの無い限り $G\beta$ は $G\beta_{1-4}$ のものを指す。 $G\beta\gamma$ の構造として、 $G\beta_{1\gamma_1}$ 単独状態の結晶構造が明らかとなっている (Figure 5C) (PDB ID: 1TBG) (20)。 $G\beta\gamma$ は、 $G\alpha$ やエフェクターとの結合の有無によって全体構造にほとんど変化を生じないことが知られている。 $G\beta$ サブユニットは、N 末端のヘリックスと、 β ストランドにより構成された 7 枚のブレードからなるプロペラ状の構造をもつ分子量約 38K のタンパク質である。 $G\gamma$ サブユニットはコイルドコイル構造により $G\beta$ と結合する分子量約 7~8K のタンパク質である。 $G\gamma$ は C 末端に脂質修飾を受ける。 $G\beta$ と $G\gamma$ は生理条件において安定な分子量約 46K のヘテロダイマーとして存在し、 $G\gamma$ の脂質修飾を介して細胞膜にアンカーされている。

また、 $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2$ adrenergic receptor, $\beta 2AR$) が結合し、ヌクレオチドが解離した状態の $G\alpha\beta_{1\gamma_2}$ の結晶構造が報告されている (Figure 7) (PDB ID: 3SN6) (21)。この結晶構造は、不活性状態の GDP 結合型 $G\alpha\beta\gamma$ から、活性化状態の $G\alpha(GTP)$ と $G\beta\gamma$ へ移行する途中の段階を表していると考えられる。この構造において、ヌクレオチドが解離した状態の

G α のヘリカルドメインと GTPase ドメインとの距離が大きく離れ、グアニンヌクレオチド結合部位が露出していたことから、G α から GDP が解離する際にはドメイン間の相対配置の変化を伴うことが示唆された。G $\alpha\beta\gamma$ 上の GPCR 結合部位は、G α の $\alpha 5$ ヘリックスを中心に、 αN - $\beta 1$ ループ~ $\beta 1$ ストランド、 $\beta 2$ - $\beta 3$ ループ、 $\alpha 4$ - $\beta 6$ ループ上の残基により構成されていた。GPCR 結合時には G α の $\alpha 5$ ヘリックスが GPCR 側へ引き上げられ、それに伴ってヌクレオチドと相互作用する $\beta 6$ - $\alpha 5$ ループの構造変化が生じており、これらの構造変化により GDP の解離が促進されていることが示唆された。

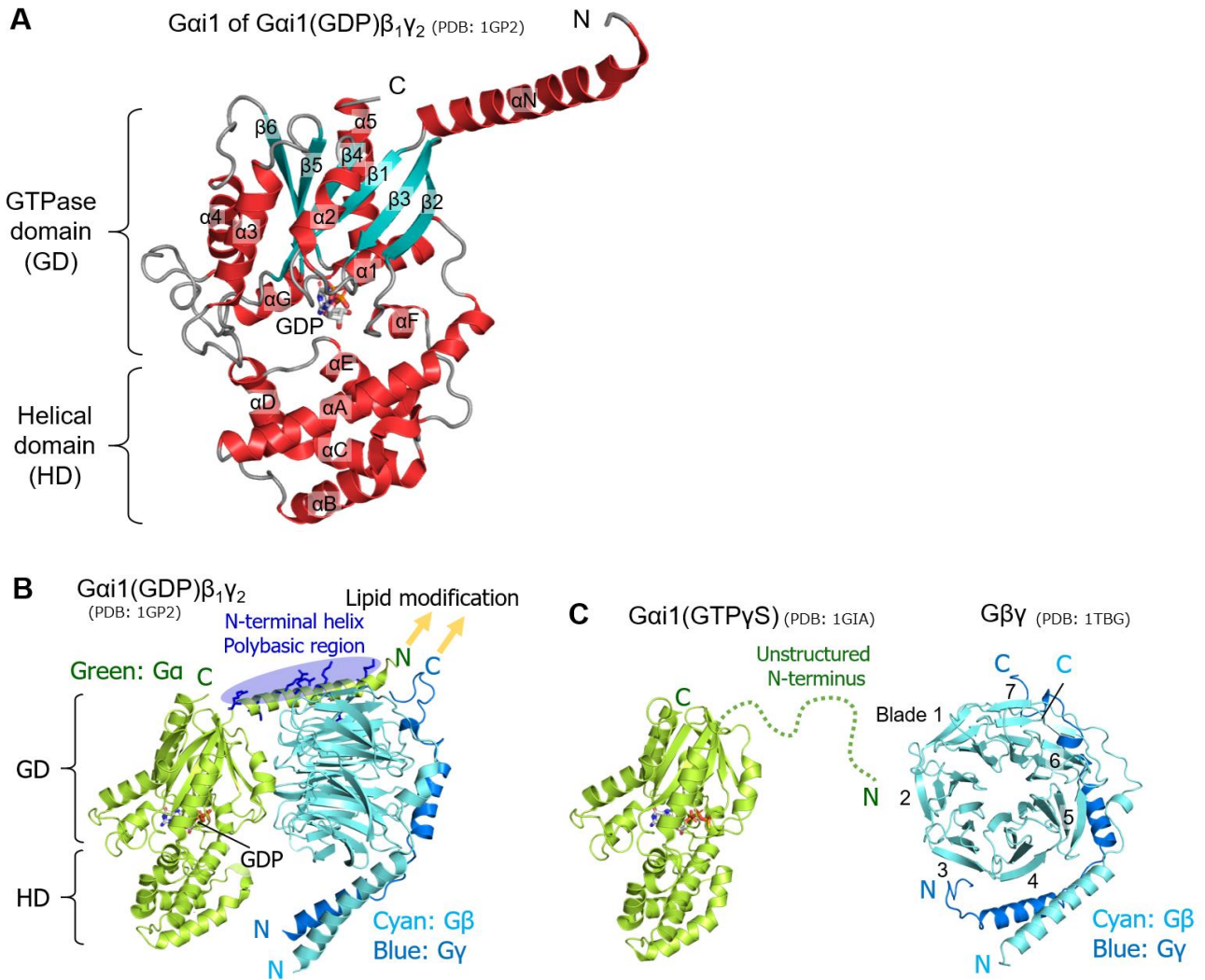


Figure 5 G タンパク質の構造。(A) Gai1 $\beta_1\gamma_2$ の結晶構造 (PDB ID: 1GP2) (13) から Gai1 をリボン表示し、 α ヘリックスを赤色、 β ストランドをシアン、ループを灰色で色付けした。各構造エレメントの名前を記した。GDP はスティックで表示した。(B) Gai1 $\beta_1\gamma_2$ の結晶構造 (PDB ID: 1GP2) (13) を表示し、生体内での脂質修飾部位を矢印で示した。N 末端ヘリックスの塩基性残基に富む領域を青色で示した。(C) GTP アナログである GTP γ S 結合型の Gai1 の結晶構造 (PDB ID: 1GIA) (16) ならびに G $\beta_1\gamma_1$ の結晶構造 (PDB ID: 1TBG) (20)。電子密度が観測されていない Gai1 の N 末端 32 残基は、点線で模式的に示した。G β の N 末端側からブレード 1~7 に番号を付した。

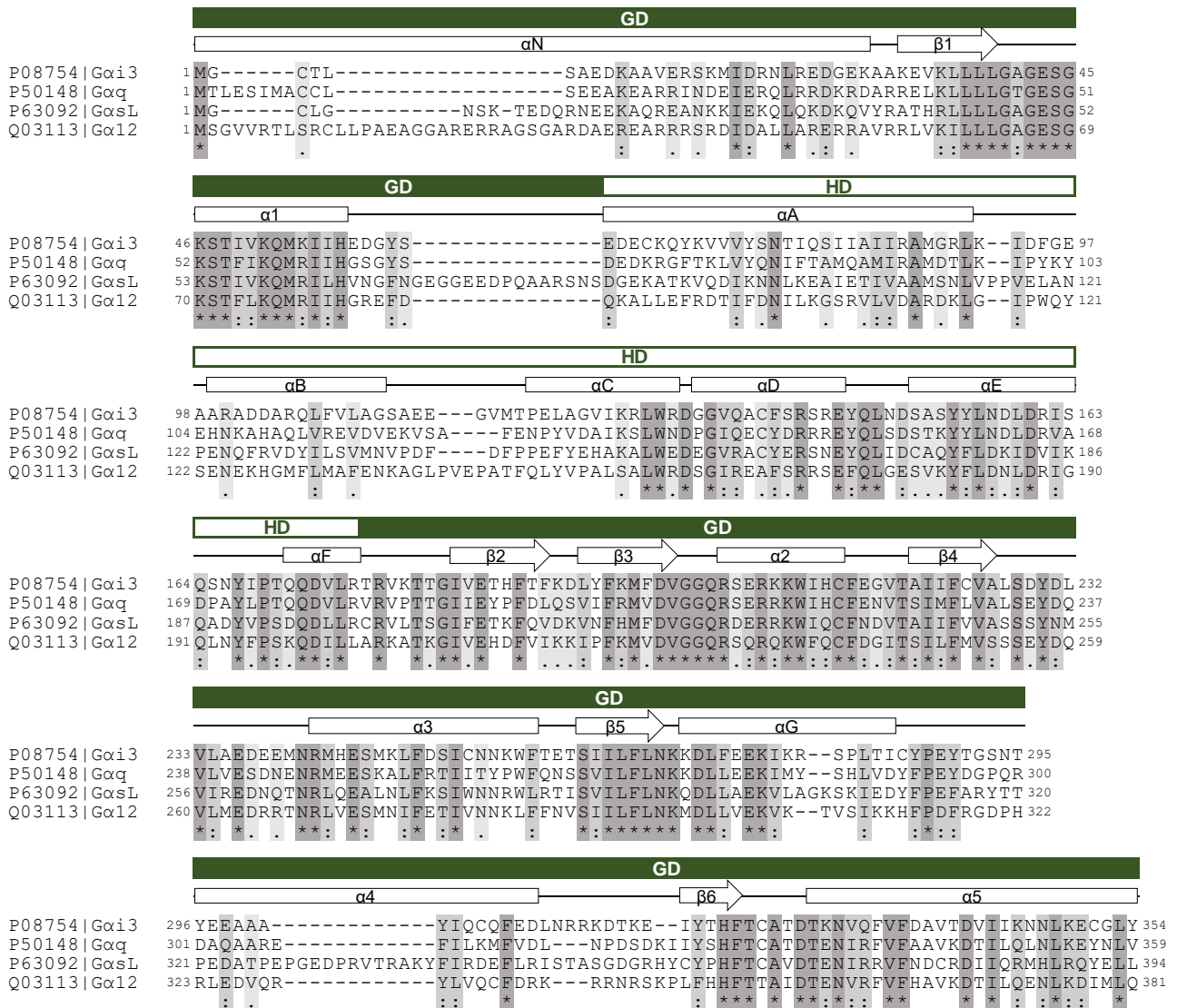


Figure 6 各ファミリーの $G\alpha$ のアミノ酸配列アラインメント。Flock らの解析に基づく (12)。ヒトの *Gai3* (i/o ファミリー)、*Gaq* (q ファミリー)、*GasL* (s ファミリー)、*Ga12* (12/13 ファミリー) のアミノ酸配列を並べて、左の列にそれぞれの UniProt accession number を記し、上部にドメインおよび二次構造を示した。保存性が完全 (*印)、高度 (:印)、弱い (.印) 残基の背景を、濃い灰色～薄い灰色で色付けした。GD : GTPase ドメイン、HD : ヘリカルドメイン

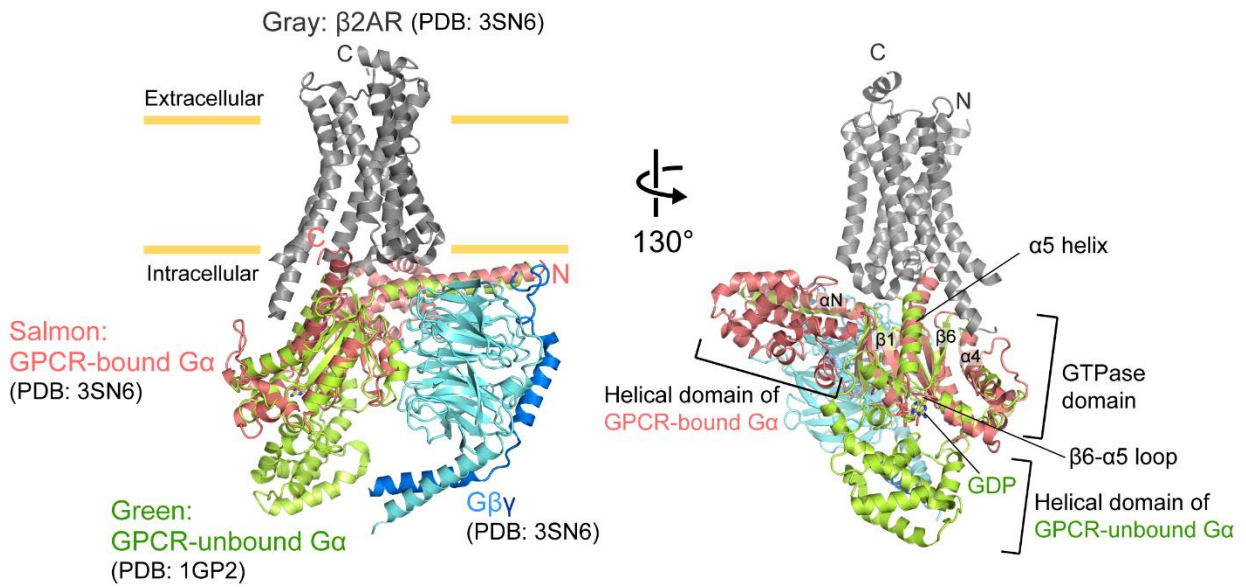


Figure 7 $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2AR$) が結合し、ヌクレオチドが解離した状態の $G\alpha\beta\gamma_2$ の結晶構造 (PDB ID: 3SN6) (21)。結晶構造中のナノボディおよびリゾチームは表示していない。PDB ID: 3SN6 中の $G\alpha$ をサーモンピンク、 $G\beta$ を水色、 $G\gamma$ を青色、 $\beta 2AR$ を灰色で示した。GPCR 非結合時の $Gai1\beta\gamma_2$ の結晶構造 (PDB ID: 1GP2) (13) 中の $G\alpha$ のみを黄緑色で重ねて表示した。左の図においては、膜の位置を模式的に示した。

1-4. G $\beta\gamma$ と GIRK の相互作用様式

G $\beta\gamma$ による GIRK 開口の構造機構は、当研究室での核磁気共鳴分光法 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) 解析 (22) およびその後の X 線結晶構造解析 (23) によって明らかとされてきた。これらの研究から、両者の結合部位は、G $\beta\gamma$ のブレード 1 と 7 からなる領域、ならびに GIRK の細胞内領域のサブユニットにまたがる β D- β E ループと β L- β M ループからなる面であることが示された (Figure 8)。そして、G $\beta\gamma$ の結合に伴って GIRK のサブユニット間の相対配置が変化し、G ループゲートおよび inner helix ゲートに構造変化が伝播してゲート部位が開くことで、GIRK が開口するという機構が提唱された。

なお、G $\beta\gamma$ 上の GIRK 結合残基は、G β_{1-4} のサブタイプ間で完全に保存されている (23)。また電気生理実験においては、様々な種類の G $\beta\gamma$ を添加した場合に、ほぼ同等に GIRK 電流が誘起されることが報告されている (24)。したがって、GIRK 開口能に G $\beta\gamma$ のサブタイプによる違いは少ないと考えられている。

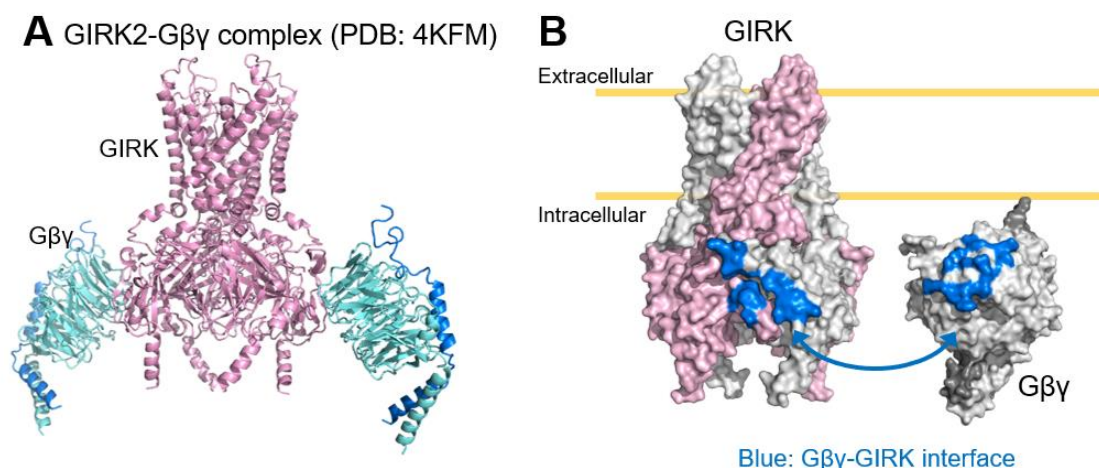


Figure 8 G $\beta\gamma$ と GIRK の相互作用様式。(A) GIRK2-G $\beta\gamma$ 複合体の結晶構造 (PDB ID: 4KFM) (23) より、GIRK2 四量体と 2 個の G $\beta\gamma$ をリボン表示で示した。GIRK はピンク色、G β は水色、G γ は青色で色付けした。(B) GIRK2-G $\beta\gamma$ の複合体を open-book 表示し、GIRK はサブユニットごとに白またはピンク色、G β と G γ は白と灰色でそれぞれ色付けした。結合残基 (23) を青色で色付けした。脂質二重膜は模式的に示した。

1-5. $G\alpha(GTP)$ と GIRK の相互作用様式

$G\beta\gamma$ に加えて、G タンパク質が解離した後に生じる $G\alpha(GTP)$ もまた GIRK と直接結合することが、当研究室での NMR 解析から明らかとされ、この $G\alpha(GTP)$ と GIRK との相互作用が GIRK の迅速な閉口を促進する構造機構が提唱されている (10)。

GIRK1 細胞内領域のみのタンパク質 ($GIRK_{CP-L}$) と、GTP の非加水分解アナログである $GTP\gamma S$ 結合状態の $Gai3$ ($Gai3(GTP\gamma S)$) を用いた転移交差飽和実験から、 $Gai3(GTP\gamma S)$ が $GTPase$ ドメイン上の領域にて $GIRK_{CP-L}$ の C 末端ヘリックスに結合することが明らかとなった。さらに、常磁性緩和促進 (paramagnetic relaxation enhancement, PRE) 実験から、 $Gai3(GTP\gamma S)$ のヘリカルドメインと $GIRK_{CP-L}$ の C 末端ヘリックスとの近接が検出された。以上の結果から、 $G\alpha(GTP)$ -GIRK 複合体のモデルが構築された (Figure 9)。GIRK 細胞内領域において、 $G\alpha(GTP)$ の結合部位は、 $G\beta\gamma$ 結合部位 (22, 23) と重複しないことから、GIRK 細胞内領域に $G\alpha(GTP)$ と $G\beta\gamma$ が同時に結合できることが示唆された。したがって、 $G\alpha(GTP)$ は、 $G\beta\gamma$ が結合して開口した状態の GIRK の C 末端領域に結合しており、GTP が加水分解されて GDP 結合型となったときに素早く $G\beta\gamma$ を回収することで、GIRK の迅速な閉口を促進するという機構が提唱された。

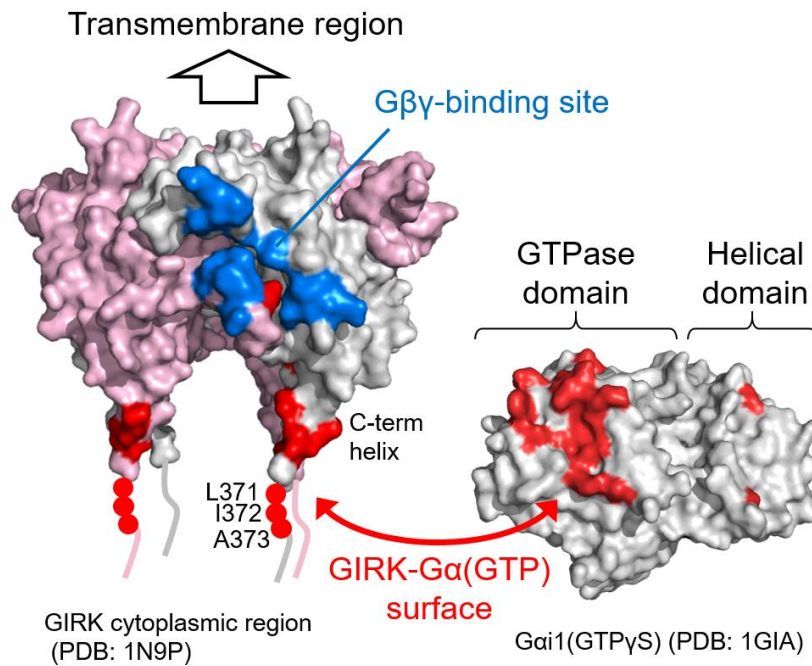


Figure 9 GIRK と GTP 結合型 $G\alpha$ の相互作用様式 (10)。左に GIRK1 細胞内領域 四量体 (PDB ID: 1N9P) (8)、右に GTP γ S 結合型 $G\alpha i1$ (PDB ID: 1GIA) (16) の結晶構造を表面表示で示した。GIRK1 細胞内領域の C 末端の残基番号 372~386 は模式的に描いた。GIRK はサブユニットごとに白またはピンク色、 $G\alpha$ は白で色付けした。転移交差飽和実験により決定された GIRK_{CP-L} と GTP γ S 結合型の $G\alpha i3$ との結合残基 (10) を赤色で示した。また GIRK 上の $G\beta\gamma$ 結合部位 (22, 23) を青で示した。

1-6. $G\alpha$ のファミリー選択的な GIRK の活性制御

生体内において GIRK は特定の細胞外刺激に応じて開閉することで、細胞膜電位を適切に制御するという機能を果たす。GIRK の開口は、 $GABA_B$ 受容体やムスカリン性アセチルコリン M2 受容体などの抑制性神経伝達を担う GPCR によって誘起される一方で、 β_2 アドレナリン受容体などの興奮性神経伝達を担う GPCR によっては誘起されない (25–27) (Figure 10)。このように特定の抑制性神経伝達物質の受容に伴って選択的に GIRK が応答することは、細胞外刺激の種類に応じて異なる細胞応答を生じるという機能を果たす上で本質的に重要であり、細胞内のシグナル伝達経路が混線することなく、適切な神経伝達を達成するために必須である。

哺乳類の細胞は、様々な細胞外刺激に応答する際に共通の G タンパク質シグナリングの枠組みを用いており (12)、GIRK と共役しない GPCR が活性化した際にも GIRK の直接の開口因子である遊離 $G\beta\gamma$ が放出される。それにも関わらず、GIRK は特定の細胞外刺激に応じて放出された $G\beta\gamma$ によってのみ選択的に開口する。このような選択性が生じる分子機構として、G タンパク質の中でも i/o ファミリー (G_i/o) と共役する GPCR が活性化した際に解離した $G\beta\gamma$ のみが GIRK を開口させ、他のファミリーの G タンパク質 (G_q , G_s , $G_{12/13}$) と共役する GPCR から解離した $G\beta\gamma$ は GIRK を開口させないことが知られている (28)。例えば、アセチルコリン M2 受容体 (G_i/o 共役) または M1 受容体 (G_q 共役) および GIRK4 を発現したアフリカツメガエル卵母細胞での電気生理実験の測定結果において、M1 受容体の刺激時と比べて、M2 受容体の刺激時の方が顕著に大きい電流が誘起された (Figure 11) (29)。しかし、 i/o ファミリーの G_i/o ($G_{ai/o}$) は GIRK の直接の開口因子ではなく、また $G\beta\gamma$ のサブタイプ ($G\beta_{1-4}$) による GIRK 開口能の違いはほとんどない (24, 30) ことから、 $G_{ai/o}$ から解離した $G\beta\gamma$ が選択的に GIRK を開口させる機構は不明であった。

また、生理的条件下で GIRK は刺激後数百ミリ秒～1 秒程度で迅速に開口するが (31)、強制発現系においては $G\alpha$ のサブタイプによって GIRK 電流の生じる速さが異なることが報告

されている (32)。したがって $G\alpha$ は、GIRK の迅速な活性化においても重要な役割を担っていると考えられている (33)。

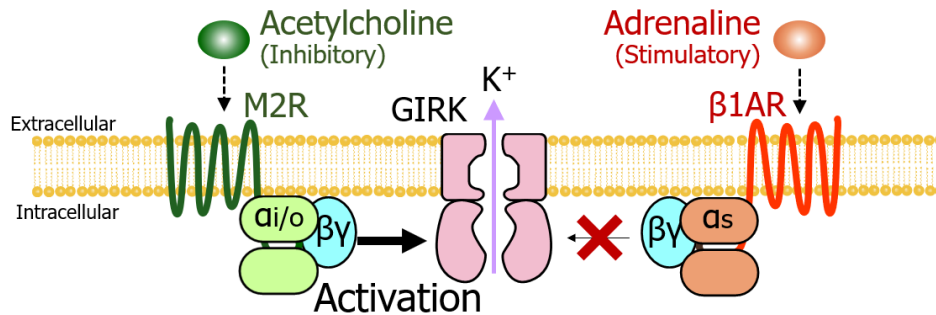


Figure 10 GIRK は特定の細胞外刺激で選択的に開口する。心筋におけるアセチルコリンとアドレナリンによる GIRK への異なる効果を模式図で表現した。

Electrophysiological recordings
(modified after Rusinova *et al. J. Biol. Chem.* 2007)

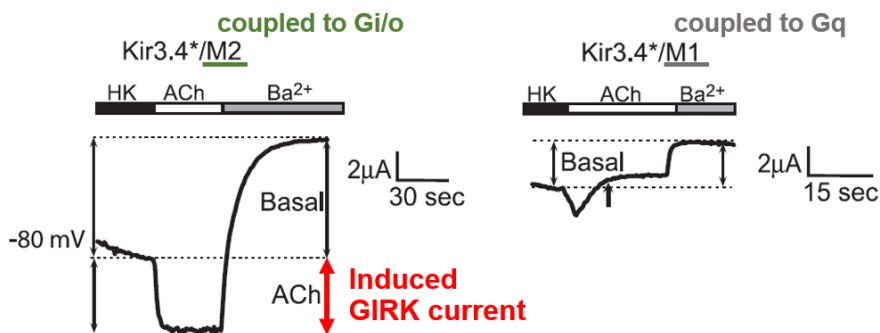


Figure 11 アセチルコリン M2 受容体 (G_i/o 共役) または M1 受容体 (G_q 共役) および GIRK4 を発現したアフリカツメガエル卵母細胞の一細胞電流測定 ((29)より改変)。上部のバーに示すように、アゴニストであるアセチルコリン (ACh) の添加およびブロッカーである Ba^{2+} の添加に伴う電流の変化を観測した。This research was originally published in the Journal of Biological Chemistry. Rusinova R, Mirshahi T, Logothetis DE. Specificity of $G\beta\gamma$ signaling to Kir3 channels depends on the helical domain of pertussis toxin-sensitive $G\alpha$ subunits. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(47):34019–34030 © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

1-7. Gai/o による GIRK の活性制御機構のこれまでの研究

これまで、GIRK 電流の制御における Gai/o の機能が電気生理実験により調べられてきた (28, 29, 33, 34)。しかし、電気生理実験で G α 選択性を調べる際には、細胞における GIRK, G タンパク質や GPCR の発現量 (26, 34)、あるいは GPCR により活性化される G タンパク質の割合によって (29)、観測される GIRK 電流が影響を受ける。そのため、ファミリー選択的な GIRK の開口を定量的に評価することが困難であり、Gai/o 選択的かつ迅速に GIRK が開口する詳細な分子機構は明らかとなっていない (3)。

一方、Förster 共鳴エネルギー転移 (Förster resonance energy transfer, FRET) や生物発光共鳴エネルギー転移 (bioluminescence resonance energy transfer, BRET) を利用した実験などから、GPCR, GIRK, Gai/o $\beta\gamma$ が不活性化状態で複合体を形成していることが示唆されている。表 1 に、不活性化状態すなわちアゴニスト非添加状態や GDP 結合型 G α における複合体形成・共局在に関する先行研究をまとめた。これらの先行研究から、GIRK が GPCR、もしくは G タンパク質と Gai/o ファミリー選択的に複合体を形成することが、GIRK の迅速かつ選択的な活性制御に重要であることが提唱されている (32, 35, 36)。しかし、不活性化状態で GIRK が複合体を形成していることと、迅速に G $\beta\gamma$ 結合状態に移行し開口することは一見相反しており、複合体の形成が如何にして GIRK の迅速かつ効率的な開口を可能とするのかは明らかではない。また複合体の結合様式が明らかとなっていないため、なぜ Gai/o 選択的に複合体形成が可能であるのか、複合体中のどのタンパク質のどの部分が Gai/o 選択性を決定しているのかは不明であった。

これらの点を解明するうえで問題となっているのは、複合体の形成を担う相互作用が GIRK-G α 間、GIRK-GPCR 間、あるいは GIRK-G $\beta\gamma$ 間なのかについて、いくつかの相反する説が提唱されており、統一的なモデルが得られていないことである。プルダウン実験および不活性化状態の FRET 解析から、GIRK と G α (GDP) が直接かつファミリー選択的に結合することが示唆されている (35, 36)。一方、GIRK-G α 間では FRET が観測されず、GIRK-GPCR

間で観測されたという実験結果も報告されており、GIRK と GPCR が複合体中で近接していることが示唆されている (37, 38)。また、不活性状態において GIRK-G α 間よりも GIRK-G $\beta\gamma$ 間の方が顕著な FRET が観測されたことから、G $\alpha\beta\gamma$ は G $\beta\gamma$ を介して GIRK と結合しているとの説も提唱されている (33, 39)。このように複数の相反するモデルが提唱されている原因として、これまでの先行研究では GIRK を含む複合体の立体構造に基づいた解析が行われていないことが挙げられる。免疫共沈やプルダウン実験では、直接の相互作用の有無や相互作用部位などの構造情報を得ることはできない。また FRET や BRET を用いた実験では蛍光タンパク質等の融合体を用いているため、複合体の構造を議論するのに十分な分解能の情報は得られない。

GIRK の開口が迅速かつ G $\alpha i/o$ 選択的に生じる機構を解明するためには、不活性状態の GIRK の複合体の立体構造を明らかにする必要がある。しかし、このような迅速な細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質間相互作用は、弱く過渡的である傾向があるため (40)、詳細な構造解析を行うことが難しい。さらに、膜上に局在して相互作用するタンパク質を膜から可溶化した状態にすると、分子が自由に移動・回転するようになるため、相互作用するタンパク質同士が適切な配向で結合する確率が顕著に低下し、見かけの親和性がさらに低下する (10, 22, 41, 42)。そのため、安定な複合体の単離精製を必要とする X 線結晶構造解析や単粒子クライオ電子顕微鏡による解析は困難であった。

表 1 不活性状態における GPCR, G タンパク質と GIRK の共局在を示した先行研究。また、共局在が観測されなかったものを※印を付して示した。

GPCR と GIRK の共局在

GPCR	GIRK	Co-expression	Experiment	System	Reference
D4R	GIRK1, 2, 3, 4		IP	COS-7	(43)
D2R	GIRK1, 2, 4		IP	COS-7	(43)
β2AR	GIRK1/2		IP, BRET	HEK	(43)
β2AR	GIRK1/4		IP, BRET	HEK	(43)
GABA _B R	GIRK2		FRET	HEK	(37)
GABA _B R	GIRK1/4		FRET	HEK	(37)
DOR	GIRK1/2	Gαoβ ₁ γ ₂	BRET, IP	HEK	(39)
M2R	GIRK1/2		FRET	HEK	(38)

Gα と GIRK の共局在

Gα	GIRK	Co-expression	Experiment	System	Reference
Gai3	GIRK1 fragment		Pulldown	<i>in vitro</i>	(32)
Gao	GIRK1, 2		IP	rat brain	(35)
Gao	GIRK2 fragment	Gβγ (bovine)	Pulldown	<i>in vitro</i>	(35)
Gao, i1	GIRK2 fragment		Pulldown	<i>in vitro</i>	(35)
※ Gαq, s	GIRK2 fragment		Pulldown	<i>in vitro</i>	(35)
Gai2	GIRK1/4	Gβ ₁ γ ₂ +β2AR	BRET	HEK	(44)
Gai3	GIRK1 fragment	Gβ ₁ γ ₂	Pulldown	<i>in vitro</i>	(33)
※ Gai3	GIRK1/2		FRET	oocytes	(33)
※ Gao	GIRK2		FRET	HEK	(37)

Gβγ と GIRK の共局在

Gβγ	GIRK	Co-expression	Experiment	System	Reference
Gβγ (bovine)	GIRK2 fragment	Gao (bovine)	Pulldown	<i>in vitro</i>	(35)
Gβ ₁ γ ₂	GIRK1/4	Gas+β2AR	BRET	HEK	(44)
Gβ ₁ γ ₂	GIRK1/4	mGluR	FRET	HEK	(36)
Gβ ₁ γ ₂	GIRK1/2		FRET	oocytes	(33)
Gβ ₁ γ ₂	GIRK1/2	GaoA+DOR	BRET, IP	HEK	(39)
Gβ ₁ γ ₂	GIRK2	GaoA+DOR	BRET	HEK	(39)

D4R, dopamine D4 receptor; D2R, dopamine D2 receptor; β2AR, β2 adrenergic receptor; GABA_BR, GABA_B receptor; DOR, δ-opioid receptor; M2R, muscarinic acetylcholine receptor M2; mGluR, metabotropic glutamate receptor; IP, immunoprecipitation

1-8. 本研究の目的

本研究は、G α i/o 選択的かつ迅速に GIRK が開口する機構を解明することを目的とした。GIRK の選択的かつ迅速な開口の基盤となる、不活性状態での相互作用を同定し、その複合体構造を解明することで、上記目的の達成を目指した。

1-9. 本研究の概要

培養細胞を用いた BRET 実験から、GPCR や G $\beta\gamma$ が共通であっても G α の種類によって選択的に GIRK の活性化が生じ、特に G α のヘリカルドメインが選択性を決定していることを示した。そこで G α i/o $\beta\gamma$ -GIRK の相互作用に着目し、過渡的な相互作用を生理的な *in situ* 環境に近い条件で解析可能な NMR 法を用いて解析を行った。生体膜上で生じる相互作用を調べるため、リン脂質二重膜からなるナノディスクを用いて膜環境を模倣した試料で構造解析を行い、GIRK1 の細胞内領域を有するキメラ体チャンネル (GIRK キメラ) と G α i/o $\beta\gamma$ が直接の相互作用を生じることを示した。両者の複合体は総分子量 300K 以上と、NMR の対象としては巨大であるが、常磁性緩和促進 (PRE) を利用して構造情報を収集することで、G α i/o $\beta\gamma$ -GIRK 複合体のモデル構造を構築した。モデル構造に基づき、G α i/o $\beta\gamma$ -GIRK の選択的な結合を決定する部位を同定し、変異体実験にて妥当性を検証した。以上から、迅速かつ効率的な GIRK の活性制御が G α i/o 選択的に達成される機構を提唱した。

第2章 材料と方法

2-1. 試薬

PCR 反応において使用したオリゴ DNA プライマーは、Invitrogen またはユーロフィンジェノミクスより購入した。安定同位体化合物は ISOTEC, Cambridge isotope laboratory より購入した。他の試薬は特記のない限り Sigma-Aldrich, 和光純薬、またはナカライテスクより購入した。また、特記のない限り培地およびバッファーの調製には超純水装置 Milli-Q (Merck Millipore) にて製造した水を用いた。

2-2. 培地組成

本研究では以下の組成の培地を使用した。

LB 培地

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g

以上を 1 L MilliQ 水に溶解し、オートクレーブした。G α , GIRK キメラの発現時には終濃度 50 mg/L のカナマイシンを添加した。MSP1E3 の前培養時には終濃度 50 mg/L のアンピシリンを添加した。

TB 培地

(A)

Bacto Tryptone 12 g

Bacto Yeast Extract 24 g

Glycerol 8 mL

(B)

K₂HPO₄ 9.4 g

KH₂PO₄ 2.2 g

(A) を 900 mL, (B) を 100 mL の MilliQ 水に溶解し、オートクレーブした後、混合した。

MSP1E3 の発現時には終濃度 50 mg/L のアンピシリンを添加した。

重水素化用 M9 培地

Na₂HPO₄ 12.9 g

KH₂PO₄ 3.0g

¹⁵NH₄Cl 1.0 g

NaCl 0.50 g

MgSO₄ 241 mg

Thiamine 10 mg

CaCl₂ 11.1 mg

ZnSO₄·7H₂O 14.4 mg

Kanamycin 30 mg

FeCl₃ 0.74 mg

Biotin 10 mg

Folic Acid 1.0 mg

Niacin 1.0 mg

Riboflavin 0.10 mg

²H – Glucose 2.0 g

DN – CELTONE® 1.0 g

ただし Leu/Val 側鎖メチル基を ¹³C 標識する際は加えない

以上を 1 L の 99.8 % D₂O に溶解し、0.22 μm のフィルターを用いたろ過により滅菌した。

昆虫細胞の培養には以下の培地を使用した。

TNM-FH 培地 (Sf9 培養用)

Grace's Insect Medium (Gibco)	500 mL
Fatal Bovine Serum (BioWest)	50 mL
Pluronic F68 (Gibco)	5 mL
Antibiotic-Antimycotic (Gibco)	2.5 mL

Sf900 培地 (SF+培養用)

Sf-900™ II SFM (Gibco)	1 L
Antibiotic-Antimycotic (Gibco)	5 mL

HEK293T 細胞の培養には以下の培地を使用した。

DMEM 培地

Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco)	500 mL
Fatal Bovine Serum (BioWest)	50 mL
100× GlutaMax (Gibco)	5 mL
100 mM Sodium Pyruvate (Gibco)	5 mL
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Gibco)	5 mL

2-3. BRETアッセイ

BRET アッセイのため発現させるタンパク質は全て、DNA 断片を pcDNA 3.1/Zeo (+) ベクター (Invitrogen) に挿入した。各種変異体や融合体は、QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies) および In-Fusion HD Cloning kit (TaKaRa) を用いて作製した。GIRK1, GIRK2, GPCR キナーゼ 3 (GPCR kinase 3, GRK3), δ オピオイド受容体 (δ -opioid receptor, DOR), ドパミン D2 受容体 (dopamine D2 receptor, D2R), $G_{\alpha i3}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\beta 1}$, および $G_{\gamma 2}$ をコードする DNA 断片を、ヒト全脳 cDNA (Clontech) より増幅した。 G_{α} のキメラ体 $G_{\alpha i q i}$ (29), $G_{\alpha i3-q(\alpha A)}$, $G_{\alpha i3-q(\alpha B)}$, $G_{\alpha i3-q(\alpha E)}$ の各種コンストラクトは、 $G_{\alpha i3}$ を鋳型としてそれぞれ残基番号 63-175, 71-90, 100-110, 151-163 を、 $G_{\alpha q}$ の対応する残基番号 69-180, 77-96, 106-116, 156-168 の配列に置換することで作製した。 $G_{\alpha q i5}$ は、 $G_{\alpha q}$ の C 末端 5 残基を $G_{\alpha i3}$ の配列に置換することで作製した (45)。NanoLuc (以降単に Luc と呼ぶ) をコードする DNA 断片を、pNL1.1 プラスミド (Promega) より増幅した。蛍光タンパク質 Venus ならびに百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) の S1 サブユニット (PTX S1) をコードする DNA は、GeneArt Strings™ DNA Fragments (Thermo Fisher Scientific) にて全合成した。Venus 標識 $G_{\beta \gamma}$ を形成させるため (46)、Venus を分割した 2 個のフラグメント (残基番号 156-239 および 1-155) をそれぞれ $G_{\beta 1}$, $G_{\gamma 2}$ の N 末端に GGSGGG リンカーをはさんで融合させた、Venus 156-239- $G_{\beta 1}$ および Venus 1-155- $G_{\gamma 2}$ のコンストラクトを先行報告 (47, 48) に従って作製した。GRK3 の残基番号 495-688 (GRKct) の N 末端側にミリストイル化配列 (myristic acid attachment peptide, mas), C 末端側に GGGS リンカーと Luc を融合させた masGRKct-Luc コンストラクトを、先行報告 (47, 48) に従って作製した。また、GIRK2 の C 末端に Luc を融合させた GIRK2-Luc コンストラクトを作製した。

HEK293T 細胞は ECACC より購入した (ECACC 12022001)。DMEM 培地を用いて 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。トランスフェクションの際は、6 ウェルプレート (Corning) に 1 ウェルあたり 6×10^5 個の細胞を播種し、翌日に Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて各

種プラスミドを導入した。

BRET 実験のためトランスフェクションしたプラスミドを表 2, 表 3, 表 4 に示す。いずれの条件でも、1 ウェルあたりの DNA 量の合計が 2500 ng になるよう、空ベクターを添加して調節した。細胞に内在の G α i/o の活性化を防ぎ、目的の G α の活性化のみを観測するため、発現させる G α に百日咳毒素非感受性の C351A 変異を導入し、PTX S1 と共発現させた。

表 2 DOR 使用時にトランスフェクションしたプラスミド

Construct	DNA (ng/well)
DOR	48
PTX S1	190
G α i3 or iq1 (C351A)	380
Venus 156-239-G β 1	24
Venus 1-155-G γ 2	24
masGRKct-Luc or GIRK1 / GIRK2-Luc	18 or 18/18

表 3 D2R 使用時にトランスフェクションしたプラスミド

Construct	DNA (ng/well)
D2R	48
PTX S1	190
G α i3, iq1, or qi5 (C351A)	285, 190, or 380
Venus 156-239-G β 1	24
Venus 1-155-G γ 2	24
masGRKct-Luc or GIRK1 / GIRK2-Luc	18 or 18/18

表 4 Gaβγ の量を増減させる実験でトランスフェクションしたプラスミド

Construct	DNA (ng/well)		
	DOR	48	48
PTX S1	190	190	190
Gα i3 or iq1 (C351A)	380	570	950
Venus 156-239-Gβ ₁	24	95	190
Venus 1-155-Gγ ₂	24	95	190
masGRKct-Luc or	18 or	24 or	47.5 or
GIRK1 / GIRK2-Luc	18/18	24/24	47.5/47.5

トランスフェクションの約 24 時間後、6 ウェルプレートの各ウェルに 5 mM EDTA を含む PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) を加えて細胞を剥離し、400×g で 3 分間の遠心により回収した後 1 mL の BRET バッファー (PBS + 0.5 mM MgCl₂, 0.1% glucose) で再懸濁した。96 ウェルプレート (Perkin Elmer) の 1 ウェル当たり 25 μL の細胞懸濁液 (50,000-100,000 細胞を含む)、75 μL の BRET バッファーおよび 25 μL の 5×solution of Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate (Promega) を入れ、Venus の 535 nm の蛍光および Luc の 460 nm の発光を 2030 ARVO X5 (Perkin Elmer) を用いて測定した。同サンプルで 3 回測定を行い、平均値を算出した。BRET シグナルは Venus の蛍光強度を Luc の発光強度で割ることで算出した。D2R および DOR のアゴニストとしては、それぞれドパミン、Met-エンケファリンを終濃度 10 μM にて添加した。その後アンタゴニストとしてそれぞれ 10 倍量のハロペリドール、ナロキソンを添加した。各リガンドを添加した 3 分後に BRET シグナルを測定した。測定は室温で行った。値の比較には、Welch の t 検定を行い、片側検定にて p 値 0.001 未満を有意差ありとした。

発現させた Venus-Gβγ の局在を調べるための蛍光イメージングにおいては、上記と同様の手順で細胞を 35 mm ガラスベースディッシュ (IWAKI) に播種しトランスフェクションした。約 24 時間の培養後、培地を除去し、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (ナカ

ライテスク)を加えて20分間静置することで細胞を固定化した。細胞をPBSで洗浄し、ディッシュにPBSを入れた状態で、共焦点顕微鏡FV10i(Olympus)にて励起480nm/蛍光527nmで観察を行った。発現させたGIRK-Lucの局在を調べる際には、蛍光免疫染色を用いた。同上的手順で細胞をトランスフェクションおよび固定化した後、0.2% Triton X-100を含むPBSを加えて5分間静置することで膜を透過性にした。PBSで2回洗浄し、ブロッキングのため1% BSAと0.05% Tween 20を含むPBSを加えて30分間静置した。その後一次抗体のウサギ抗GIRK1抗体(Abcam ab96168)とヤギ抗GIRK2抗体(Abcam ab65096)を同時に加えて1時間インキュベートした。PBSで3回洗浄し、二次抗体のロバ抗ウサギIgG抗体-Alexa Fluor 488(Abcam ab150073)およびロバ抗ヤギIgG抗体-Alexa Fluor 647(Abcam ab150131)を加えて1時間インキュベートした。PBSで2回洗浄した後、共焦点顕微鏡FV10i(Olympus)にて励起473nm/蛍光520nmおよび励起635nm/蛍光668nmで観察した。

2-4. Gタンパク質の調製

2-4-1. G α の発現と精製

G α の発現・精製は、当研究室において間瀬瑤子博士により確立された方法に従って行った(49, 50)。ヒトGai3のN末端に10 \times His-tagとHRV 3C Protease 認識配列を付加し、pET-24d(Novagen)にNcoI, Sallを用いて組み込んだプラスミドを用いた。各種変異体やキメラ体は、このプラスミドを鋳型としてQuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent technologies)およびIn-Fusion HD Cloning kit(TaKaRa)により作製した。

Ile, Leu, Val, Ala側鎖メチル基を観測対象とした実験のため、重水素化用M9培地を用いてG α を発現させた。目的の配列をもつプラスミドベクターを導入した*E. coli* BL21(DE3) codon plus RPを、90% D₂O / 10% H₂OからなるLB培地5 mLで、37 $^{\circ}$ Cにて終夜培養した。このうち、1 mL分を4,000 \times g, 5分の遠心により集菌した後、99.8% D₂OからなるLB培地10 mLに懸濁して37 $^{\circ}$ Cにて10時間培養を行った。菌体を回収して、前培養用の0.1 Lの重

水素化用 M9 培地に懸濁し 37°C にて終夜培養した。前培養液を、本培養用の 0.9 L の重水素化用 M9 培地に希釈して 37°C で培養を開始した。600 nm における光学密度 (OD₆₀₀) が 0.5 に達した時点で、表 5 に示す選択標識のための前駆体・アミノ酸等 (51-54) を添加するとともに、培養温度を 25°C に変更した。さらに 30 分培養することにより培地の温度を低下させた後、終濃度 1 mM の isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を加え、8 時間培養することにより発現を誘導した。

表 5 Ile, Leu, Val, Ala 選択標識のために添加した試薬

標識する部位	試薬	添加量 (1 L あたり)
Ileδ1-[¹³ CH ₃]	[3, 3-d ₂ , 4- ¹³ C] α-ketobutyric acid	50 mg
Leu/Val-[¹³ CH ₃ , ¹² CD ₃]	[3,4,4,4-d ₄ , 4- ¹³ C] α-ketoisovaleric acid	100 mg
Leu/Val-[¹³ CH ₃ , ¹³ CH ₃]	[dimethyl- ¹³ C ₂] α-ketoisovaleric acid	120 mg
Leu/Val ^{proS} -[¹³ CH ₃]	[2- ¹³ C, 4,4,4-d ₃] acetolactate	300 mg
Alaβ-[¹³ CH ₃]	[2-d, 3- ¹³ C] Alanine	200 mg
	[d ₆] succinate (Alaβ と Leu/Val を同時に標識する場合のみ、スクランブリング抑制のため添加)	2.5 g

精製操作は 4°C で行った。タンパク質の定量には、Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare) にて測定したサンプル溶液の 280 nm の紫外吸光度と、Gai3 のアミノ酸配列より算出したモル吸光係数 $\epsilon = 38,850 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ を用いた。ただし Gaiqi の定量には $\epsilon = 43,320 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ を用いた。透析膜は全て分画分子量 (molecular weight cut off, MWCO) 10,000 の Spectra/Por 7 (Spectrum) を用いた。

培養液を 9,000 × g で 15 分遠心することにより菌体を回収し、菌体 1 L 分あたり 40 mL のバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 100 mM KCl) に懸濁した。終濃度 1 mM の dithiothreitol (DTT), 終濃度 20 μM の GDP, および 20 mg の PMSF を添加した後、氷上に

て TAITEC VP-30S を用いた間欠超音波パルス (Power 6, 3分×4回) により菌体を破碎した。菌体破碎液は 100,000×g, 30 分の遠心により上清と沈殿に分離した。上清を、バッファーA (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 20 μM GDP) で平衡化した HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) にアプライし、N 末端の His-tag を介して Gα をレジンに結合させた。0 mM および 10 mM のイミダゾールを含むバッファーA をそれぞれ 60 カラム体積 (CV), 10 CV 流して夾雑タンパク質を洗浄した後、100 mM および 300 mM のイミダゾールを含むバッファーA をそれぞれ 10 CV, 3 CV 流して Gα を溶出させた。得られた溶出分画の 280 nm の紫外吸光度を測定することにより収量を見積もり、5 units / mg protein の HRV 3C Protease (Novagen) を添加して、His-tag の切断を行った。His-tag 切断反応は、反応液の 30 倍以上の体積のバッファーA を外液として、透析膜中にてイミダゾール濃度を低下させながら、4°Cにて終夜行った。透析膜から回収した反応液を、バッファーA で平衡化した HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) にアプライした。この操作により、HRV 3C Protease, 切断された His-tag および His-tag 未切断の Gα がレジンに吸着され、His-tag の切断された Gα のみを素通らせることができる。さらにバッファーA を 4 CV 流すことにより、His-tag の切断された Gα を完全に溶出させた。こうして得られた Gα を最終精製品とした。Gα の変異体やキメラ体は、野生型 Gαi3 と同様に上記の手順で発現・精製した。

2-4-2. Gβγ の発現と精製

Gβγ の発現・精製は、当研究室にて確立され、修士課程までに改良した方法に基づき、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて以下のように行った (22)。

Gβ としては、ヒト由来 Gβ₁ を用いた。Gγ としては、ヒト由来 Gγ₂ をもとに、N 末端に 6 × His-tag を付加し、C68S 変異を導入した脂質修飾を受けないコンストラクト Gγ₂(His-C68S) を用いた。昆虫細胞にて Gβ と Gγ を同時に発現させるために、それぞれの遺伝子を pFastBac Dual (Gibco) の polyhedrin プロモーターと p10 プロモーターの下流に組み込んだ。Bac-to-

Bac システム (Thermo Fisher Scientific) を用いてウイルスストックを作製した。

SF+細胞 (Protein Sciences) の 2×10^6 cells / mL の細胞懸濁液に対して、G $\beta\gamma$ をコードする P-3 ウイルスストックを multiplicity of infection (MOI) = 4 にて添加し感染させ、G $\beta\gamma$ を共発現させた。培養は、Xuri Cell Expansion System (GE Healthcare) を用いた振盪により行った。27°Cにて48時間培養した後、細胞を800 \times g, 10分の遠心により回収し、-80°Cで保存した。

精製操作は4°Cにて行った。タンパク質の収量は、Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare) にて測定した 280 nm の紫外吸光度と、G $\beta\gamma$ のアミノ酸配列より算出したモル吸光係数 $\epsilon = 57,410$ cm⁻¹M⁻¹ から算出した。透析膜は全て MWCO 10,000 の Spectra/Por 7 (Spectrum) を用いた。

細胞ペレットを 50 mL / 1 L culture となるようにバッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 0.8 \times protease inhibitor cocktail (EDTA free) (ナカライテスク)) に懸濁した。750 psi, 90 分間の nitrogen cavitation (Parr Bomb) もしくは TAITEC VP-30S を用いた間欠超音波パルス (Power 3, 3 分 \times 3 回) により細胞を破碎した。100,000 \times g, 30 分の遠心により、上清と沈殿に分離した。上清を、バッファーB (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM DTT) で平衡化した HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) にアプライし、G γ の N 末端の His-tag を用いて G $\beta\gamma$ をレジンに結合させた。0 mM および 10 mM のイミダゾールを含むバッファーB をそれぞれ 30 CV, 5 CV 流して夾雑タンパク質を洗浄した後、300 mM のイミダゾールを含むバッファーB を 5 CV 流して G $\beta\gamma$ を溶出させた。溶出分画を、50 倍以上の体積のバッファーC (20 mM Tris (pH 7.4), 1 mM DTT) に対して終夜透析することにより、イオン強度を低下させた。透析膜より回収したサンプルを、バッファーC で平衡化した DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) にアプライした。バッファーC を 5 CV 流すことにより、遊離の G γ を洗浄した後、250 mM, 500 mM, および 1 M の NaCl を含むバッファーC をそれぞれ 3 CV, 2 CV, 4 CV 流して G $\beta\gamma$ を溶出させた。溶出分画を、30 倍以上の体積のバッファーD (20 mM NaPi (pH 7.4), 500 mM NaCl, 1 mM DTT) に対して透析するこ

とでバッファー交換を行い、バッファーDで平衡化したゲルボリューム 5 mL の HisTrap HP カラム (GE Healthcare) にアプライした。カラムを ÄKTA purifier もしくは ÄKTA explorer (GE Healthcare) に接続し、0 mM もしくは 500 mM のイミダゾールを含むバッファーDを用いて、25 CV の溶液を流す間にイミダゾール濃度を 0 mM から 250 mM まで上昇させるグラジエントにより溶出させた。G β γ は約 120 mM のイミダゾール濃度にて溶出し、これを最終精製品とした。G β γ 溶液をバッファーE (20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 100 μ M GDP) に置換しつつ 10 mg/mL 程度まで濃縮した。終濃度 5 mM の DTT と 20% (v/v) のグリセロールを添加し、液体窒素で凍結させ、使用するまで -80°C で保存した。

2-4-3. G α β γ の精製

断りのない限り、操作は 4°C にて行った。タンパク質の定量には、Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare) にて測定したサンプル溶液の 280 nm の紫外吸光度と、G α i3 β γ のアミノ酸配列より算出したモル吸光係数モル吸光係数 $\epsilon = 96,260 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ を用いた。G α i q i β γ の場合は $\epsilon = 100,730 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ を用いた。

精製済みの G α の溶液に、1 M DTT 溶液を添加することにより DTT 濃度を 10 mM とした後、MWCO 10,000 の Amicon Ultra (Merck Millipore) を用いた限外ろ過によって 20~100 μ M の濃度まで濃縮した。G β γ は上述の手順で濃縮したストック溶液を用いた。

G α に対して G β γ が過剰となるように両者を混合し、15 分間室温にて静置することにより G α β γ を形成させた。混合溶液には G α β γ と遊離の G β γ が含まれる。15,000 rpm, 15 分の遠心もしくは 0.22 μ m のフィルターろ過によって不溶物を除いた後、混合溶液をゲルろ過カラム Superdex 200 10/300 GL もしくは Superdex 200 26/60 prep grade (GE Healthcare) にアプライした。カラムを ÄKTA purifier もしくは ÄKTA explorer (GE Healthcare) に接続し、バッファーEを流して G α β γ と G β γ を分離した。280 nm の紫外吸光度および SDS-PAGE 解析から、G α β γ

の溶出分画を同定、回収し、最終精製 $G\alpha\beta\gamma$ として以降の解析に用いた。

以上の手順で精製した脂質修飾を持たない $G\alpha\beta\gamma$ を NMR 解析に用いた。脂質修飾のある $G\alpha$, $G\beta\gamma$ はサンプル調製の過程で凝集や自己会合を形成する傾向があったためである。ただし $G\alpha i3$ の N 末端ヘリックスに塩基性残基が集中しているパッチが存在するため、酸性脂質との相互作用により (14, 15)、 $G\alpha i3$ はナノディスクの膜に弱く局在すると予想される。

2-5. GIRK キメラ再構成ナノディスクの調製

2-5-1. GIRK キメラの発現と精製

本研究では KirBac1.3-GIRK1 キメラ体チャンネルを用いた。GIRK キメラは、マウス GIRK1 の残基番号 41-371 のうち、膜貫通領域の四分の三にあたる 83-177 が *Burkholderia xenovorans* の KirBac1.3 の残基番号 62-141 に置換されたタンパク質である (11)。GIRK キメラの N 末端に 10×His-tag および HRV 3C protease 認識配列を付加し pET-24d に組み込んだ発現用プラスミドが、当研究室で横川真梨子博士により作製され、外山侑樹博士により発現条件の最適化が行われていた。本研究では、GIRK キメラの C 末端を 15 残基延長してマウス GIRK1 の残基番号 386 までとしたコンストラクトを用いた。以降このコンストラクトを単に GIRK キメラと呼ぶ。プラスミドを *E. coli* C43 (DE3) (Lucigen) に導入し、非標識 LB 培地 10 mL で、37°C にて終夜前培養を行った。培養液を非標識 LB 培地 1 L に希釈して 37°C にて本培養を開始した。OD₆₀₀ が 0.6~0.7 となった時点で培養温度を 25°C に変更し、30 分後に終濃度 0.3 mM の IPTG を添加した。約 8 時間培養を続け、発現を誘導した。

精製操作は室温で行った。タンパク質の定量には、Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare) にて測定したサンプル溶液の 280 nm の紫外吸光度と、GIRK キメラのアミノ酸配列より算出したモル吸光係数 $\epsilon = 33920 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ を用いた。

培養液を 9,000×g, 15 分間遠心することで菌体を回収し、培養液 1 L あたり 20 mL のバッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM KCl) に懸濁した。20 mg の PMSF を添加した後、氷上にて TAITEC VP-30S を用いた間欠超音波パルス (Power 4.5, 3 分×4 回) により菌体を

破碎した。破碎液に終濃度 20 mM の n-Dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) を添加して室温で 1 時間混和することで可溶化を行った。14,000 \times g, 4 $^{\circ}$ Cにて 30 分間遠心して上清を回収し、バッファーF (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM KCl, 150 mM NaCl, 3 mM DDM) で平衡化した HIS-Select $^{\circledR}$ Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) を加え、室温で 1 時間混和することにより GIRK キメラをレジンに結合させた。20 mM のイミダゾールを含むバッファーF 30 CV でカラムを洗浄した後、400 mM のイミダゾールを含むバッファーF 3 CV で GIRK キメラを溶出させた。

ナノディスクに再構成する前には、1 M DTT 溶液を添加することにより DTT 濃度を 10 mM とした後、MWCO 10,000 の Amicon Ultra (Merck Millipore) を用いた限外ろ過によって GIRK キメラを 10~20 μ M の濃度まで濃縮した。

2-5-2. MSP1E3 の発現と精製

N 末端に 7 \times His-tag と TEV protease 認識配列を付加した MSP1E3 の発現用プラスミドは、当研究室で過去に作製されたものを用いた。MSP1E3 の発現・精製は、先行研究 (55–57) を参考に行った。プラスミドを *E. coli* BL21 (DE3) に導入し、LB 培地 10 mL で、37 $^{\circ}$ Cにて終夜前培養を行った。培養液を TB 培地 500 mL に希釈して 37 $^{\circ}$ Cにて本培養を開始した。OD₆₀₀ が 2.5~3.0 となった時点で終濃度 1 mM の IPTG を添加し、引き続き 37 $^{\circ}$ Cで約 3 時間培養することにより、MSP1E3 を封入体に発現させた。培養液を 9,000 \times g, 15 分間遠心することで菌体を回収し、培養液 1 L あたり 20 mL のバッファーG (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 300 mM NaCl) に懸濁し、精製開始までは-80 $^{\circ}$ Cにて凍結保存した。

精製操作は 4 $^{\circ}$ Cで行った。透析膜は全て MWCO 10,000 の Spectra/Por 7 (Spectrum) を用いた。

菌体を解凍し、培養液 1 L あたり 20 mg の PMSF を添加した後、氷上にて TAITEC VP-30S を用いた間欠超音波パルス (Power 4.5, 3 分 \times 4 回) により菌体を破碎した。4 $^{\circ}$ C、14,000 \times g

にて 30 分間遠心し、沈殿を回収した。沈殿を 1% TritonX-100 を含むバッファーG に懸濁することで封入体を可溶化し、4°C, 100,000×g, 1 時間の遠心により上清成分を回収した。上清をバッファーG で平衡化した 20 mL の HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) にアプライし、N 末端の His-tag を介して MSP1E3 をレジンに結合させた。1% TritonX-100 を含むバッファーG 10 CV, 30 mM コール酸ナトリウムを含むバッファーG 10 CV, 10 mM のイミダゾールを含むバッファーG 5 CV で順次カラムを洗浄した後、300 mM のイミダゾールを含むバッファーG 5 CV で MSP1E3 を溶出させた。溶出分画を、20 倍以上の体積の外液 (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT) に対して 10 時間透析しバッファー交換を行った。溶液の 280 nm の紫外吸光度を測定することにより収量を見積もり、TEV Protease を 1 mg/ 20 mg MSP1E3 となるように添加し、4°C で静置して His-tag の切断を行った。SDS-PAGE にて切断を確認後、反応液を 20 倍以上の体積のバッファーH (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 150 mM KCl) に対して 2 回以上透析した。透析サンプルを回収し、バッファーH で平衡化した 5 mL の HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) にアプライし、His-tag の切断された MSP1E3 を素通らせた。さらにバッファーH を 3 CV 流すことにより、His-tag の切断された MSP1E3 を完全に溶出させた。MSP1E3 を含む分画を MWCO 10,000 の Amicon Ultra (Merck Millipore) を用いて限外ろ過し、約 700 μM の濃度まで濃縮した。液体窒素で凍結させ、使用するまで -80°C で保存した。

2-5-3. ナノディスク再構成

CHCl₃ 系の溶媒に溶解した脂質 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG), Brain PI(4,5)P2 (Avanti Polar Lipid) を、重量比 70:25:5 にて混合し、減圧乾燥した。50 mM コール酸ナトリウムを含むバッファーH を加えて 25 mg/mL となるように再懸濁し、室温で 1 時間以上インキュベートした。GIRK キメラ、脂質、MSP1E3 を、終濃度がそれぞれ 10-20 μM, 12 mM, 100 μM となるように混合し、4°C で

1.5 時間インキュベートした後、80% (w/w) の Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad) を添加し、4°C で 1.5 時間混和した。

反応溶液をバッファーI (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 150 mM KCl, 0.1 mM TCEP) で平衡化した HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) にアプライした。20 mM のイミダゾールを含むバッファーI 20 CV で GIRK キメラが再構成されていないナノディスクを洗浄した後、400 mM のイミダゾールを含むバッファーI 2.5 CV で GIRK キメラが再構成されたナノディスク (GIRK キメラ-ナノディスク) を溶出させた。

GIRK キメラ-ナノディスクは 280 nm の吸光度から定量した。このとき、一粒子の GIRK キメラ-ナノディスクが 2 分子の MSP1E3 と、1 つの GIRK キメラ四量体から構成されていると考え、MSP1E3 のモル吸光係数 $32,430 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ と GIRK キメラのモル吸光係数 $33,920 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ を足し合わせた $(32,430 \times 2 + 33,920 \times 4) = 200,540$ を、一粒子あたりのモル吸光係数として用いた。GIRK キメラ-ナノディスクの溶出画分を PD-10 カラム (GE Healthcare) にアプライし、バッファーJ (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 150 mM KCl, 1 mM DTT) に交換した。20 units / 1 mg GIRK キメラとなるように HRV 3C Protease (Novagen) を添加して、4°C で終夜静置することで His-tag の切断を行った。反応液を、バッファーJ で平衡化した HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) にアプライし、His-tag の切断された GIRK キメラ-ナノディスクを素通らせた。さらに 20 mM のイミダゾールを含むバッファーJ を 9 CV 流すことにより、His-tag の切断された GIRK キメラ-ナノディスクを完全に溶出させた。

2-6. NMR測定

2-6-1. 測定・解析条件

NMR 測定は特記のない限り cryoprobe (Bruker) を装備した Avance 600 (Bruker) を用いて磁場 14.1 Tesla, 20°Cにて行った。 ^1H の化学シフト値は、内部標準として添加した DSS のメチル基の ^1H の化学シフト値を 0 ppm として補正し、 ^{15}N および ^{13}C の化学シフト値は ^1H の

補正值をもとに磁気回転比の比を用いて補正した (58)。NMR 測定データは、TopSpin 2.1, 3.1 もしくは 3.5 (Bruker) を用いてフーリエ変換し、TopSpin および Sparky ver.3.114 (T. D. Goddard and D. G. Kneller, Sparky 3, University of California, San Francisco, CA) を用いてシグナルの帰属と強度の算出を行った。

NMR サンプルのバッファー組成は、特記のない限り、20 mM HEPES-NaOH, pH 指示値 7.0, 150 mM KCl, 0.5 mM GDP, 5 mM DTT, 0.1 mM DSS, 99.5% D₂O (Gai3βγ の帰属用測定) または 20 mM HEPES-NaOH, pH 指示値 7.0, 150 mM KCl, 0.5 mM GDP, 0.1 mM TCEP, 0.1 mM DSS, 99.5% D₂O (その他の測定) とした。

2-6-2. Gai3βγ の帰属

GDP 結合型 Gai3 の nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) 測定

Gai3βγ の Ile, Leu, Val, Ala 側鎖メチル基シグナルへ帰属を移行するため、GDP 結合型 Gai3 (Gai3(GDP) と表記する) の Ile, Ala 側鎖メチル基の帰属を行うこととし、すでに帰属が確立されている Gai3(GDP) の主鎖アミド基の ¹H (59) と、Ile, Ala の側鎖メチル基の ¹H との核オーバーハウザー効果 (nuclear Overhauser effect, NOE) を解析した。そのために、{uniformly-labeled (ul)-[²H,¹⁵N], Ileδ₁, Ala-[¹³CH₃]} Gai3(GDP) 710 μM のサンプルを調製し、表 6 に示す各種 3D NOESY 測定を行った。バッファーは、10% D₂O/90% H₂O の 20 mM HEPES (pH7.0), 150 mM KCl, 5 mM DTT, 0.5 mM GDP を用いた。繰り返しの待ち時間は [¹H-¹H] NOESY- [¹H-¹³C] HMQC では 1.0 秒、 [¹H-¹H] NOESY- [¹H-¹⁵N] TROSY-HSQC および [¹H-¹³C] HMQC- [¹H-¹H] NOESY- [¹H-¹⁵N] TROSY-HSQC では 1.2 秒とした。

表 6 3D NOESY 測定のパラメータ

Experiment	Number of scan	Mixing time (ms)	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
[¹ H- ¹ H] NOESY- [¹ H- ¹⁵ N] TROSY- HSQC	16	200	F1 (¹ H)	112	14	4.70
			F2 (¹⁵ N)	80	32	117.0
			F3 (¹ H)	2048	14	4.70
[¹ H- ¹ H] NOESY- [¹ H- ¹³ C] HMQC	16	150	F1 (¹ H)	92	16	4.70
			F2 (¹³ C)	80	13	13.5
			F3 (¹ H)	1024	14	4.70
[¹ H- ¹ H] NOESY- [¹ H- ¹³ C] HMQC	16	200	F1 (¹ H)	120	16	4.70
			F2 (¹³ C)	80	13	13.5
			F3 (¹ H)	1024	14	4.70
[¹ H- ¹³ C] HMQC- [¹ H- ¹ H] NOESY- [¹ H- ¹⁵ N] TROSY- HSQC	32	200	F1 (¹³ C)	47	13	13.5
			F2 (¹⁵ N)	80	32	117.0
			F3 (¹ H)	2048	14	4.70

また、当研究室で過去に測定された Gai3(GDP) のスペクトルから帰属を移行するにあたり、今回の測定条件と比べて過去の測定条件では測定バッファーに 10 mM MgCl₂ が含まれる点、温度が 30°C もしくは 25°C である点が異なっていた。帰属を移行するため、MgCl₂ 依存的な Gai3(GDP) の化学シフト変化が生じるか検討することとし、MgCl₂ を 0, 0.1, 1, 2, 5, 10 mM 添加した条件での [¹H-¹⁵N] TROSY-HSQC 2D スペクトルおよび [¹H-¹³C] HMQC 2D スペクトルを測定した。繰り返しの待ち時間は [¹H-¹⁵N] TROSY-HSQC では 1.0 秒、[¹H-¹³C] HMQC では 1.2 秒とした。積算回数、ポイント数、スペクトル幅は表 7 に示した。MgCl₂ 滴定実験および 20, 25, 30°C のスペクトルの比較から、MgCl₂ および温度に依存的な化学シフト変化を見積もった。それらの化学シフト変化を補正して過去のスペクトルから帰属を移行した。

NOE パターンを比較するための結晶構造には GDP 結合型 Gai1 (PDB ID: 1GDD) (60) を用いた。

表 7 Gai3(GDP) に対する MgCl₂ 滴定実験の測定のパラメータ

Experiment	Number of scan	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
[¹ H- ¹⁵ N] TROSY-HSQC	16	F1 (¹⁵ N)	220	32	117.0
		F2 (¹ H)	2048	16	4.70
[¹ H- ¹³ C] HMQC	4	F1 (¹³ C)	256	20	16.0
		F2 (¹ H)	1024	10	0.50

Gai3βγ の NOESY 測定

Ile, Ala との NOE を解析して Leu, Val の帰属を行うため、シグナル数を減らし NOE パターンの同定が容易になるように、Leu, Val の *proS* メチル基のみを ¹³C 標識したサンプルを用いた。さらに、帰属が得られた Leu, Val の *proS* メチル基シグナルを起点とし、残基内および残基間の NOE を解析して *proS*, *proR* の帰属を行うため、Leu, Val の 2 個のメチル基とともに ¹³C 標識したサンプルを用いた。前者については {ul-[²H,¹⁵N], Ileδ₁-[¹³CH₃], Ala-[¹³CH₃], Leu/Val-[¹³CH₃]^{*proS*}}Gai3-[non-labeled]βγ 460 μM のサンプルを調製した。後者については {ul-[²H,¹⁵N], Leu/Val-[¹³CH₃, ¹³CH₃]}Gai3-[non-labeled]βγ 300 μM のサンプルを調製した。それぞれ、[¹H-¹H]NOESY-[¹H-¹³C]HMQC, および [¹H-¹³C]HMQC-[¹H-¹H]NOESY-[¹H-¹³C]HMQC の 3D NOESY 測定を、mixing time 100 ms にて行った。繰り返しの待ち時間は 1.2 秒とした。積算回数、ポイント数、スペクトル幅は表 8, 表 9 に示した。NOE パターンを比較するための結晶構造には Gai1β₁γ₂ (PDB ID: 1GP2) (13)を用いた。

表 8 {ul-[²H,¹⁵N], Ile δ_1 -[¹³CH₃], Ala-[¹³CH₃], Leu/Val-[¹³CH₃]^{proS}}Gai3-[non-labeled] $\beta\gamma$ の 3D NOESY 測定のパラメータ

Experiment	Number of scan	Mixing time (ms)	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
[¹ H- ¹ H] NOESY- [¹ H- ¹³ C] HMQC	16	100	F1 (¹ H)	100	3.5	0.70
			F2 (¹³ C)	128	20	16.0
			F3 (¹ H)	1024	10	0.70
[¹ H- ¹³ C] HMQC- [¹ H- ¹ H] NOESY- [¹ H- ¹³ C] HMQC	24	100	F1 (¹³ C)	88	20	16.0
			F2 (¹³ C)	128	20	16.0
			F3 (¹ H)	1024	10	0.70

表 9 {ul-[²H,¹⁵N], Leu/Val-[¹³CH₃, ¹³CH₃]}Gai3-[non-labeled] $\beta\gamma$ の 3D NOESY 測定のパラメータ

Experiment	Number of scan	Mixing time (ms)	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
[¹ H- ¹ H] NOESY- [¹ H- ¹³ C] HMQC	22	100	F1 (¹ H)	64	3.0	0.45
			F2 (¹³ C)	80	12	20.0
			F3 (¹ H)	1024	10	0.45
[¹ H- ¹³ C] HMQC- [¹ H- ¹ H] NOESY- [¹ H- ¹³ C] HMQC	32	100	F1 (¹³ C)	68	12	20.0
			F2 (¹³ C)	80	12	20.0
			F3 (¹ H)	1024	10	0.70

変異体 G α ・GDP および G $\alpha\beta\gamma$ の HMQC 測定

Gai3 の 32 種類の変異体 (L5I, A7V, A11V, A12V, V13A, I19V, L23I, A30V, A31V, V50I, V71A, V73I, A98S, A99S, A101V, A111S, A114V, V118F, I162V, V174I, V179I, V185I, V201I, L232I, V233I, L234I, A235V, L273I, L310I, V342I, L348I, L353I) を作製し、{[ul-²H, ¹⁵N], Ile δ_1 , Leu/Val or Ala-[¹³CH₃]} 標識体を各 0.25 L 分培養、精製した。Gai3(GDP) の状態で 120~170 μ M 程度のサンプルを調製した。Gai3 $\beta\gamma$ のサンプルとしては、Gai3 60 μ M に対して過剰量 (62-73 μ M

程度) の非標識 G β y を添加したものをを用いた。それぞれのサンプルについて、cryoprobe (Bruker) を装備した Avance 500 (Bruker) を用いて磁場 11.8 T, 温度 20°Cにて [¹H-¹³C] HMQC スペクトルを測定した。積算回数はサンプルによって 16~160 回とした。ポイント数、スペクトル幅は表 10 に示した。Gai3 β y のサンプルにおいては、全ての Gai3 が G β y 結合状態となっていることを確かめるため、Gai3(GDP) と Gai3 β y とで化学シフト変化する A226, I253, および L398I のシグナルについて、Gai3(GDP) 状態のシグナルが消失していること、G β y 結合状態のシグナルが出現することを確認した。

表 10 G α β y の帰属のための [¹H-¹³C] HMQC 測定条件

Experiment	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
[¹ H- ¹³ C] HMQC (Ile mutants)	F1 (¹³ C)	256	8	10
	F2 (¹ H)	2048	10	1.20
[¹ H- ¹³ C] HMQC (Leu/Val mutants)	F1 (¹³ C)	384	12	20
	F2 (¹ H)	1024	10	1.20
[¹ H- ¹³ C] HMQC (Ala mutants)	F1 (¹³ C)	256	8	16.5
	F2 (¹ H)	1024	10	1.20

2-6-3. Gaiqi β y の帰属

Gaiqi β y 中の Gaiqi の Ile, Leu, Val, Ala の側鎖メチル基シグナルの帰属を行った。

Gaiqi のうち、Gai3 に由来する N 末端領域および GTPase ドメインは、Gai3 と同一の構造を持ち、メチル基シグナルの化学シフトも一致すると予想した。実際に、Gaiqi[ILVA] β y の [¹H-¹³C] HMQC スペクトルにおいて、3 分の 2 程度のシグナルは Gai3[ILVA] β y と化学シフト値が概ね一致していたことから、帰属を移行した。

移行できなかったシグナルについては、残基間および残基内のメチル基同士の NOE パターンを結晶構造と比較することにより、帰属を進めた。Ile, Leu, Val, Ala の残基間の NOE を

解析するため、 $\{\text{ul-}[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]; \text{Ala}\beta, \text{Ile}\delta 1, \text{Leu}\delta, \text{Val}\gamma\text{-}[^{13}\text{CH}_3]\}$ $\text{G}\alpha\text{iqi-}[\text{non-labeled}]\beta\gamma$ 250 μM のサンプルを調製した。残基内および残基間の NOE を解析して *proS*, *proR* の帰属を行うため、Leu, Val の 2 個のメチル基をともに ^{13}C 標識したサンプル $\{\text{ul-}[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]; \text{Leu/Val-}[^{13}\text{CH}_3, ^{13}\text{CH}_3]\}$ $\text{G}\alpha\text{iqi-}[\text{non-labeled}]\beta\gamma$ 180 μM を調製した。それぞれについて、 $[\text{H-}^{13}\text{C}]$ HMQC- $[\text{H-}^1\text{H}]$ NOESY- $[\text{H-}^{13}\text{C}]$ HMQC の 3D NOESY 測定を、表 11, 表 12 に示す条件で行った。NOE パターンを比較するための結晶構造として、 $\text{G}\alpha\text{i1}\beta\gamma$ (PDB ID: 1GP2) (13) と $\text{G}\alpha\text{q}\beta\gamma$ (PDB ID: 3AH8) (61) を用いた。また、 $\text{Leu/Val}^{\text{proS}}$ と $\text{Leu/Val}^{\text{proR}}$ を帰属するため、 $\text{Leu/Val}^{\text{proS}}$ のみを標識した $\{\text{ul-}[^2\text{H}, ^{15}\text{N}], \text{Ile}\delta 1, \text{Leu/Val}^{\text{proS}}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]\}$ $\text{G}\alpha\text{iqi-}[\text{non-labeled}]\beta\gamma$ 110 μM のサンプルの $[\text{H-}^{13}\text{C}]$ HMQC スペクトルを表 13 に示す条件で測定した。

表 11 $\{\text{ul-}[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]; \text{Ala}\beta, \text{Ile}\delta 1, \text{Leu}\delta, \text{Val}\gamma\text{-}[^{13}\text{CH}_3]\}$ $\text{G}\alpha\text{iqi-}[\text{non-labeled}]\beta\gamma$ の 3D NOESY 測定のパラメータ

Experiment	Number of scan	Mixing time (ms)	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
$[\text{H-}^{13}\text{C}]$ HMQC-	16	100	F1 (^{13}C)	80	20	16.0
$[\text{H-}^1\text{H}]$ NOESY-			F2 (^{13}C)	128	20	16.0
$[\text{H-}^{13}\text{C}]$ HMQC			F3 (^1H)	1024	10	0.70

表 12 $\{\text{ul-}[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]; \text{Leu/Val-}[^{13}\text{CH}_3, ^{13}\text{CH}_3]\}$ $\text{G}\alpha\text{iqi-}[\text{non-labeled}]\beta\gamma$ の 3D NOESY 測定のパラメータ

Experiment	Number of scan	Mixing time (ms)	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
$[\text{H-}^{13}\text{C}]$ HMQC-	16	100	F1 (^{13}C)	80	12	20.5
$[\text{H-}^1\text{H}]$ NOESY-			F2 (^{13}C)	80	12	20.5
$[\text{H-}^{13}\text{C}]$ HMQC			F3 (^1H)	1024	10	0.70

表 13 {ul-[²H, ¹⁵N], Ile δ 1, Leu/Val^{proS}-[¹³CH₃]} Gaiqi-[non-labeled] $\beta\gamma$ の測定パラメータ

Experiment	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
[¹ H- ¹³ C] HMQC	F1 (¹³ C)	512	20	16.0
	F2 (¹ H)	1024	10	0.50

2-6-4. G $\alpha\beta\gamma$ に GIRK キメラ-ナノディスクを添加する実験

Gai3 $\beta\gamma$ または Gaiqi $\beta\gamma$ に GIRK キメラ-ナノディスクを添加したときの NMR スペクトルの変化を調べるため、{ul-[²H, ¹⁵N]; Ala β , Ile δ 1, Leu δ , Val γ -[¹³CH₃]} G α -[non-labeled] $\beta\gamma$ (以降 G α [ILVA] $\beta\gamma$ と表記) を Gai3 または Gaiqi を用いて調製した。G α [ILVA] $\beta\gamma$ 11 μ M に対して、GIRK キメラ-ナノディスク 22 μ M を添加時および非添加時の [¹H-¹³C] HMQC スペクトルを測定した。積算は 224 もしくは 256 回とし、ポイント数、スペクトル幅は表 14 の通りである。

表 14 G $\alpha\beta\gamma$ に GIRK キメラ-ナノディスクを添加する実験の測定パラメータ

Experiment	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
[¹ H- ¹³ C] HMQC	F1 (¹³ C)	256	20	16.0
	F2 (¹ H)	1024	10	0.50

2-6-5. PRE 実験

サンプル調製

GIRK キメラに残基特異的にスピンラベルを修飾するため、反応性のシステイン残基をもたない GIRK キメラの C53S/C310T 変異体を作製した。この変異体をテンプレートとして、GIRK の Q344, V351 もしくは L366 をシステインに置換することで、目的の残基のみが修飾されるようにした。それらの変異体 GIRK キメラを精製しナノディスクに再構成した後、NAP-5 カラム (GE Healthcare) を用いたゲルろ過によりバッファー (50 mM Tris-HCl (pH7.0),

100 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.1 mM TCEP) に置換した。5~10 μ M の GIRK キメラ-ナノディスクに対して、終濃度 0.9 mM の 4-maleimido-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (4-maleimido-TEMPO) (Sigma-Aldrich) を添加して室温で 4 時間以上静置することで修飾反応を進行させた。反応前後にて、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA) をマトリックスとしたマトリックス支援レーザー脱離イオン化法による飛行時間型質量分析を、Axima TOF² (Shimadzu Biotech) を用いて行い、修飾効率を見積もった。1 残基への修飾反応がほぼ完全に進行した時点で、NAP-5 または PD-10 カラム (いずれも GE Healthcare) を用いたゲルろ過により過剰の 4-maleimido-TEMPO を除去した。修飾後の GIRK キメラ-ナノディスクは MWCO 10,000 の Amicon Ultra (Merck Millipore) で濃縮し NMR 測定用バッファーに置換した。

測定

Gai3[ILVA] $\beta\gamma$ 20 μ M と 4-maleimido-TEMPO 修飾 GIRK キメラ-ナノディスク 約 25 μ M を混合したサンプルを調製し、 $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ HMQC スペクトルを測定した (常磁性状態)。測定後のサンプルに終濃度 0.3 mM のアスコルビン酸を添加し、30 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベート、さらに室温で 8 時間程度インキュベートすることで、TEMPO を還元した状態で $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ HMQC スペクトルを測定した (反磁性状態)。積算は 128 もしくは 192 回とし、ポイント数、スペクトル幅は表 15 の通りである。

表 15 PRE 実験の測定パラメータ

Experiment	Nucleus	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
$[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ HMQC	F1 (^{13}C)	256	20	16.0
	F2 (^1H)	1024	10	0.50

常磁性状態のシグナル強度 I^{para} および反磁性状態のシグナル強度 I^{dia} から、シグナルの緩和速度における常磁性緩和促進 (PRE) の寄与 Γ_2 を下記の式により算出した (62)。

$$\frac{I^{para}}{I^{dia}} = \frac{\exp(-\Gamma_2 t_{HMOC}) R_2^{diaH} R_2^{diaHC}}{(R_2^{diaH} + \Gamma_2)(R_2^{diaHC} + \Gamma_2)}$$

R_2^{diaH} と R_2^{diaHC} はそれぞれ反磁性状態でのメチル基の ^1H 一量子遷移と、 ^1H と ^{13}C の多量子遷移の緩和速度を表し、 $Gai3[ILVA]\beta\gamma$ 200 μM 単独状態で測定した緩和速度 (63, 64) を使用した。 t_{HMOC} は HMQC 測定の磁化移動時間であり 6.9 msec とした。

2-7. 構造計算

2-7-1. 初期構造の準備

$Gai1(\text{GDP})\beta_1\gamma_2$ の結晶構造 (PDB ID: 1GP2) (13) をテンプレートとして、SWISS-MODEL (65) を用いて $Gai3(\text{GDP})\beta_1\gamma_2$ のホモロジーモデルを作成した。なお $Gai1$ と $Gai3$ とでアミノ酸配列は 94% 同一である。

GIRK キメラの結晶構造 (PDB ID: 2QKS_1) (11) には、GIRK1 に由来する部分のうち残基番号 75-81 および 365-371 の原子座標が含まれていない。そこで残基番号 75-81 はループとして SWISS-MODEL (65) にてモデルを構築した。また GIRK1 細胞内領域の結晶構造 (PDB ID: 1N9P) (8) から、残基番号 365-370 の座標を移行した。以上のように補完した GIRK キメラを、CHARMM-GUI Nanodisc Builder (66) にてナノディスクに埋め込んだ構造を作成した。MSP1E3 を用い、脂質組成は POPC 100% とした。

以上により得られた構造を計算の初期構造とした。

2-7-2. ドッキングシミュレーション

構造計算は XPLOR-NIH (67, 68) を用いて行った。

GIRK キメラ (四量体) の構造において、各サブユニットの Q344, V351, L366 を 4-maleimido-TEMPO が付加されたシステイン残基に置換した。側鎖の空間的自由度を考慮して、4-maleimido-TEMPO のとりうる範囲を再現するため、シミュレーテッドアニーリングにより 4-maleimido-TEMPO がとりうる異なる 5 つのコンフォメーションを生成し、以降 4-maleimido-TEMPO グループはそれらのアンサンブルとして扱うことにした。

複合体モデルの構築は 2 段階で行った。本項では 1 段階目について述べる。1 段階目では、GIRK の L366C を修飾した際の PRE データを用いて、GIRK の C 末端ヘリックスと Gai3 をドッキングした。なお計算負荷を減らすため、この段階では GIRK キメラ-ナノディスクと Gai3 $\beta\gamma$ の中でも GIRK の C 末端ヘリックスと Gai3 のみを扱った。ドッキングシミュレーションの際には、ファンデルワールス反発、二面角、結合長、角度、平面性を表す一般的なエネルギー項と、PRE などの実験に基づくエネルギー項を足し合わせたターゲット関数が小さくなるように計算を行う。PRE 実験のデータを拘束条件として使用する際には、サンプル中における Gai3 $\beta\gamma$ の GIRK 結合分率を 0.1 と仮定して、Gai3 の各残基の Γ_2 実測値を 10 倍した。その値と、モデル構造からの計算値が離れているほど PRE の項が加算される。

下記の手順でドッキングを行った。ドッキングの全ての段階において、ポリペプチド鎖の二面角、結合長、角度、平面性を保つための項をターゲット関数に加えた。

① PRE とファンデルワールス反発の項を用いて、3000K の高温にて 10 ps の間二面角を動かした後、10K までアニーリングし、GIRK の C 末端ヘリックスと Gai3 とをドッキングした。

② 4-maleimido-TEMPO の側鎖が Gai3 と直接接触することは生体内のタンパク質同士の相互作用では起こり得ない。そのような接触を避けるため、4-maleimido-TEMPO が付加された L366C の側鎖を Gai3 から離すような仮定の距離拘束の存在下で、3000K の高温にて 3 ps の間二面角を動かした後、10K までアニーリングした。

③ PRE とファンデルワールス反発の項、ならびに溶媒和エネルギーを表す項 (69) を用いて、3000K の高温にて 1 ps の間二面角を動かした後、10K までアニーリングした。10K にてさらにエネルギーの最小化を行った。

以上の手順により、GIRK の C 末端ヘリックスと $G\alpha$ のみをドッキングした 500 個の構造を生成し、最もエネルギーが低い構造を全長の GIRK キメラ-ナノディスクと $G\alpha i3\beta\gamma$ に復元して 2 段階目の計算に用いた。

2-7-3. アンサンブルの構築

2 段階目の計算では、GIRK キメラの C 末端ヘリックスと β ストランド領域の間のループ領域 (残基番号 352-357) の構造を動かした。この領域は、GIRK の結晶構造 (7, 8) および分子動力学シミュレーション (70) においてランダムコイル構造をとっており、他の部位とほとんど水素結合を形成していないことから、構造に自由度があることが予想される。 $G\alpha i3\beta\gamma$ に対する GIRK の C 末端ヘリックスの配置を保ったまま、残基番号 352-357 の二面角をランダムに変化させて複数の構造を作り出し、原子同士の衝突がない構造を選んだ。計 30,000 構造を得て、各構造から、Q344C, V351C, または L366C を常磁性修飾した場合の Γ_2 の値を逆計算した。これらの構造を用いてアンサンブルを作成し、アンサンブルと実験データとのずれ具合を表す Q-factor (Q_{ens} ; 下式) (71) が最小となるように各構造の存在割合を最適化した。

$$Q_{\text{ens}} = \sqrt{\frac{\sum_i (\Gamma_2^{\text{obs}}(i) - \sum_k p_k \Gamma_2^{\text{calc},k}(i))^2}{\sum_i \Gamma_2^{\text{obs}}(i)^2}}$$

ただし $\Gamma_2^{\text{obs}}(i)$ は i 番目の残基の Γ_2 の実測値、 $\Gamma_2^{\text{calc},k}(i)$ は k 番目の構造から逆計算した i 番目の残基の Γ_2 、 p_k は k 番目の構造の存在割合である。最適化は R 言語 (<https://www.r->

project.org/) の `optim` 関数を用いて、多段階に分けて行った。主に 10,000 構造を用いて下記の手順で計算を行った。

- ① 生成した 30,000 構造のうち 10,000 構造をランダムに選んで、100 構造ずつの組に分けた。各組で 100 構造のアンサンブルとして Q_{ens} が最小になるように、シミュレーテッドアニーリングと Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno 法を順次適用して存在割合を最適化した。
- ② 100 構造の組を 10 個まとめて 1,000 構造のグループとし、各組で最適化した存在割合の 1/10 を初期値として、同様の最適化を行った。
- ③ 1,000 構造のグループのうち最適化後の存在割合が高い上位 100 構造を、10 個のグループからそれぞれ選出して、計 1,000 構造を集めた。各グループで最適化した存在割合の 1/10 を初期値として、同様の最適化を行った。

なお、30,000 構造を全て用いる場合は、①にて 300 構造ずつの小グループに分け、それを 100 構造ずつ 3 組に分けてそれぞれ最適化した後、3 組をまとめて存在割合の 1/3 を初期値として再度小グループで最適化を行い、上位 100 構造を選出した。10 個の小グループから集めた計 1,000 構造を、②のグループ計算に用いた。

上記の手順で 10,000 構造を用いて作成した 10 個のアンサンブルを平均した。GIRK に対する $G\alpha i3\beta\gamma$ の分布を可視化するため、XPLOR-NIH を用いて原子存在密度マップを計算した (72)。存在密度マップは PyMOL (<http://www.pymol.org>) を用いて表示した。分子表面の静電ポテンシャルは PyMOL 用 APBS Tools 2.1 plugin (73) を用いて作成した。

第3章 結果

本章においては、まず、3-1.節にて GIRK の開口能を定量する実験を行い、 $G\alpha$ が GIRK 開口の選択性を決定していることを示し、 $G\alpha$ と GIRK との相互作用に着目した。3-2.節で *i/o* ファミリーに属する $G\alpha i3$ の $G\alpha i3\beta\gamma$ 状態での NMR シグナルの帰属を行い、GIRK と $G\alpha i3\beta\gamma$ の相互作用を解析する基盤を確立した。次に、3-3.節にて $G\alpha i3\beta\gamma$ に GIRK を添加した際に観測されるスペクトル変化を解析し、両者の直接の結合が選択的に生じることを検出した。3-4.節にて $G\alpha i3\beta\gamma$ と GIRK の複合体中の距離情報を収集した。それをを用いて 3-5.節にてドッキングシミュレーションを行い、複合体モデル構造を構築し、結合部位を明らかとした。3-6.節にて、結合部位の変異体実験を行い、明らかとした相互作用が GIRK 開口の選択性を担っていることを検証した。

3-1. GIRK開口におけるファミリー選択性を決定する部位の同定

GIRK の開口における $G\alpha i/o$ 選択性を定量的に評価し、また選択性を決定する $G\alpha$ の部位を同定するため、細胞を用いた BRET 実験系を構築した。これまで、 $G\alpha i/o$ 選択的な GIRK の開口を観測してきたのは、GIRK と各種 GPCR, $G\alpha$ を発現させた卵母細胞や培養細胞に GPCR のアゴニストを添加した際の電流を測定する電気生理実験であった (28, 29)。これらの実験で観測される電流の大きさは、G タンパク質の活性化度合、つまり GPCR への刺激に応じて解離する $G\beta\gamma$ の量に依存する。G タンパク質の活性化度合は $G\alpha$ の種類や変異導入によって異なっている可能性があるため、GIRK と選択的に共役するか否かを $G\alpha$ の種類間で定量的に比較することは困難であった。そこで本研究では、G タンパク質の活性化量で規格化して、GIRK の開口を評価する系を構築した。具体的には、各条件で 2 種類の測定を行った。1 種類目の測定では、GPCR のアゴニスト添加に伴う GIRK と $G\beta\gamma$ の BRET シグナルの変化を測定する。GIRK と開口因子 $G\beta\gamma$ の間の BRET の変化量は、GPCR 刺激に応

じた GIRK の開口に相当する。2 種類目の測定では、G $\beta\gamma$ と、G タンパク質の活性化のレポーターとなる GPCR kinase の G $\beta\gamma$ 結合ドメイン (以降 GRK と呼ぶ) との BRET を測定する。このときの BRET 変化量は、G タンパク質が活性化して解離した G $\beta\gamma$ の総量を反映する。後者の BRET 変化量で前者の BRET 変化量を規格化することにより、G α の種類ごとの GIRK 開口能を評価し、G α のファミリーや変異体間で比較した。

BRET 実験では、HEK293T 細胞に、GPCR, G α , 蛍光タンパク質 Venus 融合 G $\beta\gamma$ (Venus-G $\beta\gamma$ と呼ぶ), ルシフェラーゼ (Luc) 融合 GIRK もしくは GRK (GIRK-Luc, GRK-Luc と呼ぶ) を発現させた (Figure 12)。発現させた G タンパク質および GIRK の細胞における局在を、Venus によるイメージングおよび蛍光免疫染色により観測した (Figure 13)。Venus-G $\beta\gamma$ は単独では細胞質に分布していた一方、G α を共発現させると細胞の縁に局在した (Figure 13A)。このことから、発現させた G α と Venus-G $\beta\gamma$ が G $\alpha\beta\gamma$ を形成し細胞膜に分布していると判断した。この結果は先行研究と一致していた (48)。GIRK1 と Luc 融合 GIRK2 を共発現させた場合、抗 GIRK1 と抗 GIRK2 の抗体によって細胞の縁が同時に染色され、同一の細胞の膜上に GIRK1 と GIRK2 が発現していることが示された (Figure 13B)。このことから、細胞膜上に GIRK1/2 ヘテロ四量体チャネルが形成されていると判断した。

GPCR として DOR を発現させた細胞に DOR のアゴニストである Met-エンケファリンを添加したところ、DOR の活性化に応じて解離した Venus-G $\beta\gamma$ と GIRK-Luc が結合することによりエネルギー転移が亢進し、それに伴い BRET シグナルの増大が観測された (Figure 12B 上段)。さらに、BRET シグナルはアゴニストの 10 倍量のアンタゴニスト、ナロキソンの添加により、アゴニスト添加前程度の数値に戻った。このことから、本実験で観測される BRET 変化は、DOR を介した G タンパク質シグナリングによる G $\beta\gamma$ -GIRK の結合を可逆的に反映していることが示された。GRK-Luc を発現させた細胞でも、同様の BRET 変化が観測された (Figure 12B 下段)。各種 G タンパク質の活性化度合を揃えて GIRK の開口能を比較するため、GRK-Luc を用いた実験での BRET シグナルの増大 $\Delta\text{BRET}_{\text{GRK}}$ により GIRK-

Luc を用いた実験での BRET シグナルの増大 $\Delta\text{BRET}_{\text{GIRK}}$ を規格化した。この $\Delta\text{BRET}_{\text{GIRK}}/\Delta\text{BRET}_{\text{GRK}}$ の値を、”specificity factor” と名付け、 $\text{G}\alpha$ 間で比較することとした。

Rusinova らの先行研究にて、M2R を介した GIRK の開口において $\text{G}\alpha$ のヘリカルドメインが選択性をもたらしていることが報告されていた (29)。この論文で使われているコンストラクトを参考に、本研究では 3 種類の $\text{G}\alpha$ を用いて specificity factor を比較した (Figure 14A)。

- ① $\text{G}\alpha\text{i}3$: $\text{G}\alpha\text{i/o}$ ファミリーに属する。
- ② $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}5$: $\text{G}\alpha\text{q}$ の C 末端 5 残基を $\text{G}\alpha\text{i}3$ の配列に置換しており、 $\text{G}\alpha\text{i/o}$ と共役する GPCR により活性化される (45)。
- ③ $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}\text{q}\text{i}$: $\text{G}\alpha\text{i}3$ の GTPase ドメイン (残基番号 1-62, 176-354) と $\text{G}\alpha\text{q}$ のヘリカルドメイン (残基番号 69-180) からなるキメラ体 (29)。

なおいずれの $\text{G}\alpha$ も、百日咳毒素 (PTX) 非感受性変異 C351A を導入し、PTX と共発現させることで、細胞に内在の $\text{G}\alpha\text{i/o}$ の活性化を PTX により阻害しながら、発現させた $\text{G}\alpha$ タンパク質の活性化のみを観測することとした。

$\text{G}\alpha\text{i/o}$ 共役型受容体として δ オピオイド受容体 (DOR) を用いた場合の specificity factor を測定した (Figure 14B 左)。 $\text{G}\alpha\text{i}3$, $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}\text{q}\text{i}$ の specificity factor は、 $\text{G}\alpha\text{i}3$: 0.286 ± 0.009 , $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}\text{q}\text{i}$: 0.148 ± 0.008 であり ($n=10$)、 $\text{G}\alpha\text{i}3$ と比べて $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}\text{q}\text{i}$ では有意に小さかった ($p < 0.001$)。DOR と $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}5$ の組み合わせでは、 $\Delta\text{BRET}_{\text{GRK}}$ と $\Delta\text{BRET}_{\text{GIRK}}$ のいずれもほとんど観測されず (< 0.003)、 $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}5$ は DOR による活性化を受けないことが示唆された。別の $\text{G}\alpha\text{i/o}$ 共役型受容体であるドパミン D2 受容体 (D2R) を用いた場合、specificity factor は、 $\text{G}\alpha\text{i}3$: 0.303 ± 0.025 , $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}5$: 0.091 ± 0.022 , $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}\text{q}\text{i}$: 0.157 ± 0.015 であった ($n=7-9$) (Figure 14B 右)。 $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}5$, $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}\text{q}\text{i}$ の specificity factor は $\text{G}\alpha\text{i}3$ と比べて有意に小さかった ($p < 0.001$)。以上の結果から、各種 $\text{G}\alpha$ から解離する $\text{G}\beta\gamma$ が分子として同一であっても、 $\text{G}\alpha\text{i}3$ から解離した $\text{G}\beta\gamma$ は、 $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}\text{q}\text{i}$ や $\text{G}\alpha\text{q}\text{i}5$ から解離した $\text{G}\beta\gamma$ と比べて高い選択性で GIRK と結合することが示された。またこの現象

は DOR と D2R のいずれの経路にも共通していた。今回用いた $G\alpha$ タンパク質間の違いは、主にヘリカルドメインに存在することから、GIRK の開口における $G\alpha$ の選択性は主にヘリカルドメインによって決定されているという説が支持された。

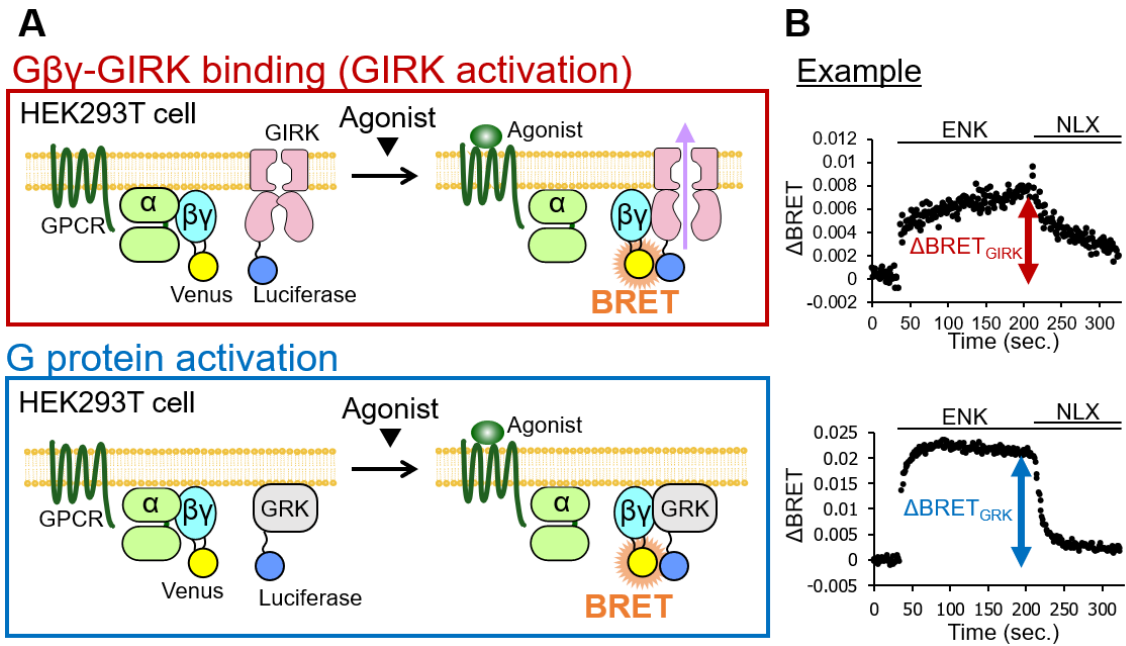


Figure 12 $G\beta\gamma$ -GIRK の結合における $G\alpha$ による選択性の測定。(A) 上段： $G\beta\gamma$ -GIRK の結合を測定する BRET 実験の模式図。GPCR のアゴニストを添加すると、Venus- $G\beta\gamma$ (BRET アクセプター) が $G\alpha$ から解離し、GIRK-Luc (BRET ドナー) と結合することで、BRET シグナルが増大する。下段： G タンパク質の活性化を反映する $G\beta\gamma$ -GRK の BRET 実験の模式図。(B) $G\alpha i3$ および DOR を共発現した細胞での、Venus- $G\beta\gamma$ と GIRK-Luc もしくは GRK-Luc の BRET の時間分解測定結果。終濃度 $10\ \mu\text{M}$ のアゴニスト、Met-エンケファリン (ENK), $83\ \mu\text{M}$ のアンタゴニスト、ナロキソン (NLX) の添加を上部のバーで示した。

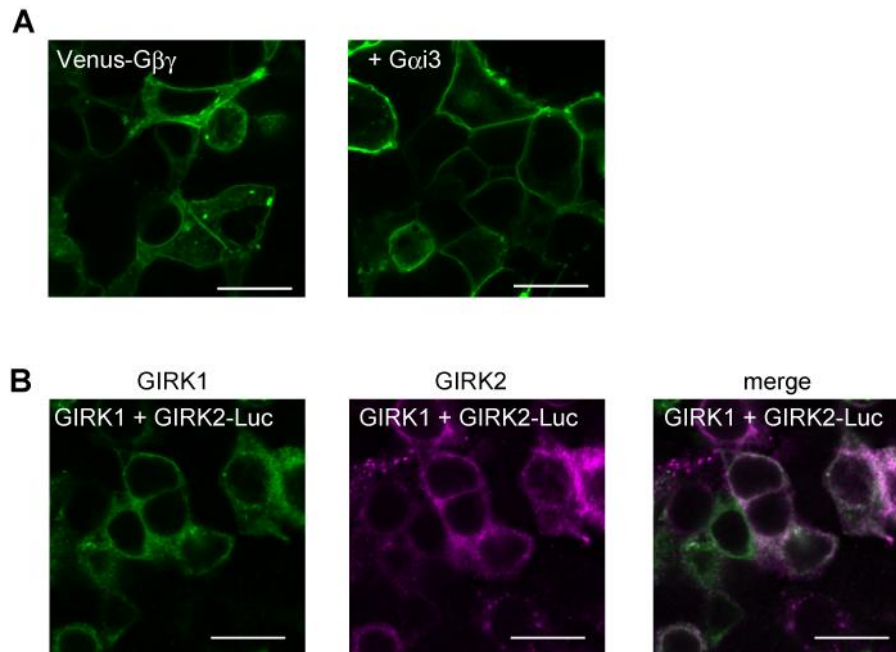


Figure 13 HEK293T 細胞に発現させた $G\alpha\beta\gamma$ と GIRK の局在。右下の棒は 20 μm を表す。
 (A) Venus-G $\beta\gamma$ のみを発現させた細胞 (左)、 $G\alpha i3$ と共発現させた細胞 (右) での Venus-G $\beta\gamma$ の局在を、共焦点蛍光顕微鏡で観察した像。(B) GIRK1 と GIRK2-Luc を発現させた細胞。GIRK1 と GIRK2-Luc の局在を、それぞれに特異的な一次抗体と、蛍光分子が付加した二次抗体を用いた蛍光免疫染色により観察した。

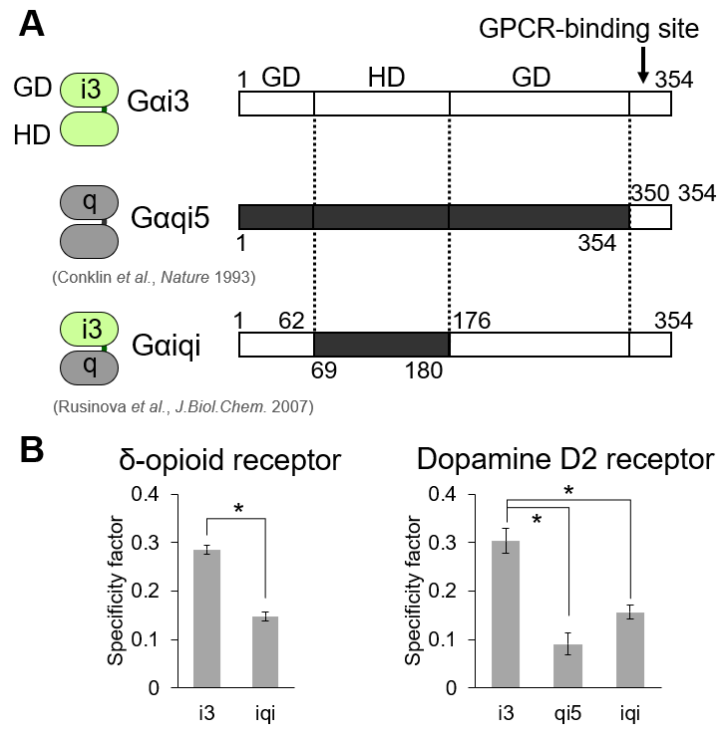


Figure 14 (A) 本実験で使用した $G\alpha$ の構成。GD : GTPase ドメイン、HD : ヘリカルドメイン (B) DOR または D2R と各種 $G\alpha$ の組み合わせで測定した specificity factor。グラフは平均値±標準誤差を表す (n=7-10)。 *印は、片側 t 検定にて $p<0.001$ を表す。

当研究室での過去の研究にて、活性型の $G_{\alpha i/o}(GTP)$ のヘリカルドメインが $GIRK$ と近接することが明らかとなっていた (10)。このことを踏まえて、 $G_{\alpha i/o}$ 選択性の機構として次のような仮説を立てた。不活性型において $G_{\alpha i/o}\beta\gamma$ と $GIRK$ が複合体を形成・共局在しており、 $G_{\alpha i/o}\beta\gamma$ から解離した $G\beta\gamma$ は予め共局在していた $GIRK$ に高効率で結合できる。他のファミリーの $G_{\alpha}\beta\gamma$ は $GIRK$ との複合体を形成しないため、解離した $G\beta\gamma$ と $GIRK$ の効率的な結合は起こらない。このような機構が存在するのであれば、 $G_{\alpha}\beta\gamma$ や $GIRK$ の発現量が多い時、非特異的に $G_{\alpha}\beta\gamma$ - $GIRK$ が近接する確率が高くなるため、 $G_{\alpha i/o}$ 選択性が弱まることが予想される。実際に、 $G_{\alpha}\beta\gamma$ を発現させる際の DNA 量を 4 倍、8 倍に増やした条件で BRET 実験を行ったところ、 $G_{\alpha i3}$ と $G_{\alpha iqi}$ との specificity factor の差は小さくなった (Figure 15)。したがって、 $G_{\alpha i/o}\beta\gamma$ と $GIRK$ が選択的に相互作用し共局在することが、選択性を決定しているという機構が支持された。

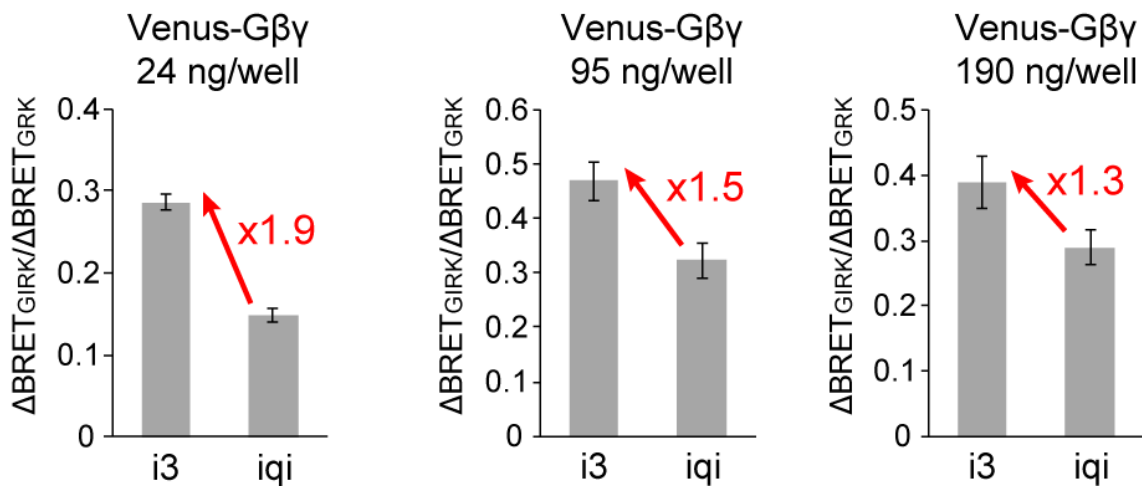


Figure 15 Specificity factor の $G_{\alpha}\beta\gamma$ 発現量依存性。異なる量の $G_{\alpha i3}\beta\gamma$, $G_{\alpha iqi}\beta\gamma$ の DNA を導入することにより、異なる量の $G_{\alpha i3}\beta\gamma$, $G_{\alpha iqi}\beta\gamma$ を発現させた細胞にて測定した。グラフは平均値±標準誤差を表す (n=4~10)。それぞれの Venus-G $\beta\gamma$ の DNA 量に対して、 G_{α} , GRK-Luc, $GIRK1$, $GIRK2$ -Luc の DNA 量を最適化して用いた (第 2 章の表 4 参照)。 $G_{\alpha iqi}$ 発現時に対する $G_{\alpha i3}$ 発現時の specificity factor の平均値の比を赤字で記した。

3-2. Gai3βγ中のGai3のメチル基シグナルの帰属

Gai3βγの帰属

GIRK と Gai3βγ の相互作用における構造情報を得る基盤を確立するため、Gai3βγ の NMR シグナルの帰属を行った。Gai3βγ は分子量が約 87K と大きくシグナルが広幅化するため、主鎖アミド基シグナルを対象とした解析は困難であることが予想される。そこで、高分子量タンパク質においても先鋭なシグナルを与える、側鎖メチル基を観測対象とするメチル TROSY 法を適用することとした (74)。メチル TROSY 法は、側鎖メチル基を選択的に ^1H , ^{13}C 標識し、その他の非交換性水素をすべて重水素化することで、標識した側鎖メチル基に由来する ^1H - ^{13}C 相関ピークを高感度かつ高分解能にて観測することが可能な NMR 法である。Gai3 の Ile, Leu, Val, Ala 残基は、大腸菌発現系にて側鎖メチル基の選択的 ^1H , ^{13}C 標識が可能であり、Gai3 分子 (354 残基) に合計 99 個 (28 %) と比較的高い割合で存在し、Gai3 の各二次構造エレメントに分布している。したがって、Gai3βγ 中の Gai3 の Ile, Leu, Val, Ala 側鎖メチル基を観測対象としてメチル TROSY 法による NMR 測定を行うことで、Gai3 の分子全体の情報が得られることが期待できる。そこでまず、これらの側鎖メチル基シグナルの帰属を行った。

Gai3βγ 中の Gai3 に関しては、GTPase ドメインに位置する Ile 14 個 (I49, I55, I56, I212, I221, I222, I253, I264, I278, I285, I303, I319, I343, I344) の帰属が当研究室で間瀬瑤子博士により確立されていた。またこれまでに、GDP 結合型 Gai3 単独状態 (Gai3(GDP)) の主鎖アミド基シグナル (59) および GTPase ドメインに位置する Ile 16 残基の側鎖メチルシグナルの帰属が、当研究室で確立されていた。そこで、Gai3βγ 中の Gai3 の Ile, Leu, Val, Ala 側鎖メチル基シグナルの帰属を以下のような方法で行った。

① Ile, Ala 側鎖メチル基を ^{13}C 標識した Gai3(GDP) のメチル基 ^1H と、すでに帰属が確立されている主鎖アミド基 ^1H との NOE パターンを、結晶構造と比較することにより、Ile, Ala 側鎖メチル基シグナルを帰属する。

- ② $G\alpha 3(\text{GDP})$ から $G\alpha 3\beta\gamma$ へ Ile, Ala 側鎖メチル基シグナルの帰属を移行する。
- ③ $G\alpha 3\beta\gamma$ 中の $G\alpha 3$ の Ile, Leu, Val, Ala 側鎖メチル基同士の NOE パターンを、結晶構造と比較することにより、帰属が移行できなかった Ile, Ala および Leu, Val 側鎖メチル基シグナルを帰属する。
- ④ NOE に基づく帰属ができなかったシグナルは、Ile, Leu, Val, Ala 残基に変異を導入して、 $G\alpha 3(\text{GDP})$ および $G\alpha 3\beta\gamma$ の $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ HMQC スペクトルを測定し、野生型と比較して消失したシグナルを同定することにより、帰属する。

その結果、帰属を確立したシグナルは理論上観測可能な 147 個中 141 個 (96 %)、Ala β (25/25), Ile $\delta 1$ (25/26), Leu δ (52/54), Val γ (39/42) となった (Figure 16)。帰属したメチル基は $G\alpha 1\beta\gamma$ の立体構造上において $G\alpha$ の分子全体に分布していることから (Figure 17)、 $G\alpha 3\beta\gamma$ 中の $G\alpha 3$ に生じる変化を網羅的に解析する基盤を確立できたと判断した。

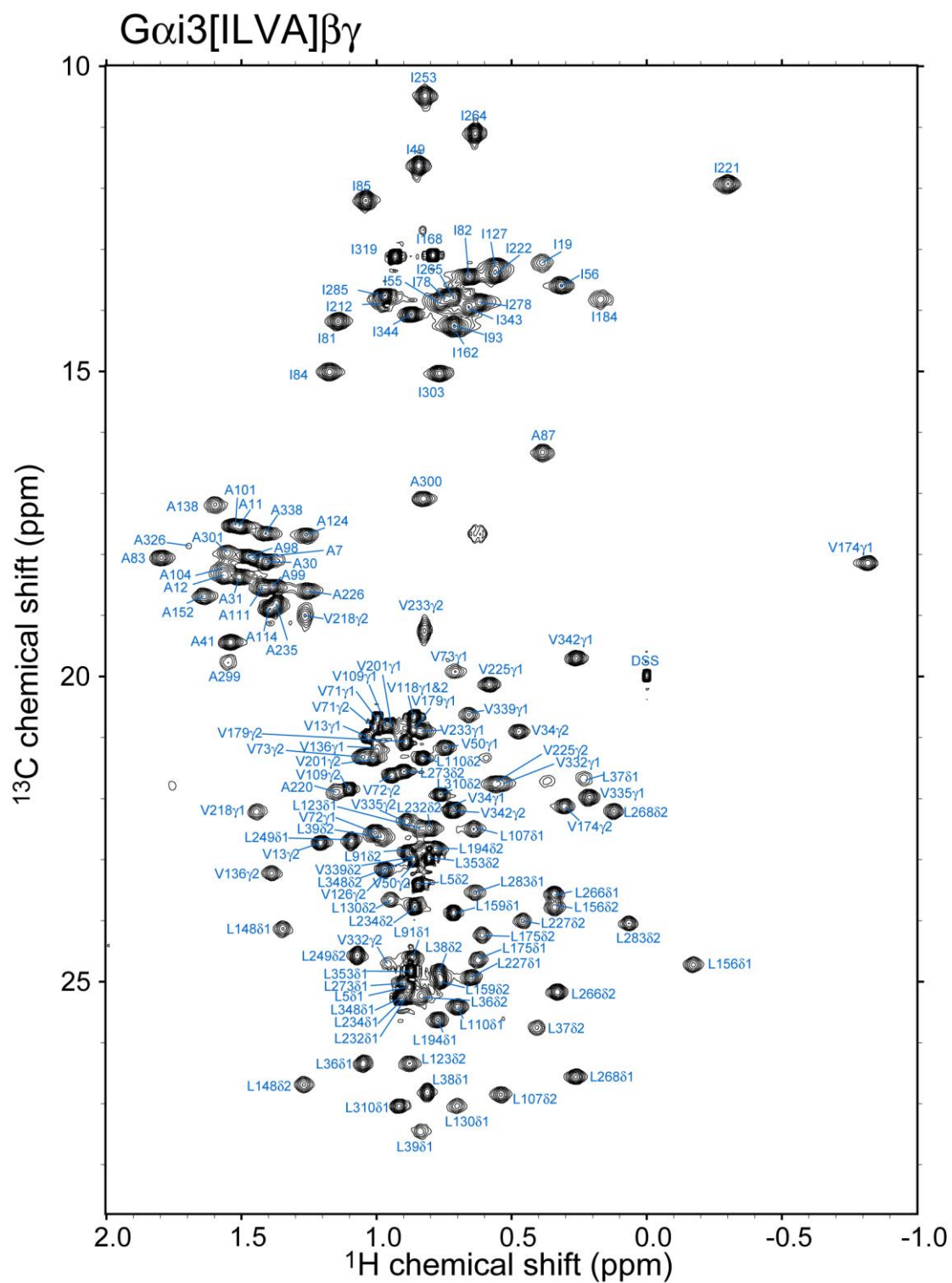
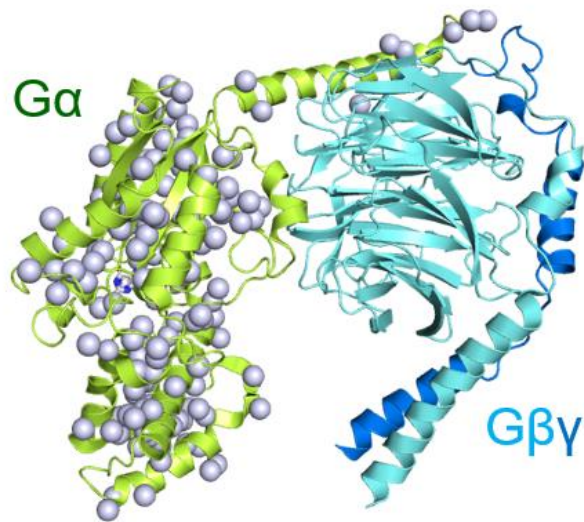


Figure 16 $\{\text{ul-}[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]; \text{Ala}\beta, \text{Ile}\delta 1, \text{Leu}\delta, \text{Val}\gamma\text{-}[^{13}\text{CH}_3]\}$ Gαi3-[non-labeled]βγ の $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HMQC スペクトルに各メチル基の帰属を記した。



Gray: assigned methyl groups

(PDB: 1GP2)

Figure 17 Gαi1βγ の結晶構造 (PDB ID: 1GP2) (13) をリボン表示し、帰属した Gα のメチル基を灰色の球でマッピングした。

Gaiqiβγ の帰属

Gai3βγ と比べて、GIRK との共役が減弱している Gαβγ を用いて相互作用の違いを調べるため、Gaiqiβγ を観測する NMR 実験も行うこととし、Gaiqiβγ 中の Gaiqi の Ile, Leu, Val, Ala のメチル基シグナルの帰属を確立することとした。

Gaiqi のうち、Gai3 に由来する N 末端領域および GTPase ドメインは、Gai3 と同一の構造を持ち、メチル基シグナルの化学シフトも一致すると予想した。実際に、Gaiqi[ILVA]βγ の [¹H-¹³C] HMQC スペクトルを測定したところ、3 分の 2 程度のシグナルは Gai3[ILVA]βγ と化学シフト値が概ね一致していたことから、帰属を移行した。これらは Gai3 由来の GTPase ドメインに存在するメチル基のシグナルであった。ただし、ヘリカルドメインと接触する部位に存在するメチル基の一部は、Gaiqi において化学シフト変化が生じており、帰属が移行できなかった。次に、残基間および残基内のメチル基同士の NOE パターンを結晶構造と比較することにより、帰属を進めた。NOE パターンを比較するための結晶構造としては、Gai1βγ (PDB ID: 1GP2) (13) と Gαqβγ (PDB ID: 3AH8) (61) を参照した。その結果、理論上観測可能な 141 個中 134 個 (95%)、Alaβ (20/23), Ileδ1 (22/22), Leuδ (52/54), Valγ (40/42) のシグナルを帰属した (Figure 18)。未帰属のメチル基は他との NOE が観測されない、もしくは内在性の exchange broadening によりシグナルの観測が困難なメチル基である。

3-3. GIRKとの相互作用に伴うGai3βγのNMRシグナルの変化

Gai/oβγ-GIRKの直接の相互作用が存在し、Gai/o選択性と対応しているか否かを検討するため、精製タンパク質を用いた再構成系にてGai/oβγとGIRKの直接の相互作用を解析することとした。

GIRKとしては、大腸菌発現系にて大量調製が可能であることから、GIRK1と原核生物のオルソログからなるキメラ体チャンネル(GIRKキメラ)を用いた。GIRKキメラは、細胞内領域全部および膜貫通領域の細胞内側1/4がマウスGIRK1、膜貫通領域の細胞外側3/4が*Burkholderia xenovorans*由来のKirBac1.3から構成されている(Figure 19A)(11)。GIRKキメラの立体構造は、哺乳類のGIRK2の立体構造(7)とよく類似している。特にGIRKキメラの細胞内領域は哺乳類のGIRK1の細胞内領域と同一である。生体内においてGai/oβγは膜の細胞内側にアンカーされているため、GIRKとの相互作用が存在するとしたらGIRKの細胞内領域との間で生じる。したがって、GIRKキメラを用いてGIRK1とGai/oβγとの相互作用を再現できると予想される。細胞膜上で起こる生理的なGai/oβγ-GIRK相互作用を模倣するため、脂質二重膜を再現した可溶性粒子であるナノディスク(55)にGIRKキメラを再構成した。SDS-PAGEにて夾雑物のバンドが見えない精製度にて、GIRKキメラ再構成ナノディスク(GIRKキメラ-ナノディスク)が得られた(Figure 19B)。これを溶液中での過渡的な相互作用を観測可能な溶液NMR法による相互作用解析に供した。Gタンパク質としては、脂質修飾を持たないGai3βγを発現・精製して用いた。Gαは、脂質修飾以外にもN末端の塩基性パッチが酸性脂質と相互作用することにより膜に局在するとの報告があることから(14, 15)、今回調製したGai3βγも一部がナノディスクの脂質二重膜に局在すると判断した。

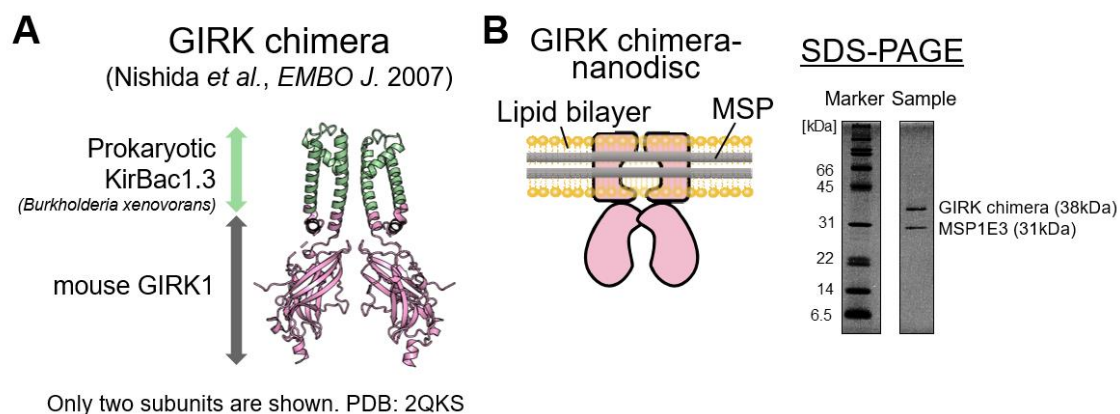


Figure 19 GIRK キメラ-ナノディスクの調製。(A) GIRK キメラの構成。GIRK キメラの結晶構造を、四量体のうち 2 個のサブユニットのみ示し、原核生物 *Burkholderia xenovorans* KirBac1.3 由来の部分を薄緑、マウス GIRK1 由来の部分をピンクで色付けした。(B) GIRK キメラ-ナノディスクの模式図と、精製後の SDS-PAGE 解析。

Gai3 β y が GIRK と相互作用するか否か、また相互作用するとしたらどの部位に変化が生じるかを明らかにするため、GIRK キメラ-ナノディスクの存在下および非存在下で Gai3 β y の NMR スペクトルを測定した。ファミリー間で違いがある G α サブユニットに着目し、前節のように Gai3 β y 中の Gai3 の Ala β , Ile δ 1, Leu δ , Val γ 側鎖メチル基を観測することとした。Ala β , Ile δ 1, Leu δ , Val γ 側鎖メチル基を選択標識した Gai3 と、非標識 G β y の複合体を Gai3[ILVA] β y と呼ぶ。11 μ M の Gai3[ILVA] β y に 2 当量 (22 μ M) の GIRK キメラ-ナノディスクを添加したところ、シグナルの化学シフト変化はいずれも 0.01 ppm 未満と小さかったものの、多くのシグナルが 0.1 程度の強度減少を生じた (Figure 20A-C)。一部のシグナルは 0.2 以上のさらに顕著な強度減少を示した (L5 δ 1, L5 δ 2, A12 β , V13 γ 1, V13 γ 2, A30 β , A31 β (以上 N 末端ヘリックス), L36 δ 1, L36 δ 2, L37 δ 1, L37 δ 2 (以上 β 1 ストランド), A41 β (β 1- α 1 ループ), A104 β (α B ヘリックス), I127 δ 1 (α C ヘリックス), L148 δ 1 (α D- α E ループ), L159 δ 2 (α E ヘリックス), V218 γ 2 (α 2- β 4 ループ), I221 δ 1 (β 4 ストランド), L232 δ 2, L234 δ 2 (以上 β 4- α 3 ループ), L249 δ 1, L249 δ 2, I253 δ 1 (以上 α 3 ヘリックス), I264 δ 1, I265 δ 1 (以上 β 5 ストランド), I278 δ 1, L283 δ 1 (以上 α G- α 4 ループ), I343 δ 1, L348 δ 1 (以上 C 末端領域))。

全体的な強度減少は、 $\text{G}\alpha\text{i}3[\text{ILVA}]\beta\gamma$ の見かけの分子量が増大して回転相関時間が長くなることによって生じるものであり、 $\text{G}\alpha\text{i}3[\text{ILVA}]\beta\gamma$ の一部が GIRK キメラ-ナノディスクと複合体を形成したことを示している。0.2 以上の顕著な強度減少は、そのシグナルが化学シフトの異なる状態間を slow~intermediate のタイムスケールで交換することにより生じる広幅化を反映している (75)。顕著な強度減少を示したシグナルは、 $\text{G}\alpha\text{i}3[\text{ILVA}]\beta\gamma$ 単独状態と GIRK キメラ-ナノディスク結合状態とで化学シフトが異なっていることが示唆される。本系では複合体の総分子量が 300K と、NMR にて観測するには巨大であること、また相互作用が比較的弱く結合・解離を繰り返していることから、複合体の形成に伴う変化は主に $\text{G}\alpha\text{i}3[\text{ILVA}]\beta\gamma$ 単独状態の化学シフトを持つシグナルの、広幅化・強度減少の程度に反映される。なお、このようなスペクトルの変化は過去に GIRK 細胞内領域と $\text{G}\alpha\text{i}3(\text{GTP})$ との相互作用解析でも観測されていた (10)。全体的な 0.1 程度の強度減少率が、 $\text{G}\alpha\text{i}3[\text{ILVA}]\beta\gamma$ の平均分子量の増大を反映しており、その平均分子量は $\text{G}\alpha\text{i}3[\text{ILVA}]\beta\gamma$ の GIRK 結合分率に依存していると仮定すると、両者の相互作用の K_d は 200 μM 以上と見積もられた。

顕著な強度減少を示した残基は、 $\text{G}\alpha\text{i}3$ の立体構造上で N 末端と C 末端領域、GTPase ドメイン上の $\text{G}\beta\gamma$ 結合面、およびヘリカルドメインに分布していた (Figure 20D)。したがって、これらの領域は GIRK キメラ-ナノディスクとの直接の相互作用または相互作用に伴う構造変化によって化学環境の変化を生じることが示された。生体内では $\text{G}\alpha\text{i}3$ の N 末端は膜にアンカーされていることから、 $\text{G}\alpha\text{i}3$ の N 末端および隣接する C 末端領域に観測されたシグナル強度減少は、 $\text{G}\alpha\text{i}3\beta\gamma$ とナノディスクの膜脂質との相互作用を反映している可能性がある。 $\text{G}\alpha\text{i}3$ の N 末端ヘリックスは $\text{G}\beta\gamma$ とも接触する部位であることから、 $\text{G}\beta\gamma$ 結合面に観測された強度減少は、N 末端ヘリックスを介した膜との相互作用に伴って、GTPase 上の $\text{G}\beta\gamma$ 結合面にも構造変化が生じたことを反映している可能性がある。 $\text{G}\alpha\text{i}3$ のヘリカルドメインは膜結合部位とは離れていることから、このドメインに観測された変化は膜脂質ではなく GIRK キメラとの相互作用に起因していることが示唆される。以上のようなスペクトル変化

から、 $G\alpha i3\beta\gamma$ が GIRK キメラ-ナノディスクと直接の相互作用を生じることが強く支持された。

同様の実験を、 $G\alpha iqi\beta\gamma$ を用いて行った。 $G\alpha iqi[ILVA]\beta\gamma$ に GIRK キメラ-ナノディスクを添加したところ、 $G\alpha i3[ILVA]\beta\gamma$ の場合と異なり全体的なシグナル強度減少は観測されず、0.2 以上の顕著な強度減少を示すシグナルは無かった (Figure 20B, C)。この結果から、 $G\alpha iqi\beta\gamma$ は $G\alpha i3\beta\gamma$ と比べて GIRK キメラ-ナノディスクに対する親和性が低いことが示された。BRET 実験にて、 $G\alpha iqi$ は $G\alpha i3$ と比べて GIRK 開口能が低下していたという結果と統合して、 $G\alpha i3\beta\gamma$ は GIRK との直接の相互作用を選択的に生じ、その相互作用が $G\alpha i/o$ 選択的な GIRK 開口を担っていると結論した。

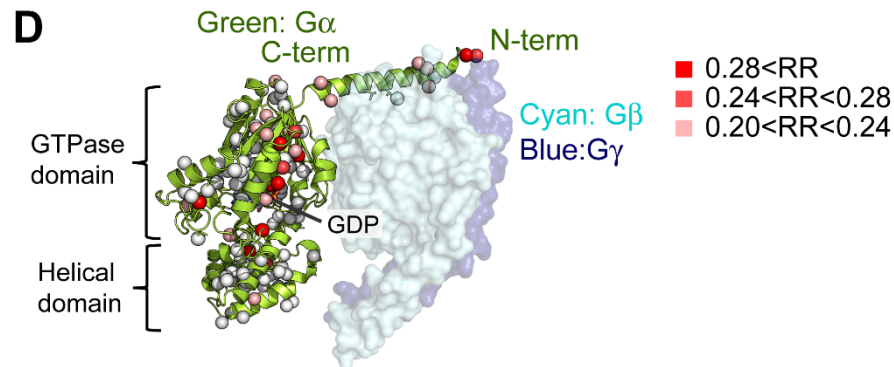
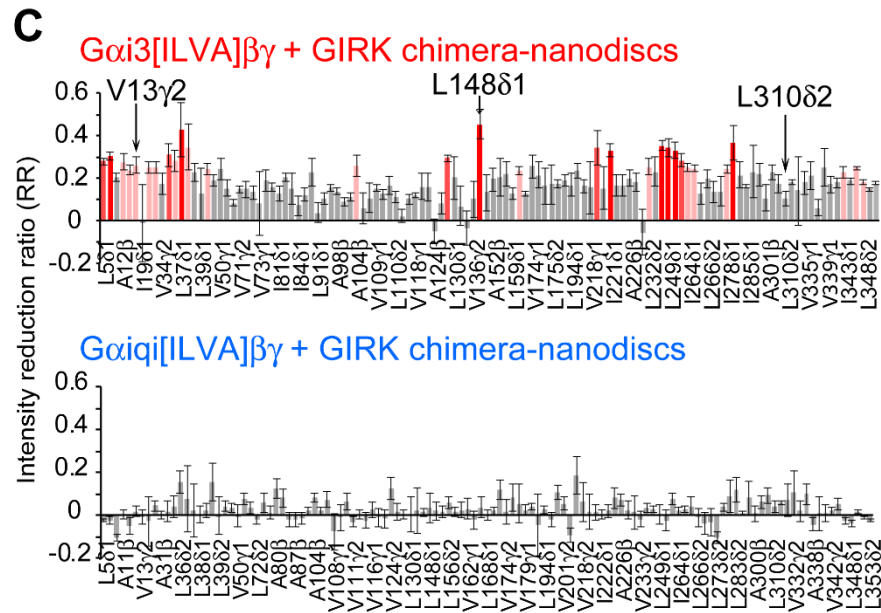
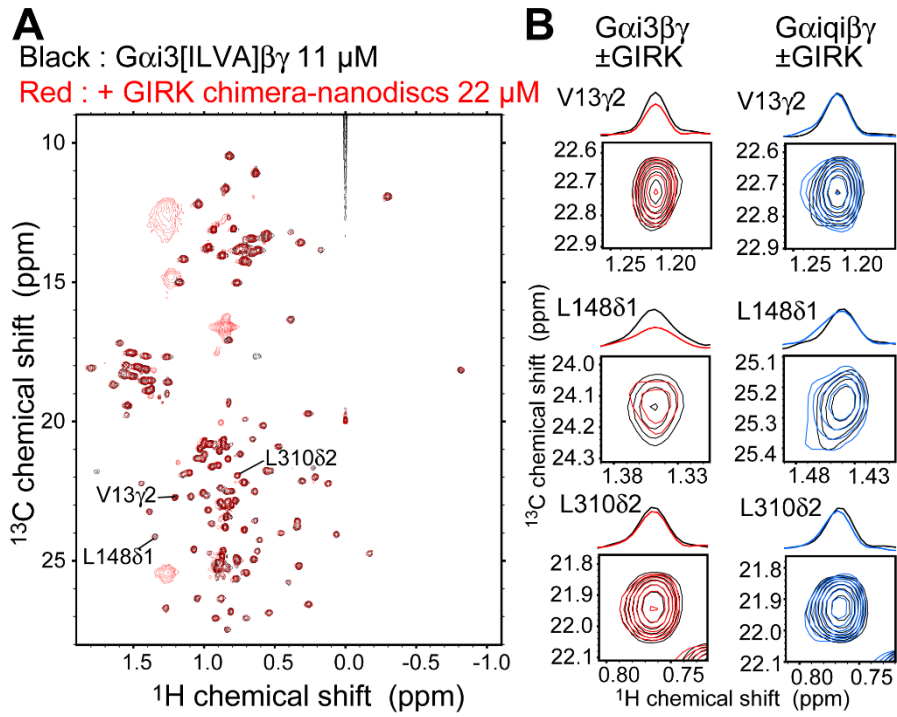


Figure 20 GIRKキメラ-ナノディスク添加に伴う $\text{Gai3}[\text{ILVA}]\beta\gamma$ の NMR スペクトルの変化。

(A) 2 当量の GIRK キメラ-ナノディスクの非存在下 (黒) および存在下 (赤) での $\text{Gai3}[\text{ILVA}]\beta\gamma$ の $[\text{H-}^{13}\text{C}]$ HMQC スペクトルを重ねて示した。(B) 例として V13 γ 2, L148 δ 1, L310 δ 2 のシグナルの拡大図と切り出しを示した。比較のため、 $\text{Gaiqi}[\text{ILVA}]\beta\gamma$ の GIRK キメラ-ナノディスクの非存在下 (黒) および存在下 (青) でのシグナルを右側に示した。(C) 2 当量の GIRK キメラ-ナノディスクの添加に伴う $\text{Gai3}[\text{ILVA}]\beta\gamma$ (上段) および $\text{Gaiqi}[\text{ILVA}]\beta\gamma$ (下段) のシグナル強度減少率 (RR) を、各シグナルについてプロットした。エラーバーはスペクトルの SN 比に基づき付した。RR > 0.20 のメチル基は値の大きさに応じて薄赤~赤色に色付けした。(D) 顕著に大きい RR を示した $\text{Gai3}\beta\gamma$ メチル基を、 $\text{Gai1}\beta\gamma$ の結晶構造 (PDB ID: 1GP2) (13) 上に球でマッピングし、RR の値に応じて薄赤~赤色に色付けした。

3-4. 常磁性緩和促進 (PRE) による Gai3 $\beta\gamma$ -GIRK間の近接部位の同定

Gai/o $\beta\gamma$ -GIRK 複合体の構造情報を得るため、PRE 実験を行った。PRE は、核スピント、常磁性中心の対電子との間の双極子相互作用によって生じ、核スピンの NMR シグナルの広幅化をもたらす。PRE 効果は核スピント常磁性中心との距離に依存する。本系のように複合体の分子量が大きく結合・解離を素早く繰り返している系において、複合体の NMR シグナルは低い存在割合と高分子量による広幅化のため直接観測することが困難である。しかし一過的に形成される複合体中で生じた PRE が、遊離状態のシグナルに転移して広幅化・強度減少として観測される (76, 77)。したがって Gai/o $\beta\gamma$ -GIRK キメラ複合体内の構造情報を、Gai/o $\beta\gamma$ 単独状態のシグナルに生じる PRE から得ることができる (Figure 21A)。

システイン側鎖に共有結合により付加される常磁性試薬 4-maleimido-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (4-maleimido-TEMPO) (Figure 21B) を用いて、GIRK キメラに部位特異的な常磁性修飾を施し、Gai3[ILVA] $\beta\gamma$ にて観測される PRE を解析した。GIRK キメラの部位特異的な修飾のため、分子表面の反応性システイン残基を置換した GIRK キメラの C53S/C310T 変異体を作製し、これをテンプレートとして Q344, V351, もしくは L366 をシステインに置換したコンストラクトを作製した。この 3 残基は GIRK キメラの細胞内領域全体に分布しており (Figure 22A)、これらの残基をプローブとして GIRK キメラに対する Gai3 $\beta\gamma$ の相対配置を検出することができる。Q344 と V351 はそれぞれ、GIRK キメラの β スtrand領域の β M- β N ループと、 β N-C 末端ヘリックス間のループに位置する。L366 は C 末端ヘリックスに位置する。常磁性修飾を施した GIRK キメラ-ナノディスクと Gai3[ILVA] $\beta\gamma$ を混合し、常磁性中心をアスコルビン酸により還元する前 (常磁性状態) と後 (反磁性状態) での、Gai3[ILVA] $\beta\gamma$ の各シグナルの強度から、シグナルの横緩和速度への PRE の寄与 Γ_2 を見積もった。

GIRK キメラの L366 を修飾残基とした場合は、 5 s^{-1} 以上の顕著な Γ_2 が Gai3 の I85 δ 1, L130 δ 1, L130 δ 2, V136 γ 2 に観測された (Figure 22B)。これらのメチル基は立体構造上で、Gai3

のヘリカルドメインの αA , αB ヘリックスの間に局在していた (Figure 22C)。したがって、 $G\alpha i3\beta\gamma$ -GIRK 複合体において、GIRK の L366 が位置する C 末端ヘリックスと、 $G\alpha i3$ のヘリカルドメインとが近接することが示された。一方で、GIRK キメラの Q344, V351 を修飾残基とした場合には、 5 s^{-1} 以上の顕著な Γ_2 を示したシグナルは V126 γ 2 と A299 β のみであり、これらは立体構造上で一か所に局在してはいなかった (Figure 22B, C)。これらの PRE パターンから、Q344 と V351 が位置する GIRK の β ストランド領域に対して $G\alpha i3\beta\gamma$ が複数の配向で近接しうることを示唆された。このことは、GIRK の β ストランド領域は $G\alpha i3\beta\gamma$ との主な相互作用部位ではないことを表しており、観測された PRE には複合体構造の多型に起因する一過的な近接が反映されていると判断した。

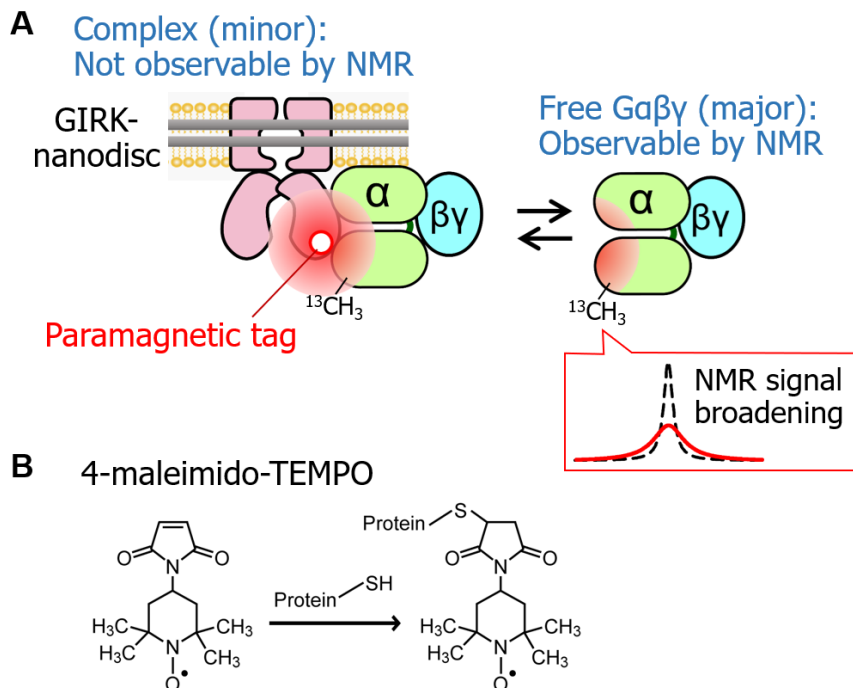
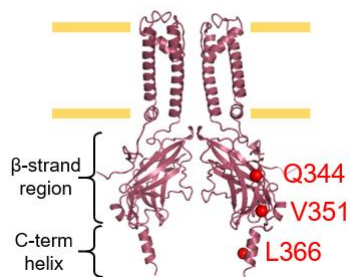
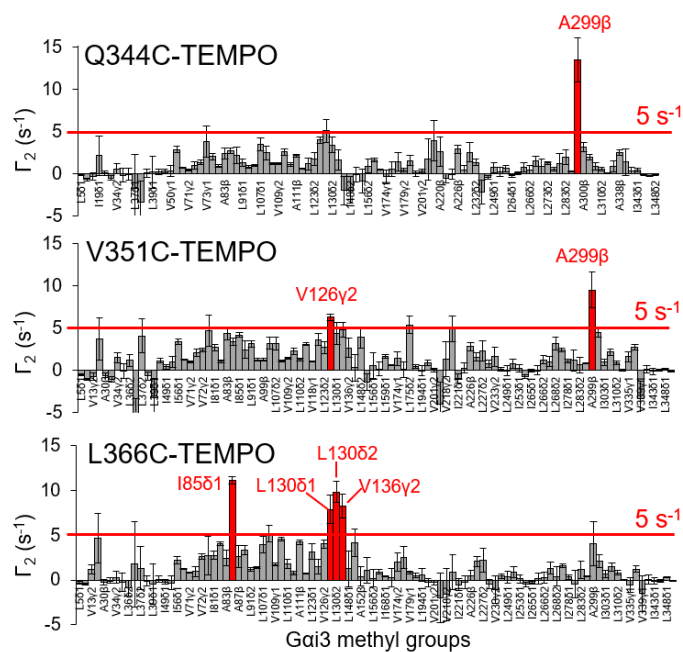


Figure 21 (A) PRE 実験の模式図。(B) 常磁性試薬 4-maleimido-TEMPO がタンパク質のシステイン側鎖へ付加する反応。

A GIRK chimera (PDB: 2QKS)



B



C Gαβγ (PDB: 1GP2)

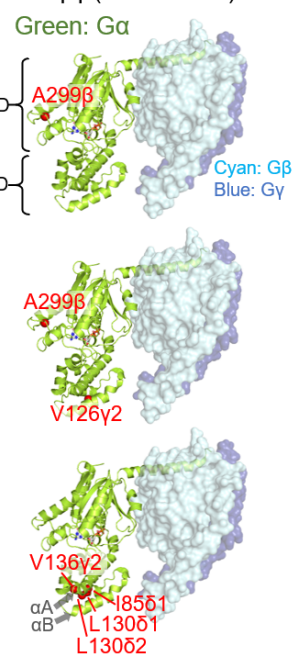


Figure 22 GIRK キメラと Gαi3βγ の間で観測された PRE。(A) 常磁性タグの修飾残基とした Q344, V351, L366 の位置を GIRK キメラの構造 (PDB ID: 2QKS (11) より改変) に表示した。(B) PRE 実験にて得られた Γ_2 を棒グラフでプロットした。顕著な PRE ($\Gamma_2 > 5 \text{ s}^{-1}$) が観測されたシグナルを赤で色付けした。(C) 顕著な PRE ($\Gamma_2 > 5 \text{ s}^{-1}$) が観測されたメチル基を Gai1βγ の結晶構造 (PDB ID: 1GP2) (13) に赤い球でマッピングした。

3-5. Gai3βγ-GIRK複合体モデル構造の構築

次に、PRE 実験のデータを距離拘束条件に用いた構造計算により、Gai3βγ-GIRK 複合体の構造を可視化することを試みた。モデル構造の構築の際には、PRE の実測値とモデルからの逆計算値とのずれ具合を表す Q-factor (71) を指標として、Q-factor が最も小さくなるように、GIRK キメラと Gaiβγ の結晶構造を初期構造としたドッキングシミュレーションを行った。まず、Q344, V351, L366 からの PRE を同時に満たす Gai3βγ-GIRK 複合体構造を探索したが、Q-factor は最も良い構造でも 0.71 と比較的大きかった。このことから、前述の通り単一の構造では PRE 実験の結果を説明できないことが支持され、複合体構造を描写するには GIRK と Gai3βγ が複数の配向で近接しうることを考慮しなければならないことがわかった。

そこで、複数の構造からなるアンサンブルとして実験データを満たすモデルを構築することを試みた。計算は二段階に分けて行った。第一段階目では、GIRK キメラの L366 を修飾残基とした際に観測されていた顕著な PRE に基づき、GIRK の C 末端ヘリックスを Gai3 にドッキングした。第二段階目では、GIRK の β ストランド領域と C 末端ヘリックスとの間の残基番号 352-357 に内在する構造的自由度を考慮して、その領域を自由に動かすことで複合体がとりうる複数の構造を生成した。それらの構造をアンサンブルとして、各構造の存在割合を最適化することで、Q344 および V351 を修飾した際の比較的小さい PRE を説明するモデルを目指した。この二段階での計算方法は、GIRK の C 末端ヘリックスと Gα のヘリカルドメインが結合する一方で、GIRK の β ストランド領域は Gai3βγ との主要な相互作用を形成せず、相対配置が単一に定まっていないという、PRE 実験結果の解釈に基づいている。計算の結果、最終的に 30,000 構造を生成して重み付きアンサンブルを構築した。アンサンブルから逆計算した Γ_2^{calc} は、Q344, V351, L366 を修飾残基とした際の PRE の実測値 Γ_2^{obs} とよく一致し (Figure 23A)、Q-factor は 0.42 であった。したがって、このアンサンブルは PRE 実験条件での GIRK キメラと Gai3βγ との相互作用様式を表していると判断した。

GIRK キメラに対する Gai3 β γ の空間分布を可視化するため、重み付きアンサンブルから Gai3 β γ の原子存在密度マップを作成した (72)。作成した密度マップに基づき、GIRK キメラ-ナノディスクに対する Gai3 β γ の分布と配向を可視化するために、Gai3 β γ 存在密度を灰色の雲で表示し、アンサンブルに含まれる Gai3 β γ の配向の例をリボン表示で重ねて示した (Figure 23B)。Gai3 β γ は、GIRK の C 末端ヘリックスと、G α のヘリカルドメインとの間の相互作用を保ちながら、ナノディスクの膜 (黄色で表面表示) の近傍から、GIRK の β ストランド領域の下側まで分布していた。この分布は、Gai3 β γ が完全にランダムに動く場合の分布と比較すると膜の近傍など特定の領域に限局しており、実験データによって Gai3 β γ の分布が絞り込まれていることがわかった (Figure 24)。このことから、得られた分布は GIRK キメラ-ナノディスクの膜脂質や GIRK キメラと Gai3 β γ との相互作用、ならびに GIRK キメラ-ナノディスクに対する Gai3 β γ の相対配置を反映したものであると判断した。

A Gray: Observed
Orange: Calculated from the ensemble model

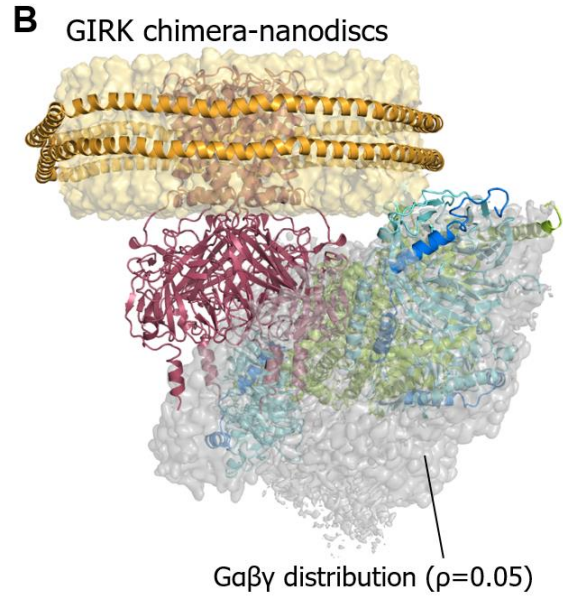
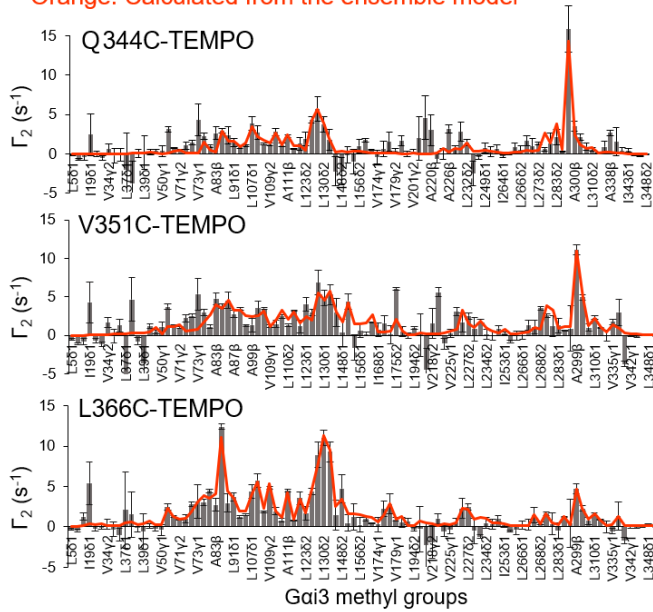


Figure 23 複合体構造のアンサンブルモデル。(A) PRE 実験にて得られた Γ_2^{obs} を灰色の棒で、構築したアンサンブル構造から逆計算した Γ_2^{calc} を橙色の線で重ねてプロットした。(B) 得られたアンサンブル中での、GIRK キメラ-ナノディスクに対する Gai3βγ の分布を、原子存在密度マップとして表面表示した ($\rho = 0.05$)。含まれる構造の例をリボン表示で重ねて示した。

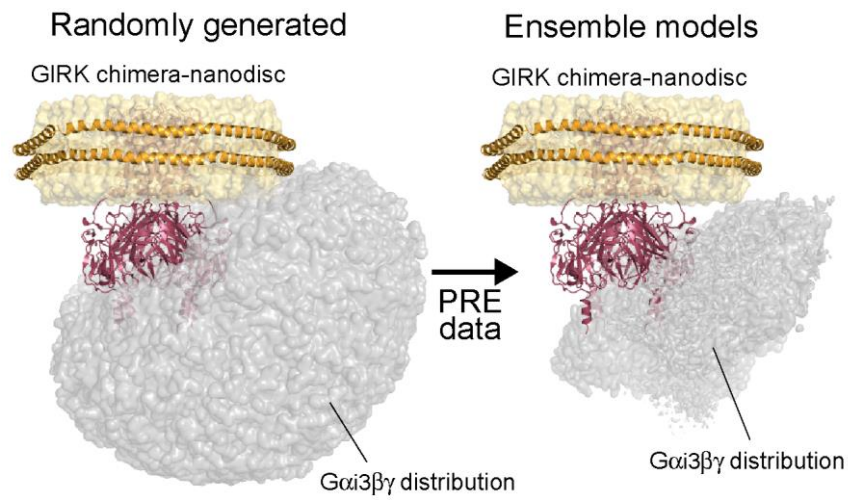
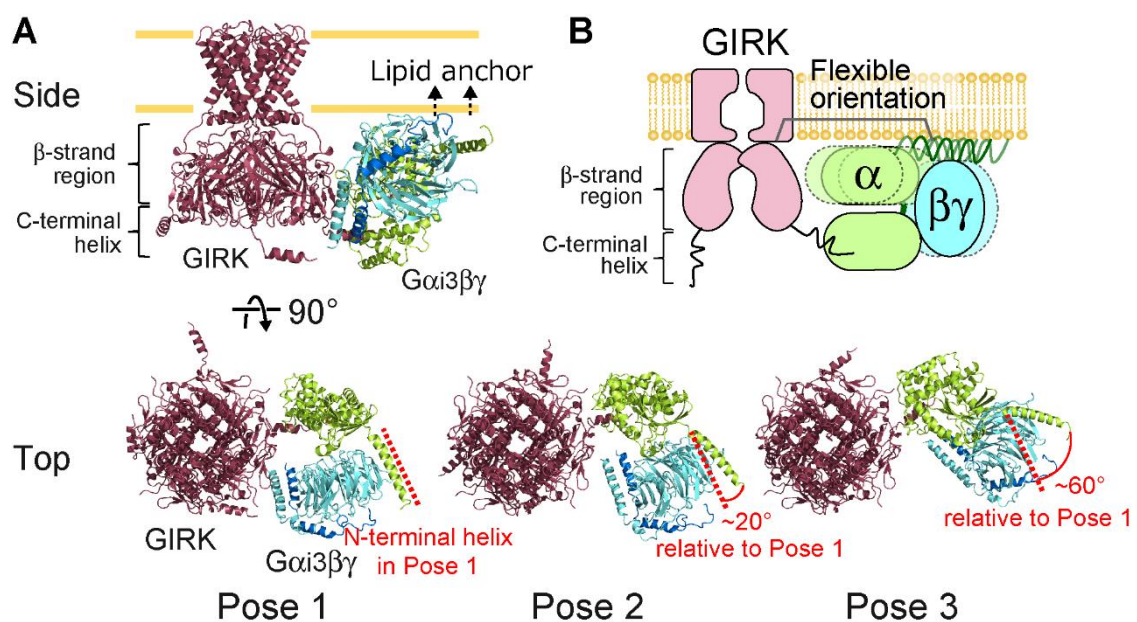


Figure 24 (左) GIRK キメラの自由度の高い領域が自由に動くと仮定した場合の複合体構造群における $G\alpha i3\beta\gamma$ の分布。ランダムに生成した 30,000 構造中の 1,000 構造における $G\alpha i3\beta\gamma$ の分布を、灰色の表面表示で示した。(右) PRE データに基づき計算したアンサンブル 10 個の平均における、 $G\alpha i3\beta\gamma$ の分布。 $G\alpha i3\beta\gamma$ の原子存在密度 ρ が 0.05 以上の領域を灰色の表面で表示した。

NMRの実験条件では、ナノディスクの膜の面積が小さく、また脂質非修飾の $G\alpha i3\beta\gamma$ を用いていたため、 $G\alpha i3\beta\gamma$ が膜から離れた構造もアンサンブル中に含まれていたが、アンサンブル中には $G\alpha i3$ の N 末端と $G\gamma$ の C 末端が膜の方を向いている構造が複数存在した (Figure 25A)。これらの構造は、生体内で脂質修飾を有する $G\alpha\beta\gamma$ が膜にアンカーされた状態と整合することから、生理的な相互作用を反映していると判断した。アンサンブル中には、そのような生理的相互作用を反映した複数の異なる配向が観測されたことから、GIRK の β スtrand 領域に対する $G\alpha i3\beta\gamma$ の相対配置が単一ではないアンサンブル状態が、 $G\alpha i/o\beta\gamma$ -GIRK の相互作用様式をよく描写していることがわかった (Figure 25B)。

$G\alpha i3\beta\gamma$ が膜に面している複数の複合体構造の中で代表的な構造を拡大して示す (Figure 26)。複合体構造において、GIRK の C 末端ヘリックスと $G\alpha$ ヘリカルドメインの αA ヘリックスが結合面を形成していることがわかった。 $G\alpha$ のヘリカルドメイン、特に αA から αC ヘリックスにかけての領域はファミリー間でアミノ酸配列の保存性が低い (Figure 27)、その中でも αA ヘリックスが、 $G\alpha i/o\beta\gamma$ -GIRK の相互作用の形成、そして GIRK 開口の $G\alpha i/o$ 選択性に重要な構造エレメントであることが、今回のモデル構造から示唆された。



3-6. 変異体実験による複合体モデル構造の検証

前節で構築した複合体モデル構造を検証するため、構造に基づき変異体実験を行った。*Gai3* をもとに、 αA ヘリックス (残基番号 71-90) を $G\alpha q$ のものに置換したキメラ体 *Gai3-q(αA)* を作製し、BRET 実験にて specificity factor を調べた。コントロールとして、主な GIRK 結合部位ではなかった αB ヘリックス (残基番号 100-110), αE ヘリックス (残基番号 151-163) をそれぞれ置換した *Gai3-q(αB)*, *Gai3-q(αE)* も作製した。その結果 (Figure 28)、*Gai3-q(αA)* の specificity factor は 0.159 ± 0.008 ($n=4$) であり、野生型 *Gai3* (0.286 ± 0.009) よりも有意に小さかった ($p < 0.001$)。*Gai3-q(αB)*, *Gai3-q(αE)* の specificity factor はそれぞれ 0.248 ± 0.023 ($n=3$, $p=0.041$ vs. *Gai3*), 0.249 ± 0.011 ($n=5$, $p=0.022$ vs. *Gai3*) であり、*Gai3* との差は有意ではなかった。以上の結果から、 $G\alpha$ の αA ヘリックスが、GIRK 開口における *Gai/o* 選択性を決定する構造的要因であると結論した。

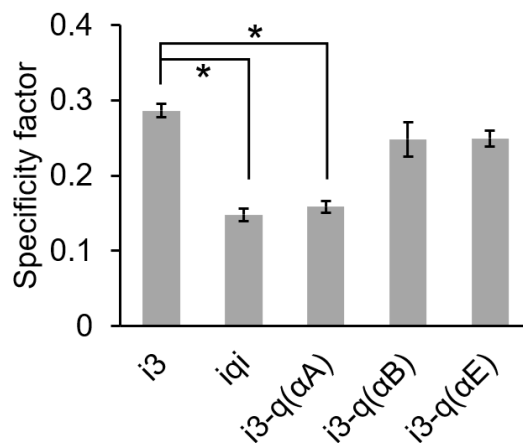


Figure 28 BRET 実験で測定した、 αA , αB , または αE のキメラ体 $G\alpha$ の specificity factor グラフは平均値 \pm 標準誤差を表す ($n=3-10$)。*印は、片側 t 検定にて $p < 0.001$ を表す。

第4章 考察

4-1. GIRK 活性制御の Gai/o 選択性を決定する構造的要因

細胞を用いた BRET 実験にて、GIRK の活性化は GPCR の種類にかかわらず、i/o ファミリー由来のヘリカルドメインを有する G α によって誘起されることがわかった。このことから、G α のヘリカルドメインが GIRK 活性化におけるファミリー選択性を決定していることが示された。一方、精製した Gai3 $\beta\gamma$ と GIRK キメラを用いた再構成系での NMR 実験において、G α のヘリカルドメインが GIRK の C 末端ヘリックスと直接結合することにより、Gai3 $\beta\gamma$ -GIRK 複合体の形成に寄与していることが明らかとなった。BRET と NMR の実験を統合すると、Gai/o $\beta\gamma$ と GIRK が複合体を形成することが、Gai/o 選択的な GIRK 活性化を決定しており、G α のヘリカルドメインと GIRK の C 末端ヘリックスとの相互作用が複合体形成を担っていることが示された。今回の結果は、GIRK-GPCR や GIRK-G $\beta\gamma$ よりもむしろ GIRK-G α 間の相互作用が複合体形成に重要であることを強く支持する結果である。

G α のヘリカルドメインは全体的にファミリー間でのアミノ酸配列の保存性が低い (Figure 27)、アミノ酸配列の比較からは、共役を決定する残基を同定できなかった。本研究にて構築した Gai3 $\beta\gamma$ -GIRK 複合体のモデル構造から、Gai3 の αA ヘリックスが GIRK の C 末端ヘリックスと直接結合することが示され、さらに αA ヘリックスが GIRK との共役に確かに重要であることが、 αA ヘリックスのキメラ体 Gai3-q(αA) を用いた変異体実験により示された。相互作用面の性質を調べてみると、Gai3 の αA ヘリックスは正に帯電、GIRK の C 末端ヘリックスは負に帯電しており、相補的な電荷を持っていることがわかった (Figure 29)。 αA ヘリックス周辺の電荷分布は G α のファミリー間で顕著に異なっているため、このような性質の相補性がファミリー選択的な Gai/o $\beta\gamma$ -GIRK 複合体の形成を促進している可能性がある。

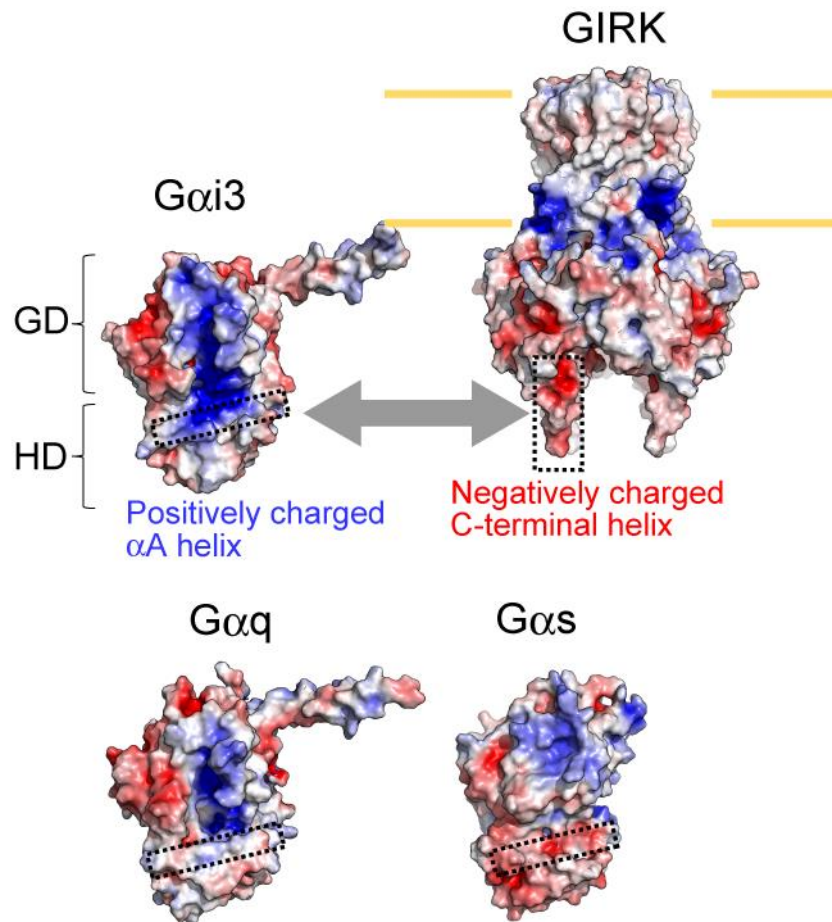


Figure 29 $G\alpha$ と GIRK の表面電荷。Gai3, Gaq, Gas, GIRK の構造はそれぞれ Gai1 $\beta\gamma$ (PDB ID: 1GP2) (13), Gaq $\beta\gamma$ (PDB ID: 3AH8) (61), Gas(GTP γ S) (PDB ID: 1AZT) (78), GIRK キメラ (PDB ID: 2QKS) (11) より。表面電荷は Adapted Poisson-Boltzmann Solver (73) を用いて計算した。

$G\alpha_i/o$ 選択的な GIRK の活性化の機構を説明する他の仮説として、 $G\alpha_q$ が活性化した場合はホスホリパーゼ C (phospholipase C, PLC) の活性化を介して GIRK の開口因子の一つである膜上のホスファチジルイノシトールニリン酸 (phosphatidylinositol bisphosphate, PIP₂) を分解することにより、GIRK 電流を抑制することが提唱されている (79, 80)。PIP₂ の枯渇が GIRK 電流の遅い (10 秒オーダーの) 減衰をもたらすという報告はあるものの、GPCR 刺激に伴う GIRK の活性化は数百ミリ秒~1 秒のタイムスケールで生じ (31)、PLC による加水

分解反応が 10 秒のタイムスケールで起こるのと比べて速い。そのため、GIRK の迅速な活性化が Gq 共役型受容体から生じないことは、PIP₂ の枯渇のみで説明することはできない。これに対して、本研究で示した Gai/oβγ-GIRK 複合体の形成によってシグナル伝達経路が決定するという機構によれば、GIRK と Gαqβγ が共局在しないことによって、GIRK の迅速な活性化が起こらないことを矛盾なく説明できる。このことは、Gαq から解離した Gβγ は GIRK との結合自体が減弱しているという 3-1.節の BRET 実験の結果からも支持される。また Gq の他に Gs 共役型受容体の刺激によっても GIRK が開口せず、Gi/o 共役型受容体を介してのみ GIRK 電流が誘起されるという現象も同様に説明することが可能である (28)。

4-2. Gai/oβγ と GIRK の親和性

Gai3βγ を観測対象とし GIRK キメラ-ナノディスクを添加する NMR 実験から、Gai3βγ と GIRK キメラ-ナノディスクとの相互作用の見かけの K_d は 10^{-4} M のオーダーと見積もられた。この K_d 値から、生理的条件下での Gai3βγ-GIRK 相互作用の親和性を見積もった。膜タンパク質同士の親和性は、膜上では運動の次元が制限されることにより、分子が自由に平行移動・回転する溶液中と比べて、 10^4 程度増大しうる。この現象はこれまでに解析されてきた Gβγ-GIRK 相互作用においても観測されていた (22, 24)。本研究の NMR 実験条件では、Gai3βγ は一部膜に局在すると考えられることから、完全に膜にアンカーされた場合の親和性の増大は 10^4 ほど大きくはないと予想される。したがって、細胞膜上での Gai3βγ-GIRK の相互作用の K_d は 10^{-7} M 程度と推定した。GPCR への刺激に伴って解離した Gβγ が迅速に GIRK を開口させるためには、Gai/oβγ-GIRK 相互作用によって妨げられることなく Gβγ と GIRK が結合する必要があることから、Gai/oβγ-GIRK の親和性は Gβγ-GIRK の親和性よりも弱いと予想される。電気生理実験において GIRK 電流を最大値の 50%誘起する Gβ_{1γ2} 濃度、すなわち Gβγ-GIRK の見かけの親和性は $K_{act} = 11$ nM と報告されており (24)、これと比べて Gai3βγ-GIRK 相互作用の 10^{-7} M という K_d の範囲は妥当である。

4-3. 多様な配向を含む Gai/oβγ-GIRK 相互作用様式

本研究で示した Gai/oβγ-GIRK 複合体のモデル構造から、Gai3βγ の脂質修飾部位が膜の方を向き膜上に局在した状態で、複数の相対配置にて相互作用が可能であることが示された。PRE 実験から、GIRK の β ストランド領域は Gai3βγ と特定の相互作用を形成しないことが示されており、また BRET 実験にて GIRK の C 末端ヘリックスと Gai3 のヘリカルドメインとの相互作用が選択的な共役の有無を主に決定していることが示されていた。このことから、GIRK の β ストランド領域に対して Gai3βγ の相対配置が定まっておらず多様であることは、NMR 実験条件で脂質非修飾 Gai/oβγ を用いたことによるアーティファクトではなく、生理的条件でも存在する現象であると結論した。このように自由度を保持した Gai/oβγ と GIRK の相互作用様式は、Gβγ と GIRK が特定の相対配置で結合すること (Figure 8) とは対照的である。Gβγ-GIRK 相互作用の NMR 解析および結晶構造解析 (22, 23) から示されるように、Gβγ は GIRK の高次構造を形成した β ストランド領域に結合する。β ストランド領域に対する Gai3βγ の相対配置に自由度があることによって、Gβγ が妨げられることなく GIRK 上の結合部位に近づくことができ、このことは迅速な GIRK の開口を達成するうえで有利であると考察した。

4-4. 活性化サイクルを通じた Gi/o と GIRK の共局在

Gβγ-GIRK, Gai/o(GTP)-GIRK, Gai/oβγ-GIRK の結合様式を比較することにより、Gi/o タンパク質が活性化サイクル全体を通じて GIRK の活性を選択的かつ効率的に制御する構造機構について考察した (Figure 30)。

本研究の結果から、不活性状態において、G タンパク質は GDP が結合した Gai/oβγ の状態で GIRK と直接結合することが示された。そして、その複合体構造から、Gai/oβγ と GIRK は、主に Ga のヘリカルドメインと GIRK の C 末端ヘリックスの相互作用によって互いに繋

ぎとめられていることが明らかとなった。アゴニストの結合によって GPCR が活性化すると、Gai/o での GDP-GTP 交換反応が触媒され、Gai/oβγ が Gai/o(GTP) と Gβγ に解離する。すると Gα によって遮蔽されていた Gβγ 上の GIRK 結合部位が露出し、GIRK と結合可能になる。GIRK 上の Gai/oβγ 結合部位と Gβγ 結合部位は重複しないため (Figure 30B)、解離した Gβγ は複合体内の GIRK に直ちに結合し、速やかに開口させることができる。不活性化状態における Gαβγ と GIRK との複合体形成は、i/o ファミリーにおいてのみ生じるために、i/o ファミリーから解離した Gβγ は GIRK を開口させることができる。他方、GIRK との複合体を形成しない他のファミリーの Gαβγ から解離した Gβγ は、拡散により GIRK に到達する前に他のエフェクター分子と結合する、あるいは Gα(GDP) と再結合して不活性化型に戻るために、GIRK を開口させることができない。このようにして、i/o ファミリー選択的な GIRK の開口が可能となっていると考察した。

また活性化状態においても、当研究室で過去に明らかとしたように、Gai/o(GTP) が GIRK の C 末端ヘリックスに結合する (10)。GPCR への刺激が終了し、Gα の GTPase 活性により結合した GTP が GDP へ加水分解されると、GDP 結合型となった Gai/o は Gβγ と解離定数 nM オーダーの高親和性で再結合し (81)、競合的に GIRK から Gβγ を回収することで、迅速に GIRK を閉口させる。

以上の構造モデル (Figure 30A) から、Gai/o は活性化サイクル全体を通じて GIRK と結合・共局在していることで、Gai/o 選択的な GIRK 活性制御を可能としており、なおかつ活性化サイクル中の各ステップで GIRK と G タンパク質の相互作用様式が変化することで、細胞外刺激に応じて効率的に GIRK の活性が制御されていると考察した。このことが心臓や神経系でのシグナル伝達が適切に行われるうえで重要な役割を果たしていると提唱する。

4-5. 不活性化状態 $Gai/o\beta\gamma$ と活性化状態 $Gai/o(GTP)$ の結合様式の違い

不活性化状態の $Gai/o\beta\gamma$ は、活性化状態の $Gai/o(GTP)$ および $G\beta\gamma$ と同じタンパク質から構成されており、 $G\alpha$ のヘリカルドメインの構造の違いはほとんどない。しかし、GIRK に対する Gai/o の結合様式は各状態で異なっている。G タンパク質の活性化・不活性化のサイクル中で、どのようにして異なる相互作用を形成しうるのかについて考察する。各状態での G タンパク質と GIRK 細胞内領域の結合部位を比較したところ、 $Gai/o\beta\gamma$ は主に Gai/o のヘリカルドメインで GIRK と相互作用する一方 (Figure 30 B 緑色)、 $Gai/o(GTP)$ は主に GTPase ドメインで GIRK と相互作用することがわかった (10) (Figure 30 B 赤色)。GTPase ドメイン上の GIRK 結合面は $Gai/o\beta\gamma$ においては $G\beta\gamma$ に遮蔽されているため、 $Gai/o(GTP)$ の状態でのみ GIRK を認識することができる。また、 $Gai/o\beta\gamma$ と $Gai/o(GTP)$ における N 末端領域の構造の違いも、異なる結合様式に寄与する。 $Gai/o\beta\gamma$ において、 $G\alpha$ の N 末端領域は $G\beta\gamma$ との相互作用に伴ってヘリックスを形成し、ヘリックス表面の塩基性パッチが膜脂質と相互作用することにより、膜に対する結合角度が定まっている。一方 $Gai/o(GTP)$ においては、N 末端領域は構造を形成しておらず、 $Gai/o(GTP)$ の GTPase ドメインが膜から離れて、GIRK の C 末端ヘリックスと相互作用することができる。以上のように Gai/o は、 $Gai/o\beta\gamma$ の状態と $Gai/o(GTP)$ の状態とで異なる GIRK 結合面を用いること、また同時に膜に対する相対配置を変化させることによって、各状態で GIRK との異なる結合様式を可能にしていると考察した。

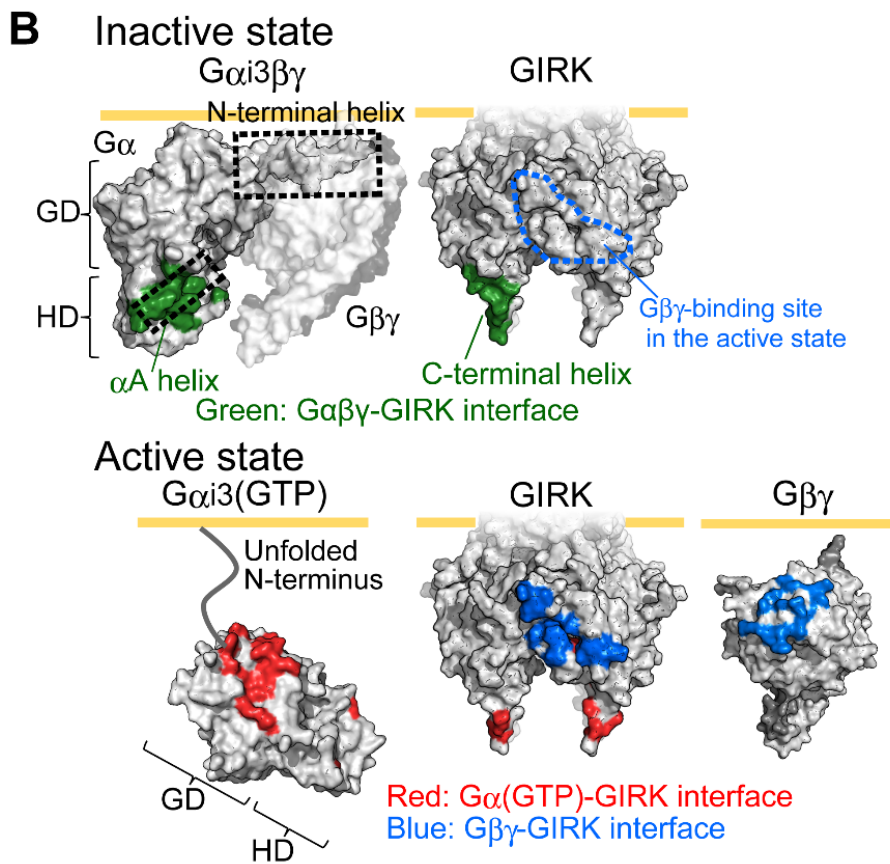
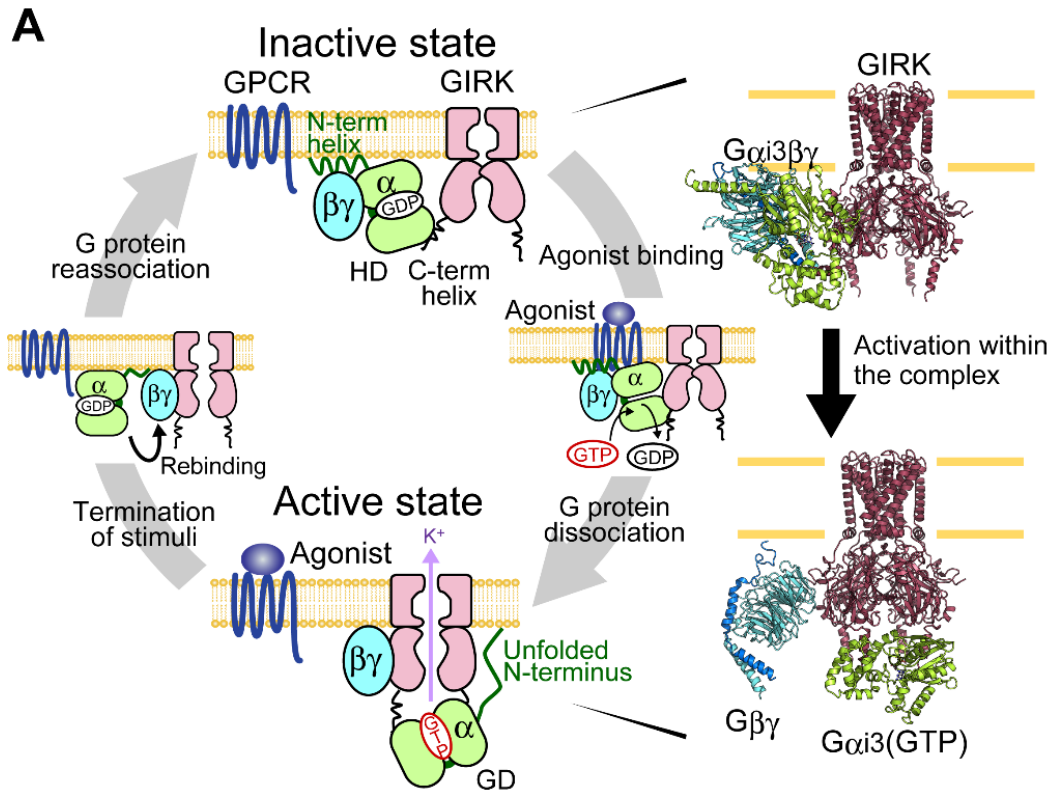


Figure 30 活性化サイクル全体を通じた Gi/o と GIRK のカップリング。(A) 不活性化状態 (上段) と活性化状態 (下段) での GIRK と Gi/o の共局在を示す模式図。右側に、Gai3 $\beta\gamma$ -GIRK 複合体と、Gai3(GTP)-GIRK-G $\beta\gamma$ 複合体のモデル構造をリボン表示で示した。Gai3(GTP)-GIRK-G $\beta\gamma$ 複合体のモデル構造は、Gai3(GTP)-GIRK モデル構造 (10) と GIRK-G $\beta\gamma$ 結晶構造 (23) を統合して作成した。GIRK キメラ (PDB ID: 2QKS_1) (11), Gai1 $\beta\gamma$ (PDB ID: 1GP2) (13), Gai1(GTP) (PDB ID: 1GIA) (16), G $\beta\gamma$ (PDB ID: 4KFM より) (23) の結晶構造を用いた。(B) Gai3 $\beta\gamma$ または Gai3(GTP), G $\beta\gamma$ と GIRK 細胞内領域を表面表示し、Gai3 $\beta\gamma$ -GIRK 結合面 (モデル構造で 5.5Å 以内にある残基対) を緑色で、Gai3(GTP)-GIRK 結合面 (転移交差飽和実験により同定 (10)) を赤色で色付けした。GIRK- G $\beta\gamma$ 結合面 (22, 23) を青色で色付けした。GD : GTPase ドメイン、HD : ヘリカルドメイン。

4-6. GPCR との共局在

不活性状態にて形成される複合体には、G タンパク質と GIRK に加えて GPCR も構成因子として含まれているという知見がある (37–39)。 $G\alpha\beta\gamma$ 上の主要な GPCR 結合部位は $G\alpha$ の GTPase ドメインの $\alpha 5$ ヘリックスであることが知られているが (21)、この $\alpha 5$ ヘリックスは GIRK と $G\alpha i/o\beta\gamma$ との相互作用に関与していないことから、今回示した $G\alpha i/o\beta\gamma$ -GIRK の複合体構造に同時に GPCR が結合可能である (Figure 31)。今回示した $G\alpha i/o\beta\gamma$ -GIRK の複合体構造は GPCR も含むさらに大きなシグナリング複合体の一部を反映したものである可能性がある。

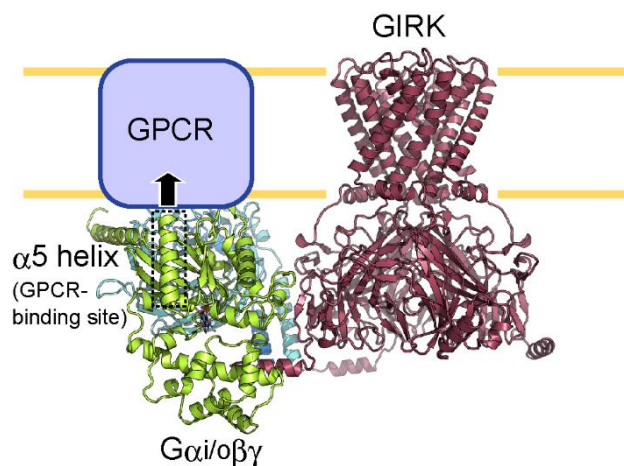


Figure 31 $G\alpha$ 上の GPCR 結合部位 ($\alpha 5$ ヘリックス) は GIRK との相互作用に関与しない。本研究で構築した $G\alpha i/o\beta\gamma$ -GIRK アンサンブルモデル中の構造の一例を示し、 $\alpha 5$ ヘリックスに点線で印をつけた。細胞膜上の GPCR を模式的に示した。

第5章 総括

本研究において私は、Gai/o 選択的な GIRK の活性化の分子機構を解明した。細胞を用いた BRET 実験と NMR 解析を組み合わせることで、G α ヘリカルドメインの αA ヘリックスが、G $\alpha\beta\gamma$ -GIRK 複合体が形成されるか否かを決定する要因であり、その複合体の形成によって選択的な GIRK の活性化が可能となっていることを示した。PRE 実験から得られた距離拘束条件に基づき、Gai/o $\beta\gamma$ -GIRK 複合体のモデル構造を構築し、選択的かつ効率的な GIRK 活性制御の分子基盤を提唱した。

本研究では、膜上で形成される過渡的な複合体が、生体内のシグナル伝達経路を決定するうえで重要な役割を果たしていることを明らかにした。G タンパク質シグナリングにおいてアデニル酸シクラーゼなどの他のエフェクターも、不活性状態にて G $\alpha\beta\gamma$ と相互作用するとの報告があり (44)、不活性状態での相互作用による活性制御の選択性は、G タンパク質シグナリング全般に適用可能な機構である可能性がある。本研究は不活性状態における G タンパク質とエフェクターの相互作用様式を明らかにし、選択的な活性制御の分子機構を説明する初めての研究例であり、G タンパク質シグナリングの制御機構を理解するうえで新たな枠組みを提供するものである。

また、本研究で明らかにした Gai/o $\beta\gamma$ と GIRK との複合体構造は、単一でなく複数の相対配置をとりうる自由度を保持したものであった。このような複合体は、生理的に重要なシグナル伝達に関与するものであっても、その親和性の低さや不均一性ゆえに安定な複合体を精製できないため、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡による詳細な解析は困難である。NMR 法は、 K_d が μM ~ mM オーダーと過渡的であり自由度を保持したタンパク質間相互作用を解析することが可能であるため、これらの相互作用の解析に貢献できることが期待される。本研究の成果は、これらの相互作用の解析における NMR 法の有用性を実証するものであり、細胞内シグナル伝達ネットワークのさらなる理解を深める端緒となるものである。

参考文献

1. Hibino H, et al. (2010) Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol Rev* 90:291–366.
2. Oldham WM, Hamm HE (2006) Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys* 39(2):117–166.
3. Lüscher C, Slesinger PA (2010) Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 11(5):301–315.
4. Patil N, et al. (1995) A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet* 11(2):126–9.
5. Kaufmann K, et al. (2013) ML297 (VU0456810), the first potent and selective activator of the GIRK potassium channel, displays antiepileptic properties in mice. *ACS Chem Neurosci* 4(9):1278–1286.
6. Farhy Tselnicker I, et al. (2014) Dual regulation of G proteins and the G-protein-activated K⁺ channels by lithium. *Proc Natl Acad Sci* 111(13):5018–5023.
7. Whorton MR, MacKinnon R (2011) Crystal structure of the mammalian GIRK2 K⁺ channel and gating regulation by G proteins, PIP₂, and sodium. *Cell* 147(1):199–208.
8. Nishida M, MacKinnon R (2002) Structural basis of inward rectification: Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 111(7):957–965.
9. Inanobe A, Matsuura T, Nakagawa A, Kurachi Y (2007) Structural diversity in the cytoplasmic region of G protein-gated inward rectifier K⁺ channels. *Channels* 1(1):39–45.
10. Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I (2012) Structural basis for modulation of gating property of G protein-gated inwardly rectifying potassium ion channel (GIRK) by i/o-family G protein α subunit ($G\alpha_{i/o}$). *J Biol Chem* 287(23):19537–19549.
11. Nishida M, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2007) Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *EMBO J* 26(17):4005–4015.
12. Flock T, et al. (2015) Universal allosteric mechanism for G α activation by GPCRs. *Nature* 524(7564):173–179.
13. Wall MA, et al. (1995) The structure of the G protein heterotrimer G_{ia1} $\beta_1\gamma_2$. *Cell* 83(6):1047–1058.
14. Kosloff M, Elia N, Selinger Z (2002) Structural homology discloses a bifunctional structural motif at the N-termini of G α proteins. *Biochemistry* 41(49):14518–14523.
15. Crouthamel M, Thiyagarajan MM, Evanko DS, Wedegaertner PB (2008) N-terminal polybasic motifs are required for plasma membrane localization of G α_s and G α_q . *Cell Signal* 20(10):1900–1910.
16. Coleman D, et al. (1994) Structures of active conformations of G_{ia1} and the mechanism of GTP

- hydrolysis. *Science* 265(5177):1405–1412.
17. Medkova M, Preininger AM, Yu NJ, Hubbell WL, Hamm HE (2002) Conformational changes in the amino-terminal helix of the G protein $\alpha 1$ following dissociation from G $\beta\gamma$ subunit and activation. *Biochemistry* 41(31):9962–9972.
 18. Flock T, et al. (2017) Selectivity determinants of GPCR-G-protein binding. *Nature* 545(7654):317–322.
 19. Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJG (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the G α_q -GRK2-Gbetagamma complex. *Science* 310(5754):1686–90.
 20. Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB (1996) Crystal structure of a G $_A$ protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379(6563):369–374.
 21. Rasmussen SGF, et al. (2011) Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477(7366):549–557.
 22. Yokogawa M, Osawa M, Takeuchi K, Mase Y, Shimada I (2011) NMR analyses of the G $\beta\gamma$ binding and conformational rearrangements of the cytoplasmic pore of G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1). *J Biol Chem* 286(3):2215–2223.
 23. Whorton MR, MacKinnon R (2013) X-ray structure of the mammalian GIRK2- $\beta\gamma$ G-protein complex. *Nature* 498(7453):190–197.
 24. Wickman KD, et al. (1994) Recombinant G-protein $\beta\gamma$ -subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature* 368(6468):255–257.
 25. Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K $^+$ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19(3):687–695.
 26. Wellner-Kienitz MC, Bender K, Pott L (2001) Overexpression of β_1 and β_2 adrenergic receptors in rat atrial myocytes: Differential coupling to G protein-gated inward rectifier K $^+$ channels via G $_s$ and G $_{i/o}$. *J Biol Chem* 276(40):37347–37354.
 27. Touhara KK, MacKinnon R (2018) Molecular basis of signaling specificity between GIRK channels and GPCRs. *Elife* 7:399–404.
 28. Leaney JL, Milligan G, Tinker A (2000) The G protein α subunit has a key role in determining the specificity of coupling to, but not the activation of, G protein-gated inwardly rectifying K $^+$ channels. *J Biol Chem* 275(2):921–929.
 29. Rusinova R, Mirshahi T, Logothetis DE (2007) Specificity of G $\beta\gamma$ signaling to Kir3 channels depends on the helical domain of pertussis toxin-sensitive G α subunits. *J Biol Chem* 282(47):34019–34030.
 30. Lei Q, et al. (2000) Activation and inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium (Kir3) channels by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17):9771–9776.

31. Doupnik CA, Jaén C, Zhang Q (2004) Measuring the modulatory effects of RGS proteins on GIRK channels. *Methods Enzymol* 389:131–154.
32. Ivanina T, et al. (2004) $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_{i3}$ Differentially Interact with, and Regulate, the G Protein-activated K^+ Channel. *J Biol Chem* 279(17):17260–17268.
33. Berlin S, et al. (2011) Two Distinct Aspects of Coupling between $G\alpha_i$ Protein and G Protein-activated K^+ Channel (GIRK) Revealed by Fluorescently Labeled $G\alpha_{i3}$ Protein Subunits. *J Biol Chem* 286(38):33223–33235.
34. Peleg S, Varon D, Ivanina T, Dessauer CW, Dascal N (2002) $G\alpha_i$ controls the gating of the G protein-activated K^+ channel, GIRK. *Neuron* 33(1):87–99.
35. Clancy SM, et al. (2005) Pertussis-toxin-sensitive G_α subunits selectively bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: Evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex. *Mol Cell Neurosci* 28(2):375–389.
36. Riven I, Iwanir S, Reuveny E (2006) GIRK Channel Activation Involves a Local Rearrangement of a Preformed G Protein Channel Complex. *Neuron* 51(5):561–573.
37. Fowler CE, Aryal P, Suen KF, Slesinger PA (2007) Evidence for association of GABA_B receptors with Kir3 channels and regulators of G protein signalling (RGS4) proteins. *J Physiol* 580(1):51–65.
38. Tateyama M, Kubo Y (2018) G_i/o -coupled muscarinic receptors co-localize with GIRK channel for efficient channel activation. *PLoS One* 13(9):e0204447.
39. Richard-Lalonde M, et al. (2013) Conformational Dynamics of Kir3.1/Kir3.2 Channel Activation Via δ -Opioid Receptors. *Mol Pharmacol* 83(2):416–428.
40. Perkins JR, Diboun I, Dessailly BH, Lees JG, Orengo C (2010) Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure* 18(10):1233–1243.
41. Grasberger B, Minton AP, DeLisi C, Metzger H (1986) Interaction between proteins localized in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(17):6258–62.
42. Wang W, Whorton MR, MacKinnon R (2014) Quantitative analysis of mammalian GIRK2 channel regulation by G proteins, the signaling lipid PIP_2 and Na^+ in a reconstituted system. *Elife* 3. doi:10.7554/eLife.03671.
43. Lavine N, et al. (2002) G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 277(48):46010–46019.
44. Rebois R V., et al. (2006) Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci* 119(13):2807–2818.
45. Conklin BR, Farfel Z, Lustig KD, Julius D, Bourne HR (1993) Substitution of three amino acids switches receptor specificity of $G_q\alpha$ to that of $G_i\alpha$. *Nature* 363(6426):274–276.
46. Hynes TR, et al. (2004) Visualization of G protein $\beta\gamma$ dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both β and γ in subcellular targeting. *J Biol Chem*

- 279(29):30279–30286.
47. Hollins B, Kuravi S, Digby GJ, Lambert NA (2009) The c-terminus of GRK3 indicates rapid dissociation of G protein heterotrimers. *Cell Signal* 21(6):1015–1021.
 48. Masuho I, et al. (2015) Distinct profiles of functional discrimination among G proteins determine the actions of G protein-coupled receptors. *Sci Signal* 8(405):1–16.
 49. Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I (2012) Backbone resonance assignments for G protein α_{13} subunit in the GTP-bound state. *Biomol NMR Assign* 6(2):217–220.
 50. Toyama Y, et al. (2017) Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses. *Nat Commun* 8:1–15.
 51. Goto NK, Gardner KH, Mueller GA, Willis RC, Kay LE (1999) A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile (δ 1) methyl-protonated ^{15}N -, ^{13}C -, ^2H -labeled proteins. *J Biomol NMR* 13(4):369–74.
 52. Tugarinov V, Kanelis V, Kay LE (2006) Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nat Protoc* 1(2):749–754.
 53. Ayala I, Sounier R, Usé N, Gans P, Boisbouvier J (2009) An efficient protocol for the complete incorporation of methyl-protonated alanine in perdeuterated protein. *J Biomol NMR* 43(2):111–119.
 54. Gans P, et al. (2010) Stereospecific isotopic labeling of methyl groups for NMR spectroscopic studies of high-molecular-weight proteins. *Angew Chemie - Int Ed* 49(11):1958–1962.
 55. Bayburt TH, Grinkova Y V., Sligar SG (2002) Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett* 2(8):853–856.
 56. Denisov IG, Grinkova Y V., Lazarides AA, Sligar SG (2004) Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodiscs with Controlled Size. *J Am Chem Soc* 126(11):3477–3487.
 57. Yoshiura C, et al. (2010) NMR Analyses of the Interaction between CCR5 and Its Ligand Using Functional Reconstitution of CCR5 in Lipid Bilayers. *J Am Chem Soc* 132(19):6768–6777.
 58. Wishart D, et al. (1995) ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* 6(2):57–93.
 59. Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I (2014) Backbone resonance assignments for G protein α_{13} subunit in the GDP-bound state. *Biomol NMR Assign* 8(2):237–241.
 60. Mixon MB, et al. (1995) Tertiary and quaternary structural changes in $\text{G}_{i\alpha 1}$ induced by GTP hydrolysis. *Science* 270(5238):954–960.
 61. Nishimura A, et al. (2010) Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric G_q protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13666–71.
 62. Lapinaite A, et al. (2013) The structure of the box C/D enzyme reveals regulation of RNA methylation. *Nature* 502(7472):519–523.

63. Tugarinov V, Kay LE (2006) Relaxation rates of degenerate ^1H transitions in methyl groups of proteins as reporters of side-chain dynamics. *J Am Chem Soc* 128(22):7299–7308.
64. Tugarinov V, Kay LE (2013) Estimating side-chain order in $[\text{U-}^2\text{H};^{13}\text{CH}_3]$ -labeled high molecular weight proteins from analysis of HMQC/HSQC spectra. *J Phys Chem B* 117(13):3571–3577.
65. Waterhouse A, et al. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46(W1):W296–W303.
66. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W (2008) CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* 29(11):1859–1865.
67. Schwieters CD, Kuszewski JJ, Tjandra N, Clore GM (2003) The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J Magn Reson* 160(1):65–73.
68. Schwieters CD, Kuszewski JJ, Marius Clore G (2006) Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 48(1):47–62.
69. Tian Y, Schwieters CD, Opella SJ, Marassi FM (2014) A practical implicit solvent potential for NMR structure calculation. *J Magn Reson* 243:56–64.
70. Meng XY, Zhang HX, Logothetis DE, Cui M (2012) The molecular mechanism by which PIP₂ opens the intracellular G-loop gate of a Kir3.1 channel. *Biophys J* 102(9):2049–2059.
71. Iwahara J, Schwieters CD, Clore GM (2004) Ensemble Approach for NMR Structure Refinement against ^1H Paramagnetic Relaxation Enhancement Data Arising from a Flexible Paramagnetic Group Attached to a Macromolecule. *J Am Chem Soc* 126(18):5879–5896.
72. Schwieters CD, Clore GM (2002) Reweighted atomic densities to represent ensembles of NMR structures. *J Biomol NMR* 23(3):221–225.
73. Jurrus E, et al. (2018) Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci* 27(1):112–128.
74. Tugarinov V, Hwang PM, Ollerenshaw JE, Kay LE (2003) Cross-correlated relaxation enhanced ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *J Am Chem Soc* 125(34):10420–10428.
75. Matsuo H, et al. (1999) Identification by NMR spectroscopy of residues at contact surfaces in large, slowly exchanging macromolecular complexes. *J Am Chem Soc* 121(42):9903–9904.
76. Clore GM (2011) Exploring sparsely populated states of macromolecules by diamagnetic and paramagnetic NMR relaxation. *Protein Sci* 20(2):229–246.
77. Clore GM, Iwahara J (2009) Theory, practice, and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes. *Chem Rev* 109(9):4108–4139.
78. Sunahara RK, Tesmer JJ, Gilman AG, Sprang SR (1997) Crystal structure of the adenylyl cyclase activator G_{sa}. *Science* 278(5345):1943–7.
79. Kobrinsky E, Mirshahi T, Zhang H, Jin T, Logothetis DE (2000) Receptor-mediated hydrolysis of

- plasma membrane messenger PIP_2 leads to K^+ -current desensitization. *Nat Cell Biol* 2(8):507–514.
80. Lei Q, Talley EM, Bayliss DA (2001) Receptor-mediated Inhibition of G Protein-coupled Inwardly Rectifying Potassium Channels Involves $\text{G}\alpha_q$ Family Subunits, Phospholipase C, and a Readily Diffusible Messenger. *J Biol Chem* 276(20):16720–16730.
81. Sarvazyan NA, Remmers AE, Neubig RR (1998) Determinants of $\text{G}_{i1}\alpha$ and $\beta\gamma$ binding. Measuring high affinity interactions in a lipid environment using flow cytometry. *J Biol Chem* 273(14):7934–7940.

謝辞

本研究を遂行する機会とそのための最高の環境を与えてくださり、研究活動をはじめとする様々な点にわたり御指導、御配慮を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室教授 嶋田一夫先生に心より深く御礼申し上げます。

本研究に関して貴重な御助言、御指導をいただき、また円滑に研究を行うための環境を整えてくださいました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室准教授 西田紀貴先生、助教 上田卓見先生、特任助教 幸福裕先生に心より感謝申し上げます。

実験の操作や、研究の進め方、文章の構成や発表の仕方など研究の全てにわたって丁寧に御指導いただき、常に温かく研究の遂行を支えてくださいました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室 外山侑樹博士に心より感謝いたします。

構造計算について強力な御助言、御協力をいただきました東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室 今井駿輔博士に心より感謝いたします。

研究の初期において、熱心に御指導、御助言をいただき、温かく励ましてくださいました、現 慶應義塾大学薬学部教授 大澤匡範先生に深く感謝いたします。

GIRK キメラ、 $G\beta\gamma$ および $G\alpha$ の発現系を構築し、本研究の基礎を築いてくださいました、横川真梨子博士（現 慶應義塾大学薬学部講師）、間瀬瑤子博士に深く感謝申し上げます。

研究を進めるにあたり身近に討論いただきました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の皆様感謝いたします。特に、日々の研究生生活において親身な御助言、御配慮をいただきました岩橋優太修士に感謝いたします。また、哺乳細胞の扱い方について御指導いただきました趙慶慈修士に感謝いたします。

そして、今までの学生生活を支えてくださった家族、友人に心から感謝いたします。

本論文における発光・蛍光測定には、東京大学大学院薬学系研究科ワンストップ創薬共用ファシリティセンターの機器を使用させていただきました。深く御礼申し上げます。

加納花穂は日本学術振興会特別研究員です。