

審査の結果の要旨

氏名 夏目 芽依

β_2 アドレナリン受容体が複数のシグナルを活性化する動的構造基盤の解明と題する本論文は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種である β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) のマイクロスイッチの動的構造を、溶液 NMR 法を用いて解析した成果を述べたものである。本論文は、全 5 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に実験の材料と方法が記されている。第 3 章に実験結果がまとめられ、第 4 章でその結果に対する考察、第 5 章に結論が記述されている。

第 3 章では、まず各マイクロスイッチの構造を検出する NMR プローブの選出と帰属を行い、野生型の作動薬結合状態のマイクロスイッチの構造を解析している。本論文では、NMR プローブとして、これまでに当研究室の解析で明らかになった、PIF モチーフの構造を反映する M82^{2,53} の側鎖メチル基に加えて、DRY モチーフ、Y^{5,58}、NPxxY モチーフを構成する残基である、Y132^{3,51}、Y219^{5,58}、Y326^{7,53} の主鎖アミド基に着目している。これら 4 残基の NMR シグナルを観測するために、メチオニン側鎖メチル基とチロシン主鎖アミド基を選択的に標識した β_2 AR を調製し、逆作動薬結合状態と作動薬結合状態の NMR スペクトルを測定している。測定したスペクトルのうち、逆作動薬結合状態の Y132^{3,51}、Y219^{5,58}、Y326^{7,53} 由来のシグナルを、変異体解析を用いて帰属している。一方で、作動薬結合状態では、選択的に 1 残基前のアミノ酸の重水素化を行い、目的のシグナルのみの強度を上昇させるという新たな解析手法を用いることによって、Y219^{5,58} と Y326^{7,53} 由来のシグナルを検出し帰属することに成功している。逆作動薬結合状態と作動薬結合状態の β_2 AR の Y132^{3,51}、Y219^{5,58}、Y326^{7,53} 由来のシグナルの強度の比較から、作動薬結合状態の β_2 AR では、DRY モチーフや Y^{5,58}、NPxxY モチーフに構造多型が存在することを明らかにしている。

次に、選択的なシグナルの活性化とマイクロスイッチの動的構造の関連を調べるために、アレスチン活性が選択的に低下した L124^{3,43}S 変異体の作動薬結合状態を解析している。L124^{3,43}S 変異体と野生型の NMR プローブ由来のシグナルの強度の比較から、L124^{3,43}S 変異体では、PIF モチーフは野生型と同様にオン状態であり、NPxxY モチーフには構造多型が存在する一方で、Y132^{3,51} と Y^{5,58} の構造多型は野生型と比較して抑制されていることを明らかにしている。

また、L124^{3,43}S 変異に伴って構造変化が引き起こされる要因について明らかにするために、L124^{3,43} を、別のアミノ酸 (グリシンとメチオニン) に置換した変異体の作動薬結合状態を解析している。各変異体の作動薬結合状態の NMR プローブ由来のシグナルの強度や化学シフトの比較から、マイクロスイッチの構造は、L124^{3,43}M 変異体が野生型と同様であるのに対し、L124^{3,43}G 変異体では L124^{3,43}S 変異体と同様であることを明らかにしている。各アミノ酸の側鎖の体積の違いに着目することで、L124^{3,43}S 変異体では、L124^{3,43} の側鎖の体積が減少したことによって、DRY モチーフと Y^{5,58} の構造多型が抑制されたと結論している。

最後に、L124^{3,43} のかさ高い側鎖が相互作用している残基を明らかにするために、L124^{3,43} と側鎖同士が近接する I278^{6,41} を、体積の小さい側鎖を持つセリンに置換した変異体の作動薬結合状態を解析している。その結果、I278^{6,41}S 変異体では Y^{5,58} の構造多型が野生型と比較して抑制されることを明らかにし

ており、I278^{6.41}はL124^{3.43}と相互作用することによってY^{5.58}の構造多型を制御していると結論している。

以上の結果をもとに、第4章では、 β_2 ARが複数のシグナルを活性化する構造機構を考察している。 β_2 ARに作動薬が結合すると、PIFモチーフが構造変化し、その近傍に位置するL124^{3.43}のかさ高い側鎖に構造多型が生じることで、隣接するかさ高い疎水性のアミノ酸、I127^{3.46}やI278^{6.40}を介して、DRYモチーフとY^{5.58}へ構造多型が伝搬すると考察している。このような構造多型の伝搬によって、DRYモチーフとY^{5.58}の構造のアンサンブルの中に、Gタンパク質やアレスチンが認識できる別々の構造が存在することで、作動薬結合状態の β_2 ARでは、複数のシグナルを活性化するという構造基盤を提唱している。

GPCRのマイクロスイッチの動的構造を解析した例は本論文が初めてであり、提唱された作動薬結合状態の複数のシグナルの活性化の構造基盤は他のGPCRにも共通している可能性が高く、生物学的にも薬理的にも重要な知見であると言える。

よって、本論文は、博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。