

論文の内容の要旨

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

【背景】

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) は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に共役して開口することで心拍数の低下や抑制性神経伝達を担う。GPCR へのリガンド結合に伴い、G タンパク質 ($G\alpha\beta\gamma$) が活性化されて $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ に解離すると、 $G\beta\gamma$ が GIRK 細胞内領域に結合し GIRK の開口が誘起される。生理的条件下で GIRK は、M2 アセチルコリン受容体などの GPCR を介した抑制性神経伝達物質刺激に応じて数百ミリ秒~1 秒程度で迅速に開口するが、 β アドレナリン受容体のような興奮性神経伝達を司る GPCR への刺激では開口しない (図 1)。このような細胞外刺激の種類に応じた選択的かつ効率的な GIRK の開口は、シグナル伝達経路の混線を防ぎ適切な細胞応答を維持する上で必要である。GIRK 開口因子である $G\beta\gamma$ は、いずれの GPCR 刺激で解離したのもも同等である。それにもかかわらず特定の刺激に選択的に GIRK が応答する分子機構として、G タンパク質の中でも *i/o* ファミリーの $G\alpha$ ($G_{ai/o}$) から解離した $G\beta\gamma$ のみが GIRK を開口させることが報告されている。先行研究の FRET 実験などから、GIRK と $G_{ai/o}\beta\gamma$ が不活性化状態において複合体を形成し共局在することで、活性化時の $G_{ai/o}$ 選択性を決定していると提唱されているものの、それらの蛍光タンパク質融合体を用いた実験では高分解能の構造情報は得られない。そのため、複合体の形成が $G_{ai/o}$ 選択的に生じる要因や、複合体の状態から GIRK が迅速に開口する構造機構は不明であった。さらに、このような膜上の複合体は、可溶化すると見かけの親和性が低下するため、単離して構造解析を行うことが困難であった。

そこで本研究では、膜環境を再現して低親和性の相互作用を解析可能な溶液 NMR 法を用いて、GIRK- $G_{ai/o}\beta\gamma$ 複合体の構造を明らかにし、 $G_{ai/o}$ 選択性を担う構造的要因を同定することで、 $G_{ai/o}$ 選択的に GIRK の活性が制御される機構を解明することを目指した。

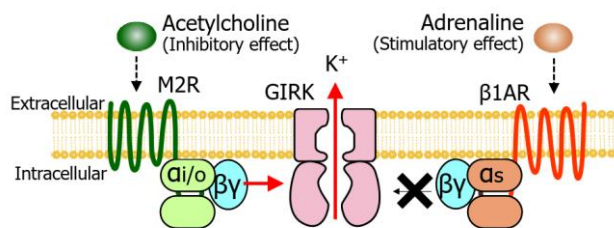


図 1 GIRK は特定の細胞外刺激に応じて選択的に開口する。

【方法と結果】

1. $G\alpha$ のヘリカルドメインが $G\beta\gamma$ による GIRK 開口のファミリー選択性を決定する

GIRK の開口における $G\alpha$ 選択性を評価し、 $G\alpha$ のどの部位が選択性を決定するかを同定するため、生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) を利用した実験系を構築した。HEK293T 細胞に GPCR, $G\alpha$, 蛍光タンパク質を融合させた $G\beta\gamma$, ルシフェラーゼを融合させた GIRK を発現させた。GPCR のアゴニストを添加し、G タンパク質が活性化したときの $G\beta\gamma$ -GIRK の結合を BRET の変化から検出した。G タンパク質の活性化度合を評価するコントロール実験も行い、GIRK- $G\beta\gamma$ の結合を G タンパク質の活性化度合で規格化した値 (specificity factor) を各種 $G\alpha$ で比較した。

その結果、i/o ファミリーに属する $G\alpha i3$ と比べて、 $G\alpha i3$ のヘリカルドメイン (以下 HD) を $G\alpha q$ のものに置換したキメラ体 $G\alpha iqi$ や、GPCR 結合部位以外の全体の配列が $G\alpha q$ 由来の $G\alpha qi5$ では specificity factor が有意に小さかった (図 2)。この結果は 2 種類の GPCR に共通していた。したがって、GPCR や $G\beta\gamma$ によらず $G\alpha$ の HD が GIRK 開口の選択性を決定していることが示された。

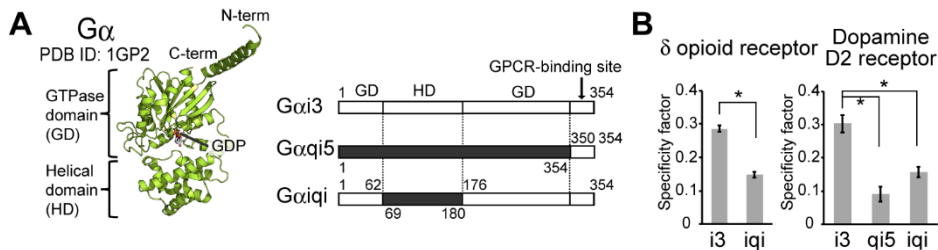


図 2 (A) $G\alpha$ の立体構造と使用した $G\alpha$ コンストラクト。
(B) 各条件で測定した specificity factor。n = 7-10, * $p < 0.001$

2. GIRK と $G\alpha\beta\gamma$ の直接の相互作用がファミリー選択的に生じる

そこで、GIRK と $G\alpha i/o\beta\gamma$ が直接結合し共局在することで選択性を決定しているという仮説のもと、精製した GIRK と $G\alpha i/o\beta\gamma$ を用いて直接の相互作用を解析した。GIRK としては、マウス GIRK1 細胞内領域と原核生物のオルソログ KirBac1.3 の膜貫通領域からなるキメラ体チャンネル (以降 GIRK) を発現、精製して用いた。GIRK と $G\alpha i/o\beta\gamma$ の相互作用があるとしたら、生体内では両者が膜に局在した状態で生じる。そこで、脂質二重膜をリポタンパク質が取り囲むことで膜環境を再現した可溶性粒子であるナノディスクに GIRK を再構成し (GIRK-ナノディスク)、生理的な相互作用を模倣した状態で解析に用いた。ヒト由来 $G\alpha i3$ および $G\beta 1\gamma 2$ をそれぞれ発現、精製し、両者を混合して $G\alpha i3\beta\gamma$ を調製した。G タンパク質のファミリー間で違いがある $G\alpha$ を NMR の観測対象とした。 $G\alpha i3\beta\gamma$ は 87 K, GIRK-ナノディスクとの複合体は 300 K と、NMR 観測対象としては高分子量であるため、先鋭なシグナルを与える Ile, Leu, Val, Ala 側鎖メチル基に選択的 ^{13}C 標識を施した $G\alpha i3$ を調製した。 $G\alpha i3\beta\gamma$ の側鎖メチル基の 1H - ^{13}C HMQC スペクトルを観測し、GIRK-ナノディスク添加に伴う変化から、結合が生じるか否かを調べた。

Gai3 β y 11 μ M に対して GIRK-ナノディスク 22 μ M を添加したところ、Gai3 の各シグナルに 0.1 程度の強度減少が生じた。これは Gai3 β y の見かけの分子量の増大、すなわち Gai3 β y の一部が GIRK-ナノディスクと複合体を形成したことを表す。この結果から、Gai3 β y と GIRK-ナノディスクが直接の相互作用を生じることが示された。同様の実験にて、前述のキメラ体 Gaiq β y は強度減少を生じなかったことから、Gai3 β y よりも GIRK-ナノディスクとの相互作用が減弱していることがわかった。1.の結果と合わせて、Gai3 β y と GIRK との直接の相互作用が選択的に生じ、その相互作用が GIRK 開口の選択性を決定していると結論した。

3. GIRK の C 末端ヘリックスと Gai3 β y の α A ヘリックスの結合により複合体が形成される

GIRK と Gai3 β y の残基間の距離情報を、GIRK に部位特異的にスピラベル TEMPO を修飾したときに Gai3 β y に生じる分子間の常磁性緩和促進 (PRE) 効果の解析により取得し、GIRK と Gai3 β y の複合体の構造を解明することを目指した。Gai3 β y 20 μ M に対して、TEMPO 修飾 GIRK-ナノディスク 25 μ M を添加した際に、各シグナルに生じる PRE を解析した。GIRK の C 末端ヘリックスに位置する L366 を修飾した場合、G α HD の α A と α B ヘリックスの間に位置するメチル基に 5 s⁻¹ 以上の顕著な PRE が観測され (図 3A)、これらの部位が複合体中で近接することがわかった。

GIRK の細胞内領域全体に分布する 3 残基を修飾部位として PRE データを収集し、得られた距離情報を用いて GIRK と Gai3 β y の結晶構造をもとにドッキングシミュレーションを行った。その結果、GIRK の C 末端ヘリックスと Gai3 の HD が結合していながら、GIRK の C 末端ヘリックスと β -strand region との間の構造自由度により GIRK と Gai3 β y の相対配置が様々に異なっている複数の構造のアンサンブルが、実験データをよく説明した (図 3A)。アンサンブルに含まれる複数の構造の中でも、Gai3 β y の脂質修飾部位が膜に面した構造 (図 3B) が、生理的な膜上の相互作用を反映していると判断した。複合体中の主な結合部位は GIRK の C 末端ヘリックスと Gai3 HD の α A ヘリックスであった。Gai3 の α A ヘリックスを変異させたところ、BRET 実験にて specificity factor が有意に低下した (0.159 \pm 0.008; p<0.001 vs. Gai3) ことから、 α A ヘリックスが選択性を決定していることが裏付けられた。

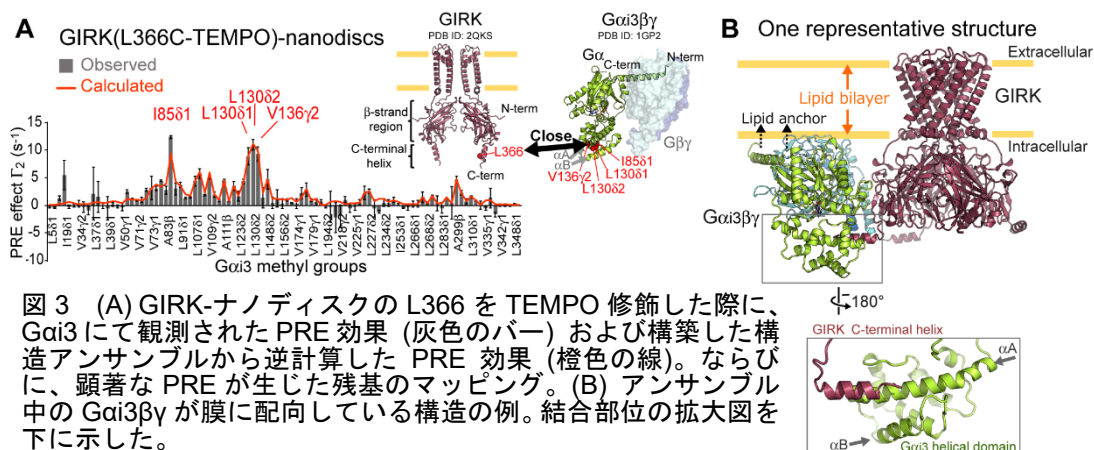


図 3 (A) GIRK-ナノディスクの L366 を TEMPO 修飾した際に、Gai3 にて観測された PRE 効果 (灰色のバー) および構築した構造アンサンブルから逆計算した PRE 効果 (橙色の線)。ならびに、顕著な PRE が生じた残基のマッピング。(B) アンサンブル中の Gai3 β y が膜に配向している構造の例。結合部位の拡大図を下に示した。

【考察】

以上の結果を統合すると、GIRKのC末端ヘリックスがGai/oの α Aヘリックスを認識することで、選択的にGai/o β -GIRK複合体が形成されGIRKの活性化が可能となっていることが示された。G α HDは配列全体にわたってG α ファミリー間での保存性が低く、ファミリー選択性を担う部位はこれまで明らかとなっていなかった。本研究の結果から、Gai3のHDの中でも α Aヘリックスが、GIRKと直接結合し共役を決定する構造的要因であることが明らかとなった。

GIRKがGai/oと結合・共局在していることと、迅速にG β γ 結合状態に移行し開口することは一見相反するが、これは本研究で示したGai3 β -GIRKの結合様式により説明できる。図4左のように、Gタンパク質は不活性化状態では3量体(Gai/o β)としてGIRKと結合する。GPCRへのアゴニスト刺激に伴いGai/o β が活性化すると、Gai/o(GTP)とG β γ に解離し、それぞれGIRKと結合してGIRKが開口する。GPCRへの刺激が終了し、G α に結合したGTPがGDPへ加水分解されると、Gai/o(GDP)とG β γ はそれぞれGIRKから解離し高親和性のGai/o β を再形成するためGIRKが閉口する。不活性化状態ではGai/o β のHDがGIRKのC末端ヘリックスと結合するのに対して、活性化時には解離したGai/o(GTP)のGTPaseドメインがGIRKのC末端ヘリックスと、G β γ がGIRKの β -strand region上の結合部位と、それぞれ結合する(図4右)。各状態の結合様式を比較すると、GIRK上のGai/o β 結合部位はG β γ 結合部位と重複しないため、Gai/o β から解離したG β γ は妨げられずに迅速に複合体内のGIRKに結合し開口を誘起できる。また、Gai/oは活性化・不活性化を通じてGIRKと相互作用し共局在し続けることで、Gai/o選択性を維持している。以上の機構により、迅速かつ選択的なGIRKの活性制御が可能となっており、心臓や神経系での適切なシグナル伝達に貢献していると考察した。

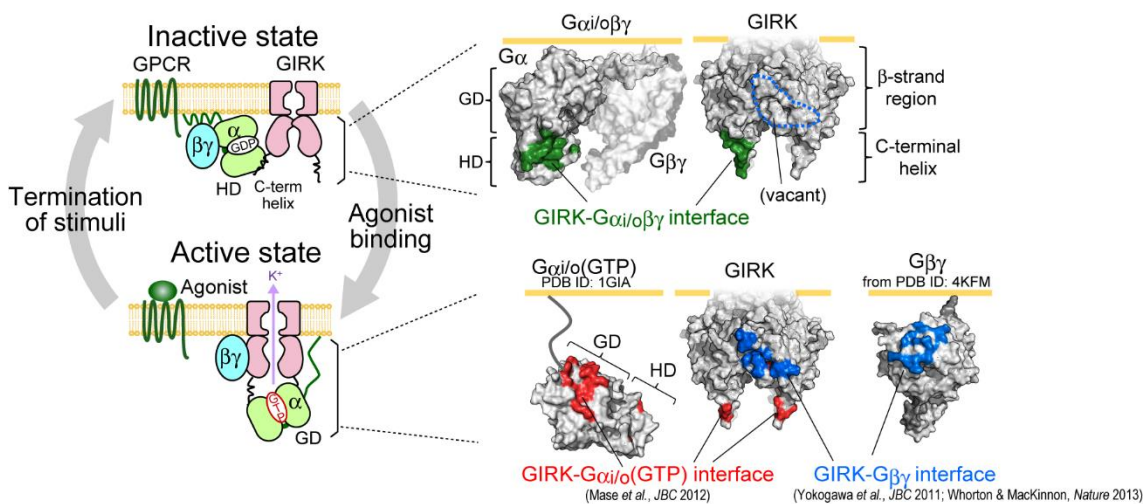


図4 Gタンパク質とGIRKの活性化サイクル。右に、各状態でのGIRK細胞内領域とGタンパク質との結合部位を表面表示で示した。