

博士論文 (要約)

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

夏目 芽依

【背景】

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は作動薬の結合に伴い、G タンパク質およびアレスチンを活性化する。活性化された G タンパク質とアレスチンはそれぞれ別々の生理応答を誘起するため、GPCR が両分子を共に活性化することは重要である。GPCR による G タンパク質やアレスチンの活性化は、GPCR の立体構造中に存在する、PIF モチーフ、DRY モチーフ、Y^{5,58}、NPxxY モチーフといったマイクロスイッチによって支配されている。一方で、GPCR による G タンパク質やアレスチンの活性化は、GPCR のリガンドや点変異によって選択的に変調を受けることが分かっている。例えば、分子系統解析を用いて見出された、 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) の L124^{3,43S} 変異体 (右上に Ballesteros-Weinstein numbering を示す) は、野生型と同等以上の G タンパク質活性を保持する一方で、アレスチン活性が選択的に低下する (図 1)¹。選択的なシグナル伝達が可能であることは、GPCR が G タンパク質を活性化する構造メカニズムが、アレスチンを活性化するメカニズムと異なっていることを示唆している。本研究では、作動薬結合状態の β_2 AR のマイクロスイッチの構造を解析することで、 β_2 AR が G タンパク質とアレスチンを共に活性化する構造基盤を明らかにすることを目的とした。

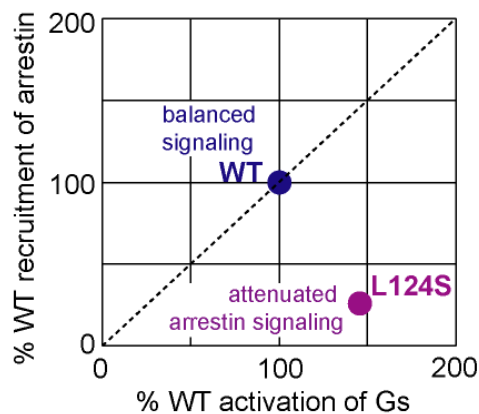


図 1 β_2 AR の L124^{3,43S} 変異に伴う活性の変化¹

【方法・結果】

1. 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、帰属

作動薬結合状態の GPCR には構造多型が存在し、その構造多型が活性に関与していることが示唆されている。そこで本研究では、原子分解能での動的構造情報を取得できる溶液 NMR 法を用いて、マイクロスイッチの動的構造を解析することにした。まずは、それぞれのマイクロスイッチの構造を反映する可能性が高い残基を選出した。M82^{2,53} の側鎖メチル基由来のシグナルの化学シフトは、PIF モチーフの構造変化に伴い変化することが示されている²。また、Y132^{3,51}、Y219^{5,58}、Y326^{7,53} はそれぞれ DRY モチーフ、Y^{5,58}、NPxxY モチーフを構成する残基である。以上の理由から、これらの 4 残基を NMR プローブとして用いることにした。

以上の 4 残基の NMR シグナルを感度良く検出するために、 β_2 AR のメチオニン側鎖メチル基とチロシン主鎖アミド基を、残基内プロトンを重水素化した条件で選択的に標識することにした。

[^2H , ^{15}N]-チロシンと [$\alpha\beta\gamma$ - ^2H , methyl- ^{13}C]-メチオニンを 1 L 培養あたり 100 mg、150 mg 添加することで、共に 80~90%程度標識した $\beta_2\text{AR}$ を発現した。精製した $\beta_2\text{AR}$ の、逆作動薬結合状態と作動薬結合状態について、メチオニン側鎖メチル基 (図 2A) を観測対象とした ^1H - ^{13}C HMQC スペクトルと、チロシン主鎖アミド基 (図 2B) を観測対象とした ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルを測定した。測定したスペクトルのうち、PIF モチーフの構造を反映する M82^{2,53} の側鎖メチル基由来のシグナルを、先行研究²との比較から帰属した (図 2C)。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、それぞれ Y132^{3,51}F、Y219^{5,58}F、Y326^{7,53}F 変異体の NMR スペクトルと野生型のスペクトルを比較することで帰属した (図 2D 左)。

一方で、作動薬結合状態では、チロシンとメチオニンの残基内プロトンのみを重水素化した方法では 3 残基ともシグナルを検出できなかった。そこで、標識方法を変更することによってシグナル強度を上昇させることにした。 α -ヘリックスに存在するアミノ酸のアミドプロトンにとって、1 残基前のアミノ酸のプロトンとの双極子間相互作用は主要な緩和源となる。よって、目的の残基の 1 残基前のアミノ酸を重水素化することで、目的の残基のシグナル強度を選択的に上昇させることができると考えた。まず、Y219^{5,58} の NMR シグナルを検出するために、Y219^{5,58} の 1 残基前のアミノ酸であるバリンを重水素化した試料の NMR スペクトルを測定した。その結果、バリンを重水素化していない試料では検出していなかったシグナルを、バリンの重水素化に伴い新たに 1 個検出した (図 3)。バリンを重水素化した条件の Y219^{5,58}F 変異体を用いた解析により、このシグナルが Y219^{5,58} 由来であることが示された (図 2D 右)。同様の方法で Y326^{7,53} も検出し、帰属した (図 2D 右)。Y132^{3,51} についても同様の解析を行ったが、強度の上昇したシグナルはなかった。よって、Y132^{3,51} は検出が困難であると判断した。

2. 作動薬結合状態の $\beta_2\text{AR}$ の各マイクロスイッチの構造の解析

作動薬結合状態の $\beta_2\text{AR}$ の PIF モチーフは、先行研究²の通り、M82^{2,53} の化学シフトから、オン状態を取ると判断した。一方で、作動薬結合状態の $\beta_2\text{AR}$ の DRY モチーフの Y132^{3,51}、Y^{5,58} の Y219^{5,58}、NPxxY モチーフの Y326^{7,53} 由来のシグナルはいずれも、逆作動薬結合状態のシグナルよりも広幅になっていた。この結果は、作動薬結合状態の $\beta_2\text{AR}$ 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示唆している。

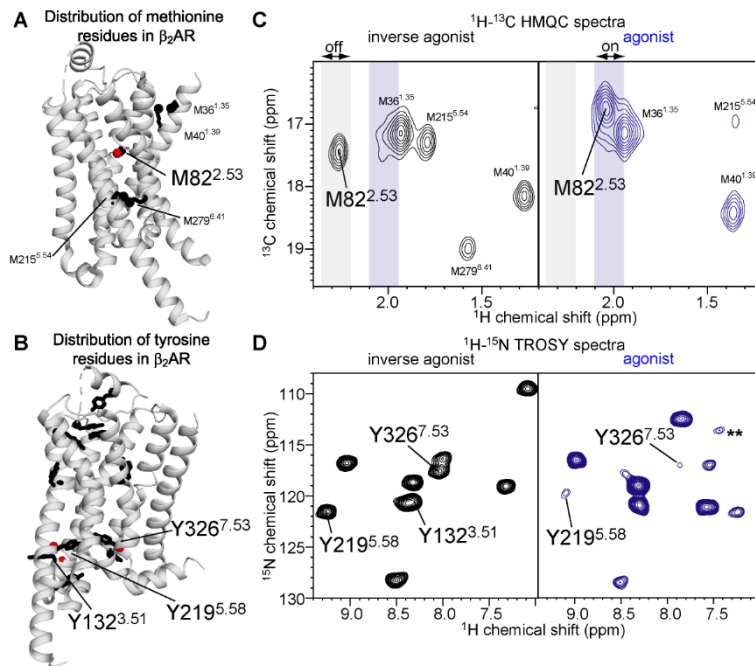


図 2 β_2 AR の NMR プローブの分布と NMR スペクトル

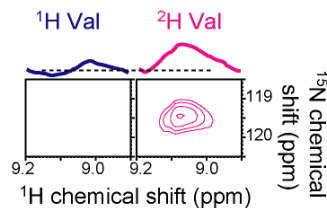


図 3 バリン重水素化に伴い強度が上昇したシグナルの比較

3. アレスチン活性が低下した変異体の各マイクロスイッチの構造の解析

アレスチン活性が低下した L124^{3.43S} 変異体と野生型の活性の違いが、マイクロスイッチの構造の違いにより引き起こされるのかを明らかにするために、L124^{3.43S} 変異体の作動薬結合状態の各プローブ由来のシグナルを、野生型の作動薬結合状態のシグナルと比較した。その結果、L124^{3.43S} 変異体の PIF モチーフの構造を反映する M82^{2.53} 由来のシグナルは、野生型と同様にオン状態の化学シフトを示した (図 4A)。よって、作動薬結合状態の PIF モチーフの構造は、L124^{3.43S} 変異の影響を受けないと判断した。また、L124^{3.43S} 変異体の NPxxY モチーフの Y326^{7.53} 由来のシグナルは検出限界未満まで広幅化した (図 4D)。よって、作動薬結合状態の L124^{3.43S} 変異体の NPxxY モチーフには構造多型が存在すると判断した。一方で、L124^{3.43S} 変異体の DRY モチーフの Y132^{3.51} と Y^{5.58} の Y219^{5.58} 由来のシグナルは、先鋭化に伴い野生型よりもシグナル強度が上昇した (図 4B,C)。この結果は、L124^{3.43S} 変異に伴って、DRY モチーフと Y^{5.58} では、作動薬結合状態の野生型で存在していた構造多型が抑制されていることを示唆している。

L124^{3.43S} 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、ロイシンを、グリシン、またはメチオニンへ置換した変異体の作動薬結合状態について解析した。その結果、Y132^{3.51} と Y219^{5.58} 由来のシグナルはいずれも、L124^{3.43G} 変異体で、L124^{3.43S} 変異体と同様の化学シフトを示した一方で、L124^{3.43M} 変異体では、作動薬結合状態の野生型と同様の化学シフト

を示した (図 4)。今回解析したアミノ酸の側鎖の体積は、メチオニンがロイシンと同程度であるのに対し、グリシンはセリンと同様にロイシンよりも小さい。よって、L124^{3,43} の側鎖の体積を小さくすることによって、DRY モチーフと Y^{5,58} の構造多型が抑制されたと結論した。

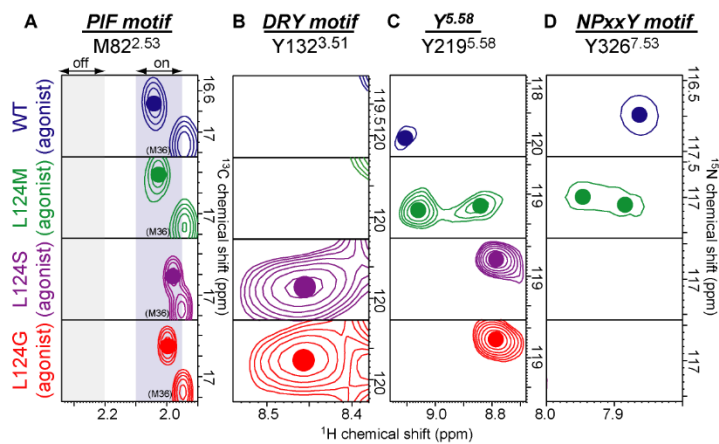


図 4 各マイクロスイッチの構造を検出するプローブ由来のシグナルの比較

【考察】

本研究により、 β_2AR の L124^{3,43} の側鎖の体積を小さくすると DRY モチーフと Y^{5,58} の構造多型が抑制されることが分かった。このことは、L124^{3,43} のかさ高い側鎖が DRY モチーフと Y^{5,58} の構造多型に関与することを示唆している。また本研究により、作動薬結合状態の野生型では DRY モチーフと Y^{5,58} の構造多型が存在するのに対し、アレスチン活性が低下した変異体ではその構造多型が抑制されることが分かった。この結果は、作動薬結合状態の野生型では、DRY モチーフと Y^{5,58} の構造多型が、G タンパク質とアレスチンを共に活性化するのに必要であることを示唆している。以上のことから、作動薬結合状態の β_2AR では、L124^{3,43} のかさ高い側鎖に構造多型が存在することで、DRY モチーフと Y^{5,58} へ構造多型が伝搬したと考えた。このような構造多型の伝搬によって、作動薬結合状態の β_2AR では、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を取るようになったことで、複数のシグナルを活性化するという構造基盤を提唱する (図 5)。

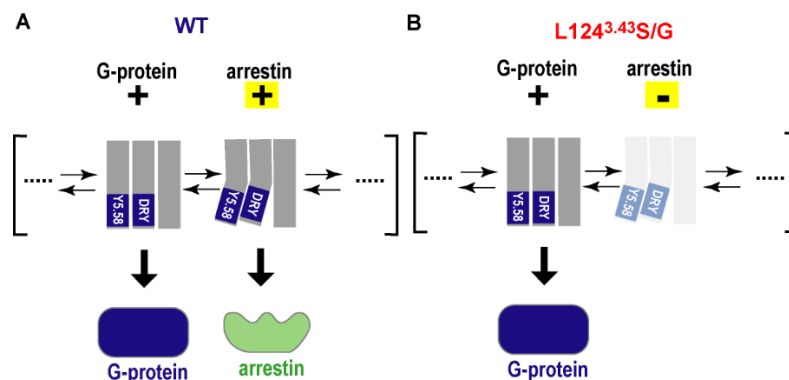


図 5 本研究で提唱する、DRY モチーフや Y^{5,58} による β_2AR のシグナル伝達活性化の構造基盤

【参考文献】 1. Picard *et al*, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* (2019), 2. Kofuku *et al.*, *Nat. Commun.* (2012)