

## 博士論文

論文題目 区分同位体標識を用いた  $\beta_2$ アドレナリン受容体の  
リン酸化によるシグナル制御機構の解明

氏 名 白石 勇太郎

博士論文

区分同位体標識を用いた  $\beta_2$  アドレナリン受容体の  
リン酸化によるシグナル制御機構の解明

東京大学大学院薬学系研究科  
薬科学専攻 生命物理化学教室

指導教員 嶋田 一夫  
平成 25 年度進学 白石 勇太郎

## 略語

ADP	adenosine diphosphate
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride
AMP	adenosine monophosphate
AP-2	adaptor protein-2
AR	adrenergic receptor
ATP	adenosine triphosphate
AU	arbitrary unit
BPB	bromo phenol blue
BRET	bioluminescence resonance energy transfer
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic AMP
CBB	coomassie brilliant blue
CPMG	Carr Purcell Meiboom Gill
DDM	<i>n</i> -dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside
DSS	(3-trimethylsilyl)-propane sulfonic acid sodium salt
DTT	dithiothreitol
ECL	extracellular loop
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EPL	expressed protein ligation
FBS	fetal bovine serum
FCM	flow cytometry
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GDP	guanosine diphosphate
GPCR	G-protein-coupled receptor
GRK	G-protein-coupled receptor kinase
GTP	guanosine triphosphate
HA	hemagglutinin
HDL	high density lipoprotein
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HMQC	heteronuclear multiple-quantum coherence
HSQC	heteronuclear single-quantum coherence
ICL	intracellular loop
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	maltose binding protein
MCS	multiple cloning site
MDM	mouse double minute
MOI	multiplicity of infection
MSP	membrane scaffold protein
MWCO	molecular weight cut-off
N. D.	not determined
NMR	nuclear magnetic resonance

<i>Npu</i>	<i>Nostoc punctiforme</i>
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PDB	protein data bank
PBS	phosphate buffered saline
PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic Acid)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
PRE	paramagnetic relaxation enhancement
psi	pounds per square inch
PTS	protein <i>trans</i> -splicing
PVDF	polyvinylidenefluoride
rHDL	reconstituted HDL
S. D.	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEC	size exclusion chromatography
<i>Ssp</i>	<i>Synechocystis species</i> PCC6803
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCS	transferred cross saturation
TEV	tobacco etch virus
TM	transmembrane
TPPI	time proportional phase incrementation
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TROSY	transverse relaxation optimized spectroscopy
WATERGATE	water suppression by gradient tailored excitation
WB	western blot

## 目次

### 第 1 章 序論

- 1-1. GPCR の生理機能
- 1-2. アレスチンを介したシグナル伝達
- 1-3. アレスチンを介したシグナル伝達の制御機構
- 1-4. リガンド結合に基づくアレスチンを介したシグナルの制御
- 1-5. リン酸化に基づくアレスチンを介したシグナルの制御
- 1-6. 本研究の目的

### 第 2 章 実験方法

- 2-1. 試薬・バッファー・培地の組成
  - 2-1-1. バッファーの組成
  - 2-1-2. 培地の組成
- 2-2. 昆虫細胞
- 2-3. 区分同位体標識を施した  $\beta_2$ AR-rHDL の調製
  - 2-3-1. TM-Int<sub>N</sub> 発現用リコンビナントバキュロウイルスの調製
  - 2-3-2. TM-Int<sub>N</sub> の大量発現
  - 2-3-3. TM-Int<sub>N</sub> の精製
  - 2-3-4. Int<sub>C</sub>-Cterm 発現用プラスミドの構築
  - 2-3-5. Int<sub>C</sub>-Cterm の大量発現
  - 2-3-6. Int<sub>C</sub>-Cterm の精製
  - 2-3-7. Protein *trans*-splicing による TM-Int<sub>N</sub> と Int<sub>C</sub>-Cterm の連結
  - 2-3-8. TEV プロテアーゼの大量発現
  - 2-3-9. TEV プロテアーゼの精製
  - 2-3-10. MSP1 発現用プラスミドの調製
  - 2-3-11. MSP1 の大量発現
  - 2-3-12. MSP1 の精製
  - 2-3-13. 脂質の調製
  - 2-3-14.  $\beta_2$ AR の rHDL 再構成
- 2-4. GRK2 の調製
  - 2-4-1. GRK2 発現用リコンビナントバキュロウイルスの調製
  - 2-4-2. GRK2 の大量発現
  - 2-4-3. GRK2 の精製
- 2-5. GRK2 による  $\beta_2$ AR-rHDL のリン酸化
  - 2-5-1. リン酸化反応
  - 2-5-2. リン酸化速度解析
- 2-6.  $\beta_2$ AR-rHDL の NMR 測定

2-6-1. NMR サンプル

2-6-2. NMR 測定

### 第 3 章 結果

#### 3-1. 区分同位体標識を施した $\beta_2$ AR-rHDL の調製

3-1-1. Protein *trans*-splicing (PTS) を用いた区分同位体標識

3-1-2. PTS 法を利用する為のインテインの選定

3-1-3. インテインを融合した  $\beta_2$ AR コンストラクトの設計

3-1-4. TM-Int<sub>N</sub> の調製

3-1-5. Int<sub>C</sub>-Cterm の精製

3-1-6. *in vitro* PTS 反応による全長  $\beta_2$ AR の調製

3-1-7. rHDL を用いた膜タンパク質の脂質二重膜再構成

3-1-8. TEV プロテアーゼの調製

3-1-9. MSP1 の調製

3-1-10.  $\beta_2$ AR の rHDL への再構成と単離

#### 3-2. GRK2 の調製

#### 3-3. GRK2 による $\beta_2$ AR-rHDL のリン酸化解析

#### 3-4. $\beta_2$ AR-rHDL C 末端領域を観測対象とした NMR 解析

3-4-1.  $\beta_2$ AR-rHDL の NMR シグナルの帰属の指針

3-4-2. Int<sub>C</sub>-Cterm の NMR シグナルの帰属

3-4-3. 非リン酸化状態の  $\beta_2$ AR-rHDL の NMR シグナルの帰属

3-4-4. 非リン酸化状態の  $\beta_2$ AR-rHDL C 末端領域の二次構造

3-4-5. リン酸化状態の  $\beta_2$ AR-rHDL の NMR シグナルの帰属

3-4-6. リン酸化によるスペクトル変化のリガンド依存性

3-4-7. リン酸化状態の  $\beta_2$ AR C 末端領域の二次構造

3-4-8. 側鎖メチル基をプローブとした NMR 解析

3-4-9. T360 メチルシグナルのリン酸化に伴う変化

3-4-10. T360 側鎖メチル基の NMR シグナルのリガンド依存性

### 第 4 章 考察

4-1.  $\beta_2$ AR C 末端領域の区分同位体標識

4-2.  $\beta_2$ AR C 末端領域のリン酸化速度のリガンド依存性

4-3.  $\beta_2$ AR C 末端領域のリン酸化に伴う構造変化

参考文献

謝辞

# 第1章 序論

## 1-1. GPCR の生理機能

Gタンパク質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor, GPCR) は、7回膜貫通型の構造を特徴とする、真核生物における最大の膜タンパク質ファミリーであり、ヒトの遺伝子中で800種類以上が確認されている[1]。ホルモン、神経伝達物質、光、におい物質、味覚物質など、多様なリガンドを受容した上で、細胞内へとシグナルを伝達し、cAMP濃度の調節、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) の活性化などを促すことで、様々な生理応答を誘起する (Fig.1-1(A))。GPCR が介在する生理応答には、細胞増殖、神経疾患、血管新生、代謝疾患、免疫系等、生物学的、病理学的に重要なものが多く含まれている。したがって、GPCR は創薬標的として極めて重要であり、実際に現在市販される医薬品の約1/3は、GPCR を標的としたものとなっている[1] (Fig.1-1 (B))。

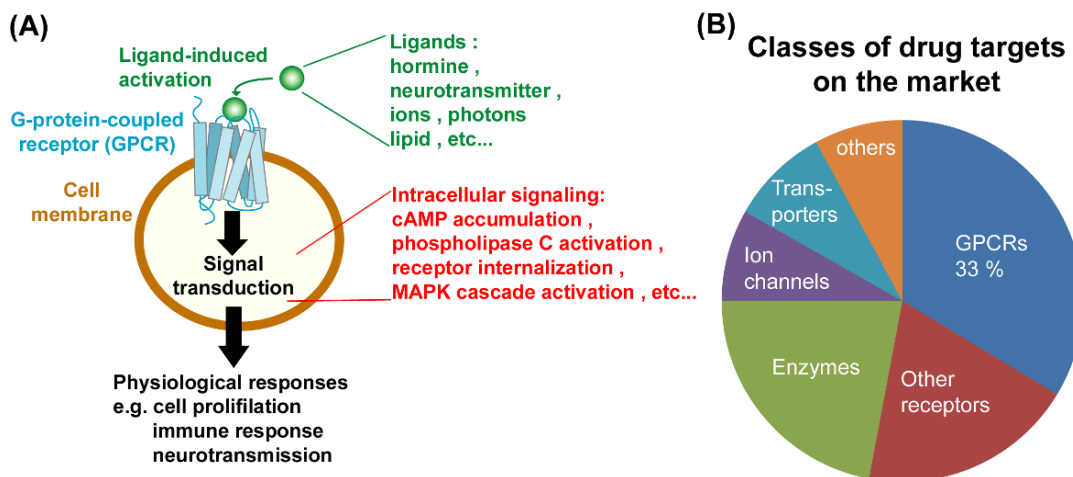


Fig.1-1

(A) GPCR のシグナル伝達

(B) 市販される医薬品が標的とするタンパク質の種類の内訳[1]

## 1-2. アレスチンを介したシグナル伝達

リガンド結合により活性化した GPCR は、共役する G タンパク質の GDP/GTP 交換反応を促進し、G タンパク質を活性化することでシグナルを誘起する。また、この経路とは別に、GPCR キナーゼ (GRK) とアレスチン (arrestin) を介した経路が存在する。この経路ではまず、リガンド結合により活性化した GPCR の細胞内 C 末端領域が、GRK によりリン酸化される。リガンド結合により活性化し、かつリン酸化を受けた GPCR は、アレスチンと結合する。GPCR に結合する事により活性化したアレスチンは、様々な分子の足場タンパク質として機能する事により、G タンパク質を介した経路とは異なるシグナル伝達を達成する[2] (Fig.1-2)。たとえば、クラスリンや AP-2 をリクルートする事により GPCR のインターナリゼーションを誘起する、MAPK 分子群をリクルートすることで MAPK カスケードを促進する、MDM2 と p53 をリクルートすることで p53 のユビキチン化を介した分解を促進する、等の役割が報告されている。

アレスチンを介したシグナル伝達経路は、腫瘍や精神疾患などの疾病への関与が報告されている[3]。したがって、このシグナル伝達がどのように制御されるかを明らかにすることは、GPCR を標的とした創薬開発に貢献する事が期待される。

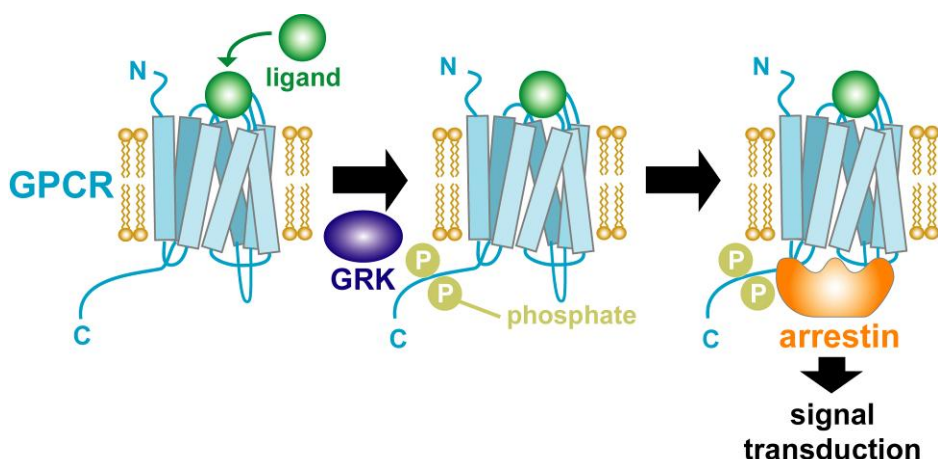
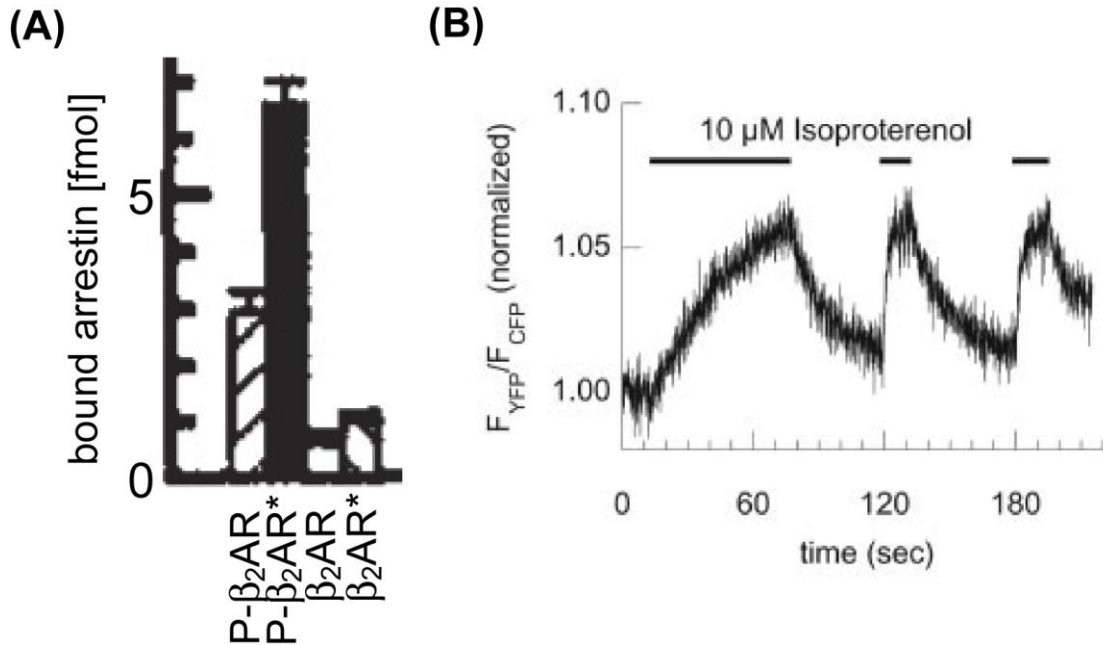


Fig.1-2. アレスチンを介したシグナル伝達の模式図



### 1-3. アレスチンを介したシグナル伝達の制御機構

アレスチンを介したシグナル伝達の制御機構の解明を目指して、様々な解析が行われている。GPCR の一種である、 $\beta_2$  アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ -adrenergic receptor,  $\beta_2$ AR) に対するアレスチンの結合が、リポソームを用いた再構成系[4]や、培養細胞内での分子間 FRET 実験[5]により解析されている。これらの解析の結果より、 $\beta_2$ AR は、リガンドが結合しておらず、リン酸化もされていない場合にはアレスチンと結合しない事、リガンド結合またはリン酸化のいずれか一方のみが生じている場合にはアレスチンと弱く相互作用する事、リガンド結合とリン酸化の両方がなされている際にアレスチンと強く相互作用する事が明らかとなっている (**Fig.1-3**)。これらの知見は、アレスチンを介したシグナル伝達が、GPCR に対するリガンド結合と、GPCR のリン酸化の両方から制御を受ける事を示唆している。



**Fig.1-3**

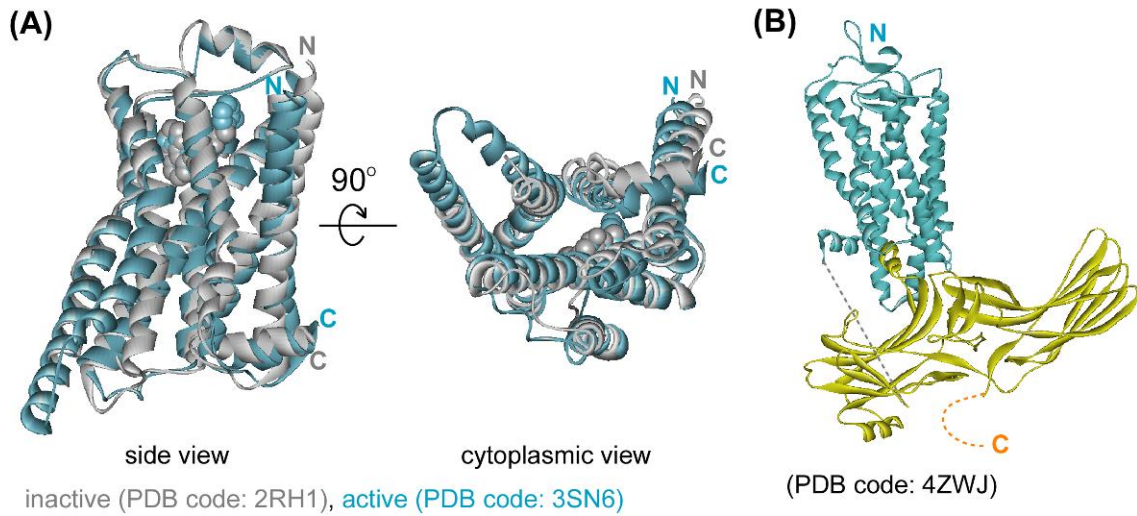
(A) リポソームに再構成した、様々な状態の  $\beta_2AR$  に対する、アレスチンの結合実験([4]より改変)。横軸に  $\beta_2AR$  の状態、縦軸に結合したアレスチンの量を示す。横軸の P の有無はリン酸化の有無を、\*の有無はアゴニスト結合の有無を、それぞれ示す。

(B) HEK293 細胞内における、アゴニスト依存的な  $\beta_2AR$  とアレスチンの結合の分子間 FRET による解析[5]。1 回目のアゴニスト処理では、GRK によるリン酸化の後にアレスチンが結合するため結合速度が遅い一方、2 回目以降のアゴニスト処理では、あらかじめリン酸化が完了しているため結合速度が速い。また、アゴニストを除去する事によりアレスチンはリン酸化された  $\beta_2AR$  から速やかに解離する。

#### 1-4. リガンド結合に基づくアレスチンを介したシグナルの制御

リガンド結合に基づくアレスチンを介したシグナルの制御については、構造生物学的な知見が蓄積されている。GPCR の膜貫通 (transmembrane, TM) ドメインは、7本の膜貫通ヘリックスから構成されており、リガンドは TM ドメインの細胞外側に結合する。結晶構造解析より、GPCR の TM ドメインには、細胞内領域が開いた活性化コンフォメーション[6] (**Fig.1-4 (A)**) と、細胞内領域が閉じた不活性化コンフォメーション[7] (**Fig.1-4 (A)**) が存在すること、Gタンパク質やアレスチンは、活性化コンフォメーションに特徴的な、細胞内領域が開いた構造に対して結合する事が明らかとなっている[8] (**Fig.1-4(B)**)。また、溶液 NMR を用いた解析より、GPCR は活性化コンフォメーションと不活性化コンフォメーションの間の構造平衡にあり、リガンドはこの平衡の割合をシフトさせることによりシグナルを制御する事が明らかとなっている[9] (**Fig.1-5**)。

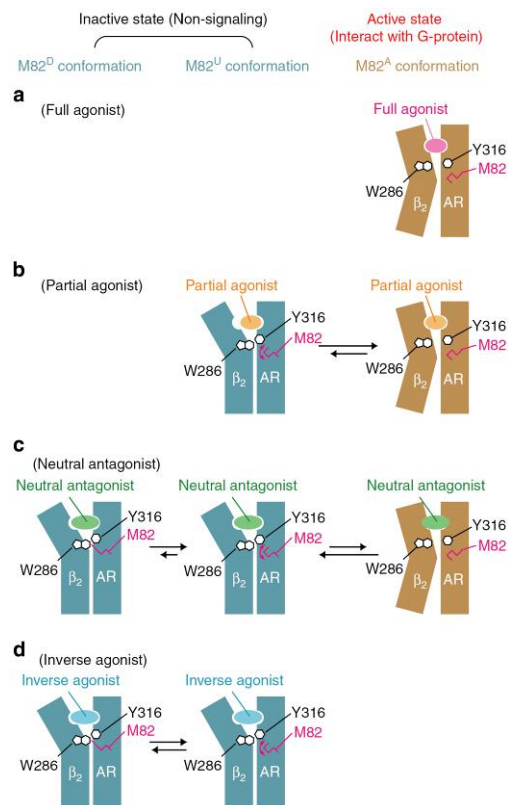
しかしながら、これまでに報告されたロドプシン—アレスチン複合体の結晶構造は、非リン酸化状態のロドプシン構成活性化変異体と、リン酸化非依存的に高親和性でロドプシンに結合するアレスチン変異体の融合コンストラクトで解かれたものである。したがって、この結晶構造解析は、GPCR TMドメインとアレスチンの相互作用様式についての知見を与えているが、GPCR C 末端リン酸化がどのようにしてアレスチン結合に寄与するのかは不明である。



**Fig.1-4**

(A)  $\beta_2$ AR の不活性化コンフォメーション[7] (灰、PDB code: 2RH1、分解能 2.4 Å)、活性化コンフォメーション[6] (シアン、PDB code: 3SN6、分解能 3.2 Å) の結晶構造の重ね合わせ。タンパク質部分をリボン表示で、低分子リガンド (carazolol: 灰、BI-167107: シアン) をCPK表示で示した。

(B) ロドプシン—アレスチン複合体の結晶構造[8] (PDB code: 4ZWJ、分解能 3.3~3.8 Å)。ロドプシンをシアン、アレスチンを黄色で示した。

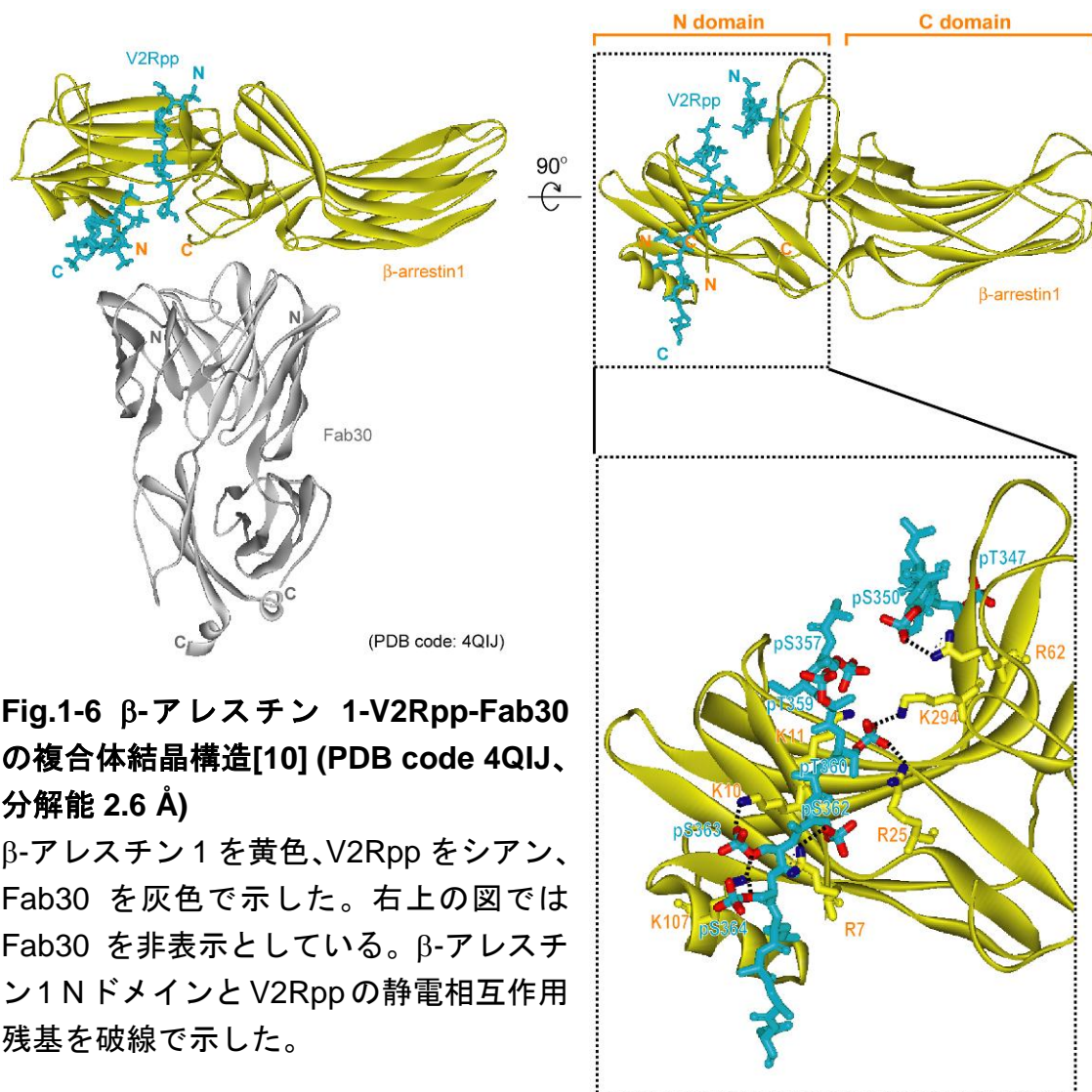


**Fig.1-5  $\beta_2$ AR の構造平衡[9]**

$\beta_2$ AR は不活性化コンフォメーションと活性化コンフォメーションの構造平衡にある。リガンドはこの平衡の存在割合を変化させる。活性化コンフォメーションの割合が下流のシグナル伝達の強度を規定する。

## 1-5.リン酸化に基づくアレスチンを介したシグナルの制御

GPCR C 末端領域のリン酸化がアレスチン結合にどのように関わっているかを調べるために、GPCR の一種であるバソプレシン V2 受容体の C 末端配列を模倣したリン酸化ペプチド (V2Rpp)、 $\beta$ -アレスチン 1、 $\beta$ -アレスチン 1 の活性化構造認識抗体フラグメント (Fab30) の複合体結晶構造解析が行われている[10]。この結晶構造より、 $\beta$ -アレスチン 1 の Nドメインに分布する塩基性残基の側鎖と、V2Rpp のリン酸基が静電相互作用を形成する事が明らかとなった (Fig.1-6)。



一方で、リン酸化を介したシグナル伝達は、リン酸基の有無のみでなく、リン酸化の部位に応じて制御を受ける事が示唆されている。 $\beta_2$ AR C 末端領域には、合計 11 個のセリン・スレオニン残基が分布しており、このうち 8 残基が GRK によりリン酸化を受ける事が明らかとされている[11] (Fig.1-7)。また、変異体を用いたシグナル伝達アッセイの結果から、 $\beta_2$ AR C 末端領域の TMドメインに一次配列上近接する 4 残基のセリン・スレオニン残基を除去した場合には、野生型と比較してアレスチンを介したインターナリゼーションが顕著に抑制される一方で、TMドメインから離れた 7 残基のセリン・スレオニン残基を除去しても、アレスチンを介したインターナリゼーションは野生型と同等に誘起される事が報告されている[12] (Fig.1-8)。さらに、 $^{19}\text{F}$  標識を施した  $\beta$ -アレスチン 1 の NMR 解析において、リン酸化  $\beta_2$ AR C 末端領域の部分配列ペプチドを添加すると、NMR シグナルに変化が生じる事、変化のパターンが添加する部分配列ペプチドの種類に応じて変化する事が報告されている[13]。以上の知見から、アレスチンシグナルは、「GPCR がリン酸化されているか否か」のみでなく、「GPCR のどの部位がリン酸化を受けているか」により制御される事が示唆される。

しかしながら、GPCR C 末端には、GRK によりリン酸化を受けるコンセンサス配列や、アレスチンとの結合に必須なモチーフが異なる GPCR 間で保存されていない (Fig.1-9)。したがって、リン酸化される部位に応じてシグナル伝達が制御される機構を、一次配列から説明する事は困難である。また、アレスチンと GPCR C 末端の相互作用の構造生物学的解析は、全て GPCR C 末端を切り出したペプチドで行われており、全長 GPCR において、C 末端領域がどのような構造をとることでアレスチンシグナルを制御するかは明らかでない。したがって、リン酸化がどのようにしてアレスチンシグナルを制御するかを明らかとするためには、全長 GPCR を解析対象として、その C 末端領域のリン酸化に伴う高次構造・運動性の変化を解析する必要があると考えた。

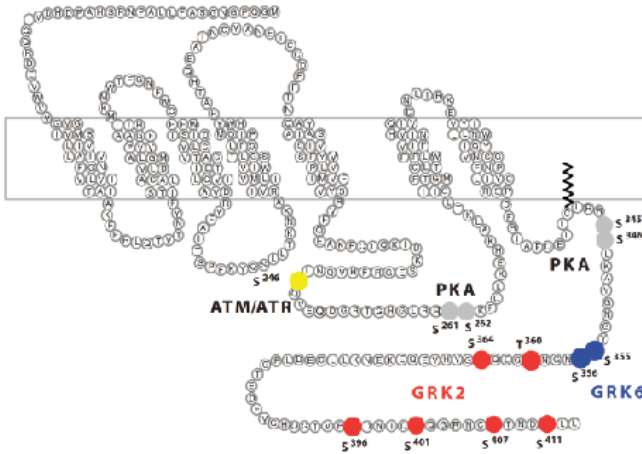


Fig.1-7  $\beta_2$ AR のリン酸化部位 [11]

$\beta_2$ AR のスネークプロット上で、質量分析により明らかとなった被リン酸化残基を示す。赤は GRK2、青は GRK6、灰は PKA、黄色は ATM/ATR により主にリン酸化される。

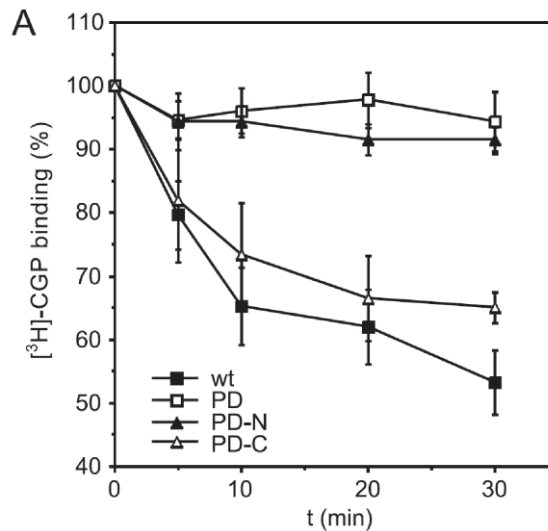


Fig.1-8 HEK293 細胞に発現させた  $\beta_2$ AR 変異体のリガンド依存的なインターナリゼーション[12]

横軸にアゴニスト添加後のインキュベート時間、縦軸に細胞表面に発現した  $\beta_2$ AR の量を示す。

wt: 野生型

PD:

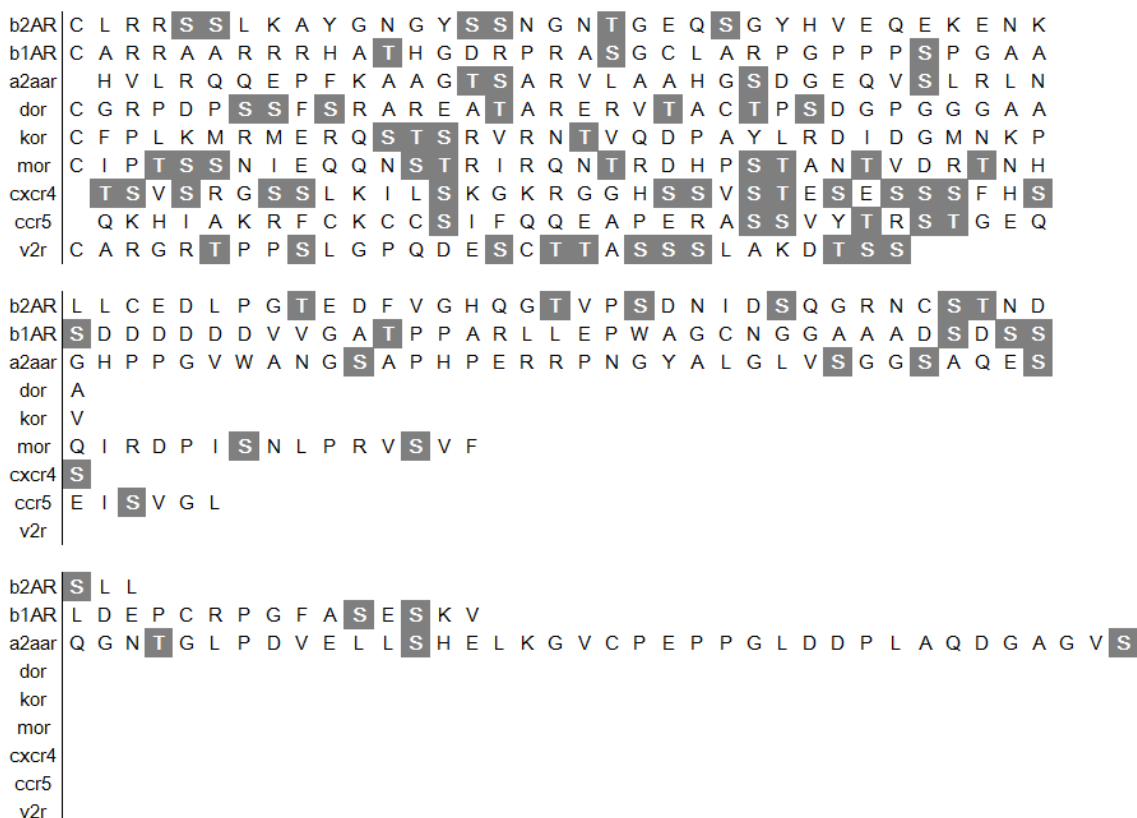
S355A/S356G/T360A/S364G/T384A/T393A/S396G/S401A/S407G/T408A/S411

A 変異体

PD-N: S355A/S356G/T360A/S364G 変異体

PD-C: T384A/T393A/S396G/S401A/S407G/T408A/S411A 変異体





**Fig.1-9 様々な GPCR C 末端領域の一次配列の比較**  
セリン・スレオニン残基をグレーで色付けして示した。

## 1-6. 本研究の目的

本研究では、GPCR の C 末端領域のリン酸化が、アレスチンを介したシグナル伝達をどのように制御しているかを明らかとする事を目的とした。これを明らかとするために、 $\beta_2$ AR を解析対象として、溶液 NMR 法を用いて C 末端領域の構造・運動性をリン酸化の前後で解析を行った。 $\beta_2$ AR C 末端領域のリン酸化の影響を高次構造、運動性の観点でとらえることで、リン酸化がアレスチンを介したシグナル伝達にどのような役割を有しているかを考察した。



## 第 2 章 実験方法

2-3-8. で使用した、N 末端に MBP (maltose binding protein) tag、TEV protease cleavage site、H<sub>6</sub> タグを付加した TEV プロテアーゼをコードした発現用プラスミドが形質転換された BL21 (DE3) codon plus RIL のグリセロールストックは、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 湊 雄一 博士が Addgene (<http://www.addgene.org/>) から配布された菌体をもとに調製したものをを用いた。

2-3-10. で使用した、N 末端に H<sub>7</sub> タグ、TEV protease cleavage site を付加した MSP1E3 の発現用プラスミドは、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 町山 麻子 修士が DNA 全合成により調製したものをを用いた。

2-4-1. で使用した、ヒト由来 GRK2 をコードするエンタリークローンは、Nite Biological Research Center (<http://www.nite.go.jp/en/nbrc/>) より分譲を受けたものをを用いた。

## 2-1. 試薬・バッファー・培地の組成

特に断らない限り試薬は全て和光純薬、Sigma-Aldrich、またはナカライテスクより購入した。

### 2-1-1. バッファー組成

#### PBS (-)

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### buffer A

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.3 μM aprotinin,  
30 μM pepstatin A (ペプチド研究所), 20 μM leupeptin (ペプチド研究所),  
28 μM E-64 (ペプチド研究所), 1 mM AEBSF, 0.1 mM alprenolol,  
0.1 mM TCEP

#### buffer B

50 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 1 M NaCl, 20 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>,  
20 μM leupeptin (ペプチド研究所), 28 μM E-64 (ペプチド研究所),  
1 mM AEBSF, 0.1 mM alprenolol, 0.1 mM TCEP

#### buffer C

20 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 150 mM NaCl, 20 % (w/v) glycerol,  
20 μM leupeptin (ペプチド研究所), 28 μM E-64 (ペプチド研究所),  
1 mM AEBSF, 0.1 mM TCEP

buffer D

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA,  
20  $\mu$ M leupeptin (ペプチド研究所), 28  $\mu$ M E-64 (ペプチド研究所),  
1 mM AEBSF, 0.1 mM TCEP, 0.1 % DDM

buffer E

20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl

buffer F

50mM NaPi (pH 8.0), 200 mM NaCl, 10 % glycerol

buffer G

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 100 mM KCl

buffer H

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT

buffer I

20 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 150 mM NaCl

buffer J

20 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 250 mM NaCl, 0.02 % Triton-X100

buffer K

20 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 200 mM NaCl, 2 mM EDTA

buffer L

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM TCEP

buffer M

20 mM PIPES-NaOH (pH 6.8), 0.5 mM EDTA,  
20 μM leupeptin (ペプチド研究所), 28 μM E-64 (ペプチド研究所),  
0.1 mM AEBSF, 0.1 mM TCEP, 10 % D<sub>2</sub>O (CIL)

mobile phase A

H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA

mobile phase B

acetonitrile

## 2-1-2. 培地の組成

### LB 培地

Yeast Extract	5.0 g
Trypton	10.0 g
NaCl	5.0 g

以上を H<sub>2</sub>O 1 L に溶解

### TB 培地

Yeast Extract	24 g
Trypton	12 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.2 g
glycerol	8 mL

以上を H<sub>2</sub>O 1 L に溶解

### 均一 <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N 標識 M9 培地

12.9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.5 g NaCl

1 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (99.7 % <sup>15</sup>N, 昭光通商)

2 g <sup>2</sup>H<sub>7</sub>-glucose (98 % <sup>2</sup>H, CIL)

2 mL 1 M MgSO<sub>4</sub> (in 99.8 % D<sub>2</sub>O)

0.1 mL 0.1 M CaCl<sub>2</sub> (in 99.8 % D<sub>2</sub>O)

1 mL 4 % thiamine (in 99.8 % D<sub>2</sub>O)

1 mL 3.5 mg/mL FeCl<sub>3</sub> (in 99.8 % D<sub>2</sub>O)

5 mL 0.24 mg/mL biotin (in 99.8 % D<sub>2</sub>O)

以上を 1 L D<sub>2</sub>O (ISOTECH) に溶解

均一 <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N 標識 M9 培地

均一 <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N 標識 M9 培地の <sup>2</sup>H<sub>7</sub> glucose を <sup>2</sup>H<sub>7</sub>, <sup>13</sup>C<sub>6</sub> glucose (CIL) に置換。

TNM-FH 培地

500 mL Grace's Insect Cell Medium Supplemented (GIBCO)

50 mL Fetal Bovine Serum (GIBCO)

5 mL Pluonic F68 (GIBCO)

2.5 mL Antibiotics-antimycotics (GIBCO)

Sf-900II 培地

1000 mL Sf-900II (GIBCO)

## 2-2. 昆虫細胞

TNM-FH 培地を用いて 27 °C にて培養された Sf9 細胞 (Invitrogen) および Sf-900II 培地を用いて 27 °C にて培養された expresSF+細胞 (Protein Science , 以降 SF+細胞) を用いた。

## 2-3. 区分同位体標識を施した $\beta_2$ AR-rHDL の調製

### 2-3-1. TM-Int<sub>N</sub> 発現用リコンビナントバキュロウイルスの調製

$\beta_2$ AR の残基番号 1-348 (E122W/N187E/C265A 変異を含む) に対して、N 末端側に HA シグナル配列と FLAG タグ、C 末端側に *Npu/Ssp* DnaE  $\Delta$ C15 を付加したコンストラクト (= TM-Int<sub>N</sub>) の遺伝子配列を、pFastBac1 ベクター (Thermo Fisher Scientific) の multiple cloning site (MCS) に組み込んだプラスミドを調製した。目的遺伝子が正しく組み込まれている事を、ABI PRISM 3130xl (applied biosystems) により配列を読むことで確認した。

調製したプラスミドを *Escherichia Coli*. DH10Bac (Thermo Fisher Scientific) へ形質転換し、50 mg/L カナマイシン、7 mg/L ゲンタマイシン、10 mg/L テトラサイクリン、0.2 mM IPTG、200 mg/L Bluo-Gal を添加した LB 寒天培地へ播いて、37 °C、24 時間培養した。bacmid への目的遺伝子の組み換えが起こっている白色コロニーを単離し、50 mg/L カナマイシン、7 mg/L ゲンタマイシン、10 mg/L テトラサイクリンを添加した LB 培地 5 mL で 37 °C、12 ~ 16 時間振蕩培養した。培養液 2.5 mL 分の菌体を 5,000 rpm、5 分遠心する事により回収し、イソプロパノール沈殿により bacmid DNA を抽出した。抽出した bacmid DNA に目的遺伝子が組み込まれている事を、PCR 法およびアガロースゲル電気泳動法により確認した。

調製した bacmid DNA を Cellfectin II (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Sf9 細胞へトランスフェクションし、27 °C、72 時間静置培養した。培養液を 4,000 g、10 分間の遠心し、上清を P-1 ストックとして回収した。回収した P-1 ストック を Sf9 細胞へと感染させ、27 °C、96 時間培養した。培養液を 4,000 g、10 分間の遠心し、上清を P-2 ストックとして回収した。回収した P-2 ストックを Sf9 細胞へと感染させ、27 °C、72 時間培養した。4,000 g、10 分間の遠心し、上清を P-3 ストックとして回収した。

調製した P-3 ストックの titer を以下のようにして算出した。細胞密度  $2 \times 10^6$  cells/mL とした SF+細胞 50 mL 培養分に対し、調製した P-3 ストック 200  $\mu$ L を添加して、27 °C、130 rpm で 16 ~ 18 時間振蕩培養した。培養液 400  $\mu$ L 分の細胞を 1,800 rpm、3 分間遠心することで回収し、0.05 % (w/v) BSA と 1  $\mu$ g/mL Anti Baculovirus Envelope gp64 protein PE (eBioScience) を添加した PBS (-) 200  $\mu$ L で懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。600  $\mu$ L の PBS (-) を添加して懸濁した後に、1,800 rpm、3 分間遠心して上清を除去し、800  $\mu$ L の PBS (-) で再度懸濁した後に 1,800 rpm、3 分間遠心して上清を除去した。その後、0.05 % (w/v) BSA を添加した PBS (-) で懸濁し、この細胞懸濁液を EASYstrainer<sup>TM</sup> 40  $\mu$ m (greiner) でろ過したものを CytoFLEX (Beckman Coulter) を用いた FCM 解析に供して、PE positive の細胞の割合を MOI とした。解析には、CytExpert 1.0 (Beckman Coulter) を用いた。算出された MOI に細胞密度と培養液量を乗じ、添加した P-3 ストックの体積で除することで P-3 ストックの titer を算出した。

### 2-3-2. TM-Int<sub>N</sub> の大量発現

250 mL の Erlenmeyer フラスコ (Corning) にて培養している SF+細胞を、細胞密度  $\sim 1.0 \times 10^6$  cells/mL、培養液量 1 L となるように 20 L cellbag (GE) に播種し、Xuri Cell Expansion System W25 (GE) に接続して、27 °C、rocking angle 5°、rocking speed 15 rpm、通気量 0.2 L/min、O<sub>2</sub> 濃度 20 ~ 25 % で培養した。培養開始 2~3 日目に血球計算盤を用いて細胞密度をカウントし、 $\sim 5 \times 10^6$  cells/mL となった時点で Sf-900II SFM 培地 3 L を加え、27 °C、rocking angle 5°、rocking speed 20 rpm、通気量 0.2 L/min、O<sub>2</sub> 濃度 25 ~ 30 % でさらに培養した。スケールアップから 2~3 日後に血球計算盤を用いて細胞密度をカウントし、 $\sim 5 \times 10^6$  cells/mL となった時点で 2-3-1. にて調製した TM-Int<sub>N</sub> の発現用リコンビナントバキュロウイルス P-3 ストックを MOI  $\sim 5$  となるよ



うに添加し、培養液量が 10 L となるように Sf-900IISFM を添加した。この際、alprenolol を終濃度 1  $\mu$ M、E-64 を終濃度 5 mg $\cdot$ L となるように同時に添加した。その後、27  $^{\circ}$ C、rocking angle 5 $^{\circ}$ 、rocking speed 27 rpm、通気量 0.2 L/min、O<sub>2</sub> 濃度 35 % で 48 時間培養を行った。培養液を 800 g、10 分遠心する事により細胞を回収し、培養液上清を除去した上で、液体窒素にて瞬間凍結を行い、精製に供するまでの間- 80  $^{\circ}$ C で保存した。

### 2-3-3. TM-Int<sub>N</sub> の精製

以下の操作は、特に断らない限り氷上または 4  $^{\circ}$ C で行った。

2-3-2.にて凍結保存した細胞を解凍し、細胞 1 L 培養分当たり 100 mL の buffer A で懸濁した。細胞懸濁液を氷冷した窒素ガス細胞破砕機 (Parr) に添加し、窒素ガスを 600 psi となるように封入して 30 分間静置した後に、アウトレットバルブから細胞懸濁液を回収することで、細胞の破砕を行った。細胞破砕液を 800 g、10 分間遠心し、上清を再度 800 g、10 分間遠心することで未破砕細胞と細胞片を除去した。その後、142,000 g、40 分間遠心して沈殿を膜画分として取得した。この膜画分を 1 L 培養分当たり 20 mL の buffer B で懸濁した後、再度 142,000 g、40 分間遠心して沈殿を取得する操作を 2 回繰り返すことで洗浄した。洗浄した沈殿を 1 L 培養分当たり 20 mL の 0.1 mM alprenolol を添加した buffer C で懸濁し、液体窒素にて瞬間凍結を行い、その後の精製に供するまでの間-80  $^{\circ}$ C で保存した。

膜画分懸濁液を解凍し、buffer C を液量が 1 L 培養分当たり 25 mL となるように添加した上で、DDM を終濃度 1 % (w/v) となるように添加して、3 時間ゆるやかに攪拌することで可溶化を行った。142,000 g、30 分間遠心を行い、上清を再度 142,000 g、30 分間遠心することで不溶物を除去した。これに CaCl<sub>2</sub> を終濃度 10 mM となるように添加した上で、1 % DDM と 10 mM CaCl<sub>2</sub> を添加した buffer C により平衡化した

ANTI-FLAG M1 Affinity Agarose Gel (SIGMA) 8 mL と混合した。2 時間バッチ法によりレジンの目的タンパク質の吸着を行った後、500 g、10 分間遠心することでレジンを回収した。上清を除去し、1 % DDM、3 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1 mM alprenolol を添加した buffer C 40 mL でレジンを懸濁し、直径 3 cm のエコノカラム (BioRad) へとアプライした。レジンを 1 % DDM、3 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1 mM alprenolol を添加した buffer C 40 mL で洗浄した後、0.1 % DDM、3 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1 mM alprenolol を添加した buffer C 80 mL でさらに洗浄した。その後、5 mM EDTA、0.2 mg/mL DYLKDDDDDK peptide、0.1 mM alprenolol を添加した buffer C を 6 mL、10 mL、4 mL の順で流して分取する事により、目的タンパク質の溶出を行った。目的タンパク質の溶出は、精製の各フラクションをアクリルアミド濃度 15 % のゲルを用いた SDS-PAGE に供し、ゲルを CBB により染色することで確認した。

上で得られた 10 mL の溶出画分を、Millex GV (Millipore) に通して不溶物を除去した上で、Superose 6 10/300 GL (GE) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。AKTA purifier (GE)、AKTA explorer (GE)、または AKTA pure (GE) に接続し、buffer D で平衡化した Superose 6 10/300 GL (GE) に対し、2 mL のサンプルをアプライし、流速 0.5 mL/min で精製を行った。280 nm の吸光度を指標に目的タンパク質の溶出を確認した。溶出体積 15 mL ~ 18 mL の画分を回収し、この画分に終濃度 10 μM の formoterol (Toronto Research Chemicals) を添加した。この操作を 5 回に分けて行う事で全てのサンプルを精製し、これを Amicon Ultra 4, MWCO 30K (Millipore) を用いた限外濾過により~1.5 mL まで濃縮して、後の PTS 反応に用いた。

#### 2-3-4. Int<sub>C</sub>-Cterm の発現用プラスミド構築

β<sub>2</sub>AR の残基番号 349-413 (A349C/C378AQ/C406A 変異を含む) の N 末端側に、H<sub>6</sub> タグ、Ssp DnaE<sub>C15</sub> を付加したコンストラクト (= Int<sub>C</sub>-Cterm) の遺伝子配列を、

pRSF 1-b ベクター (Novagen) の MCS に組み込んだプラスミドを調製した。目的遺伝子が正しく組み込まれている事を、ABI PRISM 3130xl (applied biosystems) により配列を読むことで確認した。Int<sub>C</sub>-Cterm の各種変異体は、全て Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) または Quikchange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) により作製し、目的の変異が導入されている事を ABI PRISM 3130xl (applied biosystems) により配列を読むことで確認した。

### 2-3-5. Int<sub>C</sub>-Cterm の大量発現

2-3-4.で調製した Int<sub>C</sub>-Cterm 発現用プラスミドを *Escherichia Coli*. ER2566 (New England Biolabs) へ形質転換し、50 mg/L カナマイシンを含む LB 寒天培地へ播いて 37 °C で終夜培養した。得られたコロニー5 個を 5 mL の 50 mg/L カナマイシンを含む LB 培地へ播種し、37 °C、200 rpm、8 時間振蕩培養した。培養液を 4 °C、3,500 rpm、15 分間遠心することで菌体を回収し、50 mg/L カナマイシンを含む均一<sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N 標識 M9 培地または均一<sup>2</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N 標識 M9 培地 100 mL へ懸濁して、37 °C、140 rpm で 12 ~ 16 時間培養した。その後、培養液に均一<sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N 標識 M9 培地または均一<sup>2</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N 標識 M9 培地 150 mL を添加して、37 °C、135 rpm で培養を続け、OD<sub>600</sub> ~ 0.8 の時点で IPTG を終濃度 1 mM となるように添加することで目的タンパク質の発現を誘導し、さらに 6 時間培養を行った。Thy2/Ileδ1-<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub> 標識を施す際には、均一<sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N 標識 M9 培地で培養を行い、発現誘導の 1 時間前にα,<sup>β</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>, γ2-<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub> スレオニン、<sup>2</sup>H-グリシン、<sup>2</sup>H-ketobutyric acid (全て NMRBio) をそれぞれ終濃度 50 mg/L、100 mg/L、50 mg/L となるように添加した。培養後、菌体を 4 °C、7,000 rpm、15 分間遠心することで回収し、30 mL の buffer E で懸濁した。懸濁液を液体窒素により瞬間凍結した上で、精製に供するまでの間 -80 °C で保存した。

### 2-3-6. Int<sub>C</sub>-Cterm の精製

以下の操作は、特に断らない限り全て室温で行った。

2-3-5.にて調製した菌体懸濁液を氷上で解凍し、Protease Inhibitor Cocktail (ナカライ) を添加した上で、超音波破碎により菌体を破碎した。菌体破碎液を 4 °C、100,000 g、1 時間遠心し、上清に DTT を終濃度 2 mM となるように添加した後に、Acrodisc Syringe Filter 0.45 mm Supor Membrane (PALL) を通すことで不溶物を除去した。これを、HisTrap HP 1 mL (GE) を用いたアフィニティー精製に供した。AKTA explorer に接続し、buffer E で平衡化した HisTrap HP 1mL (GE) に対してサンプルをアプライし、イミダゾール濃度を 25 mM として 5 mL のバッファーで洗浄を行った後に、イミダゾール濃度を 20 mL の間に 25 mM から 190 mM まで上昇させるリニアグラディエントをかけることにより目的タンパク質を溶出させた。精製の流速を 1 mL/min とし、目的タンパク質の溶出は 280 nm の吸光度と溶出画分の SDS-PAGE 解析により確認した。

上で得られた溶出画分を Amicon Ultra 15, MWCO 3K (Millipore) を用いた限外濾過により 1 mL まで濃縮し、DTT を終濃度 10 mM となるように添加して、室温で 2 時間インキュベートした。その後、mobile phase A 4 mL で希釈した上で Millex GV (Millipore) に通して不溶物を除去し、逆相 HPLC 精製に供した。Prominence HPLC system (島津製作所) に連結した YMC-Pack ODS AM-323 (YMC) を mobile phase A で平衡化した上で、サンプルをアプライし、mobile phase B の濃度を 60 分間で 20 % から 30 % まで上昇させるリニアグラディエントをかけることで目的タンパク質を溶出させた。精製の流速を 2 mL/min とし、目的タンパク質の溶出は 280 nm の吸光度より確認した。精製後のサンプルを凍結乾燥し、再度 H<sub>2</sub>O 5 mL に溶解して、1 M NaOH を適量添加することで pH を ~7.5 に調整し、280 nm の吸光度を用いて定量を行った。モル吸光係数には 4,470 M<sup>-1</sup>・cm<sup>-1</sup> を用いた。その後、再度凍結乾燥を行い、後の PTS 反応に

用いた。

### 2-3-7. Protein *trans*-splicing (PTS) による TM-Int<sub>N</sub> と Int<sub>C</sub>-Cterm の連結

2-3-3.にて調製した TM-Int<sub>N</sub> 溶液により、2-3-6.にて調製した Int<sub>C</sub>-Cterm の凍結乾燥標品を溶解し、TCEPを終濃度 0.5 mM となるように添加して、25 °C でインキュベートする事により PTS 反応を行った。TM-Int<sub>N</sub> の終濃度を~5 μM、Int<sub>C</sub>-Cterm の終濃度を 35 μM とした。反応開始から 6 時間の時点でサンプルを氷上へ移し、反応液をその後の rHDL 再構成へ用いた。

### 2-3-8. TEV プロテアーゼの大量発現

N 末端に MBP (maltose binding protein) タグ、TEV プロテアーゼ切断配列、H<sub>6</sub> タグを付加した TEV プロテアーゼ S291V 変異体の遺伝子配列が組み込まれた発現用プラスミドが形質転換された *Escherichia Coli* BL21 (DE3) codon plus RIL のグリセロールストックを、100 mg/L アンピシリンを添加した LB 培地 20 mL へ播種し、37 °C、200 rpm で 12 ~16 時間培養した。菌体を 4 °C、3,000 rpm、15 分間遠心して回収し、100 mg/L アンピシリン、0.2 % グルコースを添加した LB 培地 1 L に移して 37 °C、105 rpm で培養した。OD<sub>600</sub> = 0.5~0.7 で IPTG を終濃度 1 mM となるように添加する事で発現誘導した後、30 °C、105 rpm で 6 時間培養した。培養液を 4 °C、7,000 rpm、15 分間遠心することで菌体を回収し、25 mL の buffer F で懸濁した。菌体懸濁液を液体窒素により瞬間凍結した上で、精製に供するまでの間 -80 °C で保存した。

### 2-3-9. TEV プロテアーゼの精製

以下の操作は、特に断らない限り全て氷上または 4 °C で行った。

菌体懸濁液を解凍し、超音波破碎した。菌体破碎液にポリエチレンイミンを終濃度 0.2 % となるように添加した後、100,000 g、1 時間遠心し、上清を取得した。1 L 培養分当たり 5 mL の HIS-Select (SIGMA) を直径 3 cm のエコノカラム (BioRad) に充填し、buffer F で平衡化を行った後、遠心上清を添加することで目的タンパク質をレジンへ吸着させた。100 mL の buffer F、100 mL の 20 mM イミダゾールを添加した buffer F で順次洗浄した後、25 mL の 200 mM イミダゾールを添加した buffer F で目的タンパク質を溶出させた。

溶出液を Millex GV (Millipore) に通して不溶物を除去し、HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade (GE) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。AKTA purifier (GE) もしくは AKTA explorer に接続し、buffer F により平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) に、溶出液 10 mL アプライして、流速 1.0 ~ 1.5 mL で精製を行った。280 nm の吸光度および各溶出画分の SDS-PAGE 解析より目的タンパク質の溶出を確認した。

目的タンパク質が溶出した画分を回収し、Amicon Ultra 15, MWCO 10K (Millipore) を用いた限外濾過により ~5 mg/mL まで濃縮した。収量を 280 nm の吸光度を測定することで計算し、モル吸光係数には  $32,290 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を用いた。

### 2-3-10. MSP1 発現用プラスミドの調製

N 末端に H<sub>7</sub> タグ、TEV protease cleavage site を付加した MSP1E3 の発現用プラスミドを鋳型として、残基番号 56 番から 121 番の残基で形成されている  $\alpha$ -ヘリックスを QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) により欠失させる事で目的のプラスミドを得た。変異が正しく導入されている事を、ABI PRISM 3130xl (applied biosystems) で配列を読む事で確認した。

### 2-3-11. MSP1 の大量発現

MSP1 の発現用プラスミドを *Escherichia Coli* BL21 (DE3) に形質転換し、100 mg/L アンピシリンを添加した LB 寒天培地に播いて、37 °C、12~16 時間インキュベートした。コロニー 3 個を 100 mg/L アンピシリンを添加した LB 培地 10 mL に播種し、37 °C で 12~16 時間行った。培養液を 100 mg/L アンピシリンを添加した TB 培地 1 L に加え、37 °C、105 rpm で培養した。OD<sub>600</sub> = 2.0~2.5 の時点で IPTG を終濃度 1 mM となるように添加する事で発現誘導した後、37 °C、105 rpm で 2 時間培養した。菌体を 4 °C、7,000 rpm、15 分間遠心して回収し、1 L 培養当たり 25 mL の buffer G で懸濁した。菌体懸濁液を液体窒素により瞬間凍結し、精製に供するまでの間-80 °C で保存した。

### 2-3-12. MSP1 の精製

以下の操作は、特に断らない限り全て氷上または 4 °C で行った。

菌体懸濁液を氷上で解凍し、protease inhibitor cocktail (ナカライ) を添加して、超音波破碎した。菌体破碎液を 20,000 g、30 分間遠心して、沈殿を 1 L 培養当たり 50 mL の 1 % Triton-X100 を添加した buffer G で懸濁した。懸濁液を 100,000 g、1 時間遠心した。1 L 培養当たり 10 mL の HIS-Select (SIGMA) を直径 3 cm のエコノカラムに充填し、buffer G で平衡化した上で、遠心上清を添加して目的タンパク質を吸着させた。素通り画分をさらに 2 回カラムへアプライした後に、200 mL の 1 % Triton-X100 を添加した buffer G、200 mL の 50 mM コール酸ナトリウムを添加した buffer G、50 mL の buffer G、50 mL の 20 mM イミダゾールを添加した buffer G で順次洗浄した後、50 mL の 200 mM イミダゾールを添加した buffer G で目的タンパク質を溶出させた。これを MWCO 10 K の透析膜 (Spectra) を用いて、1 L の buffer H に対して 4 時間透析し、透析外液を新しい 1 L の buffer H に交換するとともに、サンプルに

2-3-9.にて調製した TEV プロテアーゼを 1 L 培養分当たり 1 mg 添加してさらに 1 日透析することで、N 末端に付加した H<sub>7</sub> タグの切除を行った。

反応後の溶液を 1 L の buffer I に 2 回透析する事でバッファー交換した。1 L 培養分当たり 10 mL の HIS-Select (SIGMA) を直径 3 cm のエコノカラム (BioRad) に添加して、buffer I で平衡化した後に、透析後のサンプルをアプライすることで、切断した H<sub>7</sub> タグ、H<sub>7</sub> タグが切断されなかった MSP1、TEV プロテアーゼを吸着させた。その後、100 mL の buffer I、50 mL の 5 mM イミダゾールを含む buffer I、50 mL の 500 mM イミダゾールを含む buffer I で順次洗浄を行った。素通り画分並びにイミダゾールを含まない洗浄画分に溶出した、H<sub>7</sub> タグが切除された MSP1 を回収し、Amicon Ultra 15, MWCO 10K (Millipore) を用いた限外濾過により、終濃度 1 mM となるまで濃縮し、Millex GV (Millipore) を通して不溶物を除去することで最終精製標品とした。MSP1 の定量は 280 nm の吸光度を測定する事で行い、モル吸光係数には  $23,950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を用いた。

### 2-3-13. 脂質の調製

クロロホルムに溶解された POPC、POPG (ともに Avanti) をガラスバイアル中で物質量比 3 : 2 で混合した後、窒素中でクロロホルムを気化させた。その後、脂質のモル濃度が 50 mM となるように 100 mM コール酸ナトリウム溶液を添加した buffer I に溶解した。



#### 2-3-14. $\beta_2$ AR の rHDL への再構成と単離

以下の操作は、特に断らない限り全て氷上または 4 °C で行った。

2-3-7. で反応を行った PTS 反応液 1.5 mL に対して、2-3-12 にて調製した 1 mM MSP1 を 0.2 mL、2-3-13 にて調製した 50 mM 脂質を 0.2 mL、100 mM コール酸ナトリウムを添加した buffer I を 0.1 mL 添加し、1 時間静置した。その後、buffer I で平衡化した Bio-Bead SM2 (BioRad) を 1.6 g 添加し、3 時間ゆるやかに攪拌することで、界面活性剤を除去し、rHDL への再構成を行った。以降、rHDL へ再構成された  $\beta_2$ AR を  $\beta_2$ AR-rHDL と記す。

Bio-Beads SM2 (BioRad) を除去し、反応液を Millex GV (Millipore) に通すことで不溶物を除去した後に、buffer I により総体積を 5 mL としたうえで、終濃度 10 mM  $\text{CaCl}_2$  を添加した。ムロマックカラム L (室町化学) へ充填し、10 mM  $\text{CaCl}_2$  を添加した buffer I で平衡化した ANTI-FLAG M1 Affinity Agarose Gel (SIGMA) 1 mL に対してアプライすることで、 $\beta_2$ AR-rHDL をレジンに吸着させた。素通り画分をさらに 4 回レジンへアプライした後に、5 mL の 3 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1 mM TCEP、10  $\mu\text{M}$  formoterol (Toronto Research Chemicals) を添加した buffer I で洗浄を行い、5 mL の 5 mM EDTA、0.1 mM TCEP、0.2 mg/mL DYKDDDDK peptide、10  $\mu\text{M}$  formoterol (Toronto Research Chemicals) を添加した buffer I で溶出を行った。

溶出画分を Amicon Ultra 4, MWCO 10 K (Millipore) を用いた限外濾過により 1 mL まで濃縮し、Millex-GV (Millipore) により不溶物を除去した上で、Superdex 200 10/300 GL increase (GE) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。AKTA purifier (GE)、AKTA explorer (GE)、または AKTA pure (GE) に接続し、0.1 mM TCEP を添加した buffer I により平衡化した Superdex 200 10/300 GL increase (GE) へアプライして精製を行った。精製の流速を 0.5 mL/min とし、溶出体積 10.5 ~ 12.5 mL の画分を分取した。目的タンパク質の溶出を、280 nm の吸光度と、各溶出画分の

SDS-PAGE 解析により確認した。

## 2-4. GRK2 の調製

### 2-4-1. GRK2 発現用リコンビナントバキュロウイルスの調製

ヒト由来 GRK2 のエンタリークローンを鋳型として、PCR 法により GRK2 をコードする遺伝子配列を C 末端に H<sub>6</sub> タグを付加した形で増幅し、pFastBac1 ベクター (Thermo Scientific) の MCS へと組み込んだ。目的の遺伝子が正しく導入されている事を、ABI PRISM 3130xl (applied biosystems) により配列を読むことで確認した。

調製したプラスミドを *Escherichia Coli*. DH10Bac (Thermo Fisher Scientific) へ形質転換し、50 mg/L カナマイシン、7 mg/L ゲンタマイシン、10 mg/L テトラサイクリン、0.2 mM IPTG、200 mg/L Bluo-Gal を添加した LB 寒天培地へ播いて、37 °C、24 時間培養した。bacmid への目的遺伝子の組み換えが起こっている白色コロニーを単離し、50 mg/L カナマイシン、7 mg/L ゲンタマイシン、10 mg/L テトラサイクリンを添加した LB 培地 5 mL で 37 °C、12 ~ 16 時間振蕩培養した。培養液 2.5 mL 分の菌体を 5,000 rpm、5 分遠心する事により回収し、イソプロパノール沈殿により bacmid DNA を抽出した。抽出した bacmid DNA に目的遺伝子が組み込まれている事を、PCR 法およびアガロースゲル電気泳動法により確認した。

調製した bacmid DNA を Cellfectin II (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Sf9 細胞へトランスフェクションし、27 °C、72 時間静置培養した。培養液を 4,000 g、10 分間の遠心し、上清を P-1 ストックとして回収した。回収した P-1 ストック を Sf9 細胞へと感染させ、27 °C、96 時間培養した。培養液を 4,000 g、10 分間の遠心し、上清を P-2 ストックとして回収した。回収した P-2 ストックを Sf9 細胞へと感染させ、27 °C、72 時間培養した。4,000 g、10 分間の遠心し、上清を P-3 ストックとして回収した。

調製した P-3 ストックの titer を以下のようにして算出した。細胞密度  $2 \times 10^6$  cells/mL とした SF+細胞 50 mL 培養分に対し、調製した P-3 ストック 200  $\mu$ L を添加して、27 °C、130 rpm で 16 ~ 18 時間振蕩培養した。培養液 400  $\mu$ L 分の細胞 1,800 rpm、3 分間遠心することで回収し、0.05 % (w/v) BSA と 1  $\mu$ g/mL Anti Baculovirus Envelope gp64 protein PE (eBioScience) を添加した PBS (-) 200  $\mu$ L で懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。600  $\mu$ L の PBS (-) を添加して懸濁した後に、1,800 rpm、3 分間遠心して上清を除去し、800  $\mu$ L の PBS (-) で再度懸濁した後に 1,800 rpm、3 分間遠心して上清を除去した。その後、0.05 % (w/v) BSA を添加した PBS (-) で懸濁し、この細胞懸濁液を EASYstrainer<sup>TM</sup> 40  $\mu$ m (greiner) でろ過したものを CytoFLEX (Beckman Coulter) を用いた FCM 解析に供して、PE positive の細胞の割合を MOI とした。解析には、CytExpert 1.0 (Beckman Coulter) を用いた。算出された MOI に細胞密度と培養液量を乗じ、添加した P-3 ストックの体積で除することで P-3 ストックの titer を算出した。

#### 2-4-2. GRK2 の大量発現

250 mL の Erlenmeyer フラスコ (Corning) にて培養を行っている SF+細胞を、細胞密度が  $2 \times 10^6$  cells/mL となるように Sf-900II SFM 培地で希釈した。2-4-1. で調製した GRK2 発現用リコンビナントバキュロウイルス P-3 ストックを MOI ~ 5 となるように添加した上で、27 °C、130 rpm、48 時間培養した。培養液を 4 °C、800 g、5 分間遠心することで細胞を回収し、培養液上清を除去した上で、液体窒素にて瞬間凍結を行い、精製に供するまでの間 -80 °C で保存した。

### 2-4-3. GRK2 の精製

以下の操作は、特に断らない限り全て氷上または 4 °C で行った。

2-4-2.にて調製した細胞を解凍し、500 mL 培養分当たり 100 mL の buffer J で懸濁し、protease inhibitor cocktail (ナカライ) を添加して、超音波破碎した。細胞破碎液を、800 g、10 分間遠心することで未破碎細胞と細胞片を除去し、上清をさらに、150,000 g、1 時間遠心した。遠心上清を Acrodisc Syringe Filter 0.45 mm Supor Membrane (PALL) を通すことで不溶物を除去した。直径 3 cm のエコノカラム (BioRad) に充填し、buffer J で平衡化した 20 mL の TALON レジン (Clontech) に対してこれをアプライすることで目的タンパク質のレジンへの吸着を行った。100 mL の buffer J、100 mL の 20 mM イミダゾールを添加した buffer J で順次洗浄を行った後、100 mL の 200 mM イミダゾールを添加した buffer J で目的タンパク質の溶出を行った。目的タンパク質の溶出は、溶出画分の SDS-PAGE 解析により確認した。

溶出させた目的タンパク質を Amicon Ultra 15, MWCO 50K (Millipore) を用いた限外濾過により~ 30 mL 程度まで濃縮し、Millex-GV (Millipore) を通すことで不溶物を除去し、HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (GE) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。AKTA purifier (GE) もしくは AKTA explorer (GE) に接続し、buffer K で平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (GE) にサンプルを 10 mL アプライし、精製を行った。精製の流速を 1.0 mL/min とし、溶出体積 180 mL ~ 210 mL の画分を回収した。

溶出した目的タンパク質を Amicon Ultra 15, MWCO 50K (Millipore) を用いた限外濾過により、終濃度 0.1 mM となるまで濃縮して、最終精製標品とした。GRK2 の定量は 280 nm の吸光度を測定する事で行い、モル吸光係数には  $71,280 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を用いた。

## 2-5. GRK2 による $\beta_2$ AR-rHDL のリン酸化

### 2-5-1. リン酸化反応

2-3. で調製した  $\beta_2$ AR-rHDL、2-4. で調製した GRK2 を、PD-10 カラム (GE) もしくは NAP-5 カラム (GE) を用いて buffer L へとバッファー交換を行った。その後、 $\beta_2$ AR-rHDL、GRK2、ATP をそれぞれ終濃度 0.5  $\mu$ M、1  $\mu$ M、10 mM となるように混合した。さらに、0.1 mM formoterol (SIGMA) もしくは 0.1 mM carazolol (和光純薬) のいずれかを混合した。30 °C でインキュベートする事によりリン酸化反応を行った。

リン酸化反応 1 時間後のサンプルを、AKTA purifier (GE)、AKTA explorer (GE)、または AKTA pure (GE) に接続し、0.1 mM TCEP を添加した buffer I で平衡化した Superdex 200 10/300 GL increase (GE) にアプライして精製する事により、 $\beta_2$ AR-rHDL と GRK2 を分離した。

### 2-5-2. リン酸化速度解析

2-5-1. におけるリン酸化反応液を、反応開始直後と、反応開始から 5 分後、10 分後、30 分後、60 分後にそれぞれ 5  $\mu$ L ずつサンプリングし、それぞれ等量の SDS-PAGE sample solution と混合する事により反応を停止させた。これらをアクリルアミド濃度 15 % のゲルを用いた SDS-PAGE に供し、泳動後のゲルを Pro-Q Diamond (Molecular Probe) により染色し、画像解析を行った。その後、同じゲルを SYPRO Ruby (Molecular Probe) により再染色して画像解析を行った。画像解析には、Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare) を用いた。Pro-Q Diamond により染色した際には波長 532 nm の励起光と LPG フィルター (> 575 nm) を、SYPRO Ruby により染色した際には 473 nm の励起光と LPB フィルター (> 510 nm) をそれぞれ用いた。 $\beta_2$ AR に対応するバンドについて、Pro-Q Diamond (Molecular Probes) 染色で検出された蛍

光強度を、SYPRO Ruby (Molecular Probes) 染色で検出された蛍光強度で除した値を、formoterol 存在下で 60 分後に観測された値で規格化した上で、インキュベーション時間に対してプロットした。

## 2-6 $\beta_2$ AR-rHDL の NMR 測定

### 2-6-1. NMR サンプル

2-3.にて調製した  $\beta_2$ AR-rHDL、2-5.にて調製したリン酸化  $\beta_2$ AR-rHDL を Amicon Ultra 4, MWCO 10 K (Millipore) を用いた限外濾過により、~250  $\mu$ L まで濃縮した。これに 3 mL の 10  $\mu$ M formoterol を添加した buffer M を加えた希釈し、4 回繰り返すことでバッファー交換を行った後、サンプルを 25 °C、15,000 rpm、15 分間遠心することで不溶物を除去し、マイクロセル (シゲミ) に充填した。carazolol 結合状態の測定を行う際には、このサンプルに carazolol を終濃度 400  $\mu$ M となるように添加し、4 °C で 24 時間以上静置したものをを用いた。 $\beta_2$ AR-rHDL、リン酸化  $\beta_2$ AR-rHDL の終濃度は 10 ~ 25  $\mu$ M とした。

2-3.にて調製した Int<sub>C</sub>-Cterm の凍結乾燥標品を、buffer M で溶解し、25 °C、15,000 rpm、15 分間遠心することで不溶物を除去し、マイクロセル (シゲミ) に充填した。Int<sub>C</sub>-Cterm の終濃度を 200  $\mu$ M とした。

## 2-6-2. NMR 測定

測定は全て 298 K で行った。リン酸化  $\beta_2$ AR-rHDL の TROSY-HSQC、TROSY-HNCA、TROSY-HN(CO)CA は、TCI CryoProbe (Bruker) を装着した Bruker AVANCE III 950 (Bruker) を用いて測定した。その他の測定は全て TCI CryoProbe (Bruker) を装着した Bruker AVANCE III 800 (Bruker) を用いて測定した。FID のフーリエ変換は Topspin 3.1 (Bruker) を用いて行い、スペクトルの解析は Sparky を用いて行った。buffer M に溶解した DSS メチル基の  $^1\text{H}$  の化学シフトを外部標準として、 $^1\text{H}$  の化学シフトの校正を行い、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  の化学シフトは磁気回転比の値から補正を行った。

$[\text{u-}^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$  Int<sub>C</sub>-Cterm の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC、HNCACB、HN(CO)CACB、HNCA、HN(CO)CA は、water flip-back と gradient enhanced coherence selection による溶媒消去を行い、sensitivity improvement 法を適用したパルス系列を用いて測定した。3D 測定に関しては、 $^{13}\text{C}$  軸、 $^{15}\text{N}$  軸を constant-time 展開とし、 $^{13}\text{C}$  軸展開の間に  $^2\text{H}$ -decoupling を行った。各測定の主要なパラメータは **Table 2-1** に記した。C $\alpha$ 、C $\beta$  の化学シフトのマッチングに基づく主鎖連鎖帰属を行う事により、各シグナルを帰属した。

$\{\text{Cterm-}[^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]\}$   $\beta_2$ AR-rHDL および  $\{\text{Cterm-}[^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]\}$  リン酸化  $\beta_2$ AR-rHDL の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC は、water flip-back および WATERGATE 法による溶媒消去を行い、STATE-TPPI 法による位相敏感検波を行うパルス系列を用いて測定した。TROSY-HNCA、TROSY-HN(CO)CA は、water flip-back および gradient enhanced coherence selection による溶媒消去を行うパルス系列を用いて測定した。 $^{13}\text{C}$  軸を real-time 展開、 $^{15}\text{N}$  軸を semi constant-time 展開とし、 $^{13}\text{C}$  軸展開の間に  $^2\text{H}$ -decoupling を行った。各測定の主要なパラメータは **Table 2-2**、**Table 2-3** に記した。Int<sub>C</sub>-Cterm のスペクトルとの比較、C $\alpha$  の化学シフトのマッチングに基づく主鎖連鎖帰属により、各

シグナルを帰属した。

{Cterm-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N,Ileδ1/Thry2-<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]} β<sub>2</sub>AR-rHDL および  
 {Cterm-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N,Ileδ1/Thry2-<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]}リン酸化 β<sub>2</sub>AR-rHDL の <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC は、  
 gradient-enhanced coherence selection による溶媒消去を行い、echo/anti-echo 法による  
 位相敏感検波を行うパルス系列を用いて測定した。測定の主要なパラメータは **Table  
 2-2、Table 2-3** に記した。

**Table 2-1 Int<sub>C</sub>-Cterm の NMR 測定に用いたパラメータ**

Experiment	Data point <sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C	Spectral width [ppm] <sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C	Offset [ppm] <sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C	Number of scan	Interscan delay [sec]
<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC	1024/512	16/22	4.704/118	8	1.0
HNCACB HN(CO)CACB	1024/64/128	16/22/60	4.704/118/40	8	1.0
HNCA HN(CO)CA	1024/64/128	16/22/21	4.704/118/51.5	8	1.0



**Table 2-2  $\beta_2$ AR-rHDL の NMR 測定に用いたパラメータ**

Experiment	Data point $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$	Spectral width [ppm] $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$	Offset [ppm] $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$	Number of scan	Interscan delay [sec]
$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	1024/256	16/22	4.704/118	200	1.0
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC	1024/256	16/8	4.704/18.5	160	1.0
TROSY-HNCA TROSY- HN(CO)CA	2048/80/96	16/22/21	4.704/119/51.5	8	1.0

**Table 2-3 リン酸化  $\beta_2$ AR-rHDL の NMR 測定に用いたパラメータ**

Experiment	Data point $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$	Spectral width [ppm] $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$	Offset [ppm] $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$	Number of scan	Interscan delay [sec]
$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	1024/256	16/22	4.704/118	250	1.0
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC	1024/256	16/8	4.704/18.5	160	1.0
TROSY-HNCA TROSY- HN(CO)CA	2048/60/64	16/22/24	4.704/119/53	24	1.0

## 第3章 結果

### 3-1. 区分同位体標識を施した $\beta_2$ AR-rHDL の調製

#### 3-1-1. Protein *trans*-splicing (PTS) を用いた区分同位体標識

タンパク質を NMR 法により解析するには、標的タンパク質の安定同位体標識が必須であり、分子内の全ての原子を標識する均一同位体標識を第一選択として適用する事が一般的である。しかしながら、本研究で解析対象とする全長  $\beta_2$ AR は、アミノ酸残基数 413 残基からなる高分子量タンパク質である。このような高分子量タンパク質に対し、均一同位体標識を施した場合、得られる NMR スペクトルには、残基数に応じた多数のシグナルが観測される(**Fig.3-1**)。この結果、シグナルが縮重する事により、残基レベルで解析を行う事が困難となる。

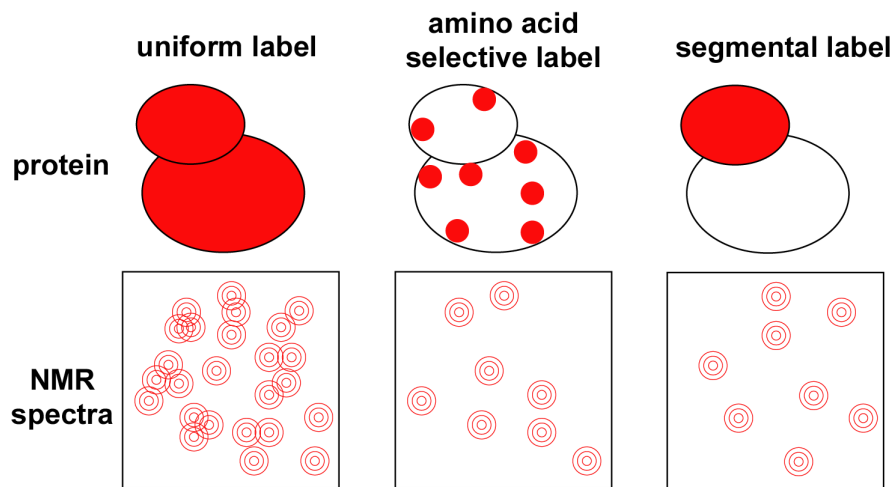
これを回避する方法の一つとして、アミノ酸選択的な安定同位体標識を施すことにより、観測されるシグナルの数を減らすことで縮重を回避する方法が挙げられる。しかしながら、アミノ酸選択的標識では、標的タンパク質の構造中でのプローブの分布がまばらになるため、解析対象とするドメインについて網羅的な構造情報を得るためには、異なる標識パターンのサンプルを数種類調製して解析を行う必要がある。**(Fig.3-1)**。また、アミノ酸選択的標識体では三重共鳴実験に基づく主鎖連鎖帰属法が適用できないため、シグナルの帰属を行うに当たり膨大な量の変異体の NMR 測定を行わなければならない点も問題となる。

観測対象とする  $\beta_2$ AR C 末端領域を網羅的に観測しつつ、シグナルの縮重を回避する為に、本研究では、 $\beta_2$ AR C 末端領域を区分同位体標識することとした。区分同位体標識とは、標的タンパク質の特定のドメインのみに安定同位体標識を施す手法である[14] (**Fig.3-1**)。  $\beta_2$ AR C 末端領域にのみ安定同位体標識が施され、その他の領域を非標識とした全長  $\beta_2$ AR を調製すれば、観測対象とする C 末端領域を一残

基ずつ網羅的に解析する事ができ、かつその他の領域のシグナルが観測されなくなるためシグナルの縮重を回避する事ができる。また、C末端領域では隣り合う残基が標識されるため、三重共鳴実験に基づく主鎖連鎖帰属法が適用可能である。

$\beta_2$ AR に区分同位体標識を施す方法として、本研究では、protein *trans*-splicing (PTS) を利用することとした[14]。PTS は、分離インテインにより触媒されるタンパク質連結反応である。PTS では、目的のタンパク質を、N末端側のフラグメントとC末端側のフラグメントに分けて、両者を分離インテイン融合タンパク質として別々に発現させる。その後、両者を混合すると、分離インテインの会合・構造形成に伴い、求核性のアミノ酸側鎖を介した一連のスプライシング反応が進行する (Fig.3-2)。その結果、分離インテインが切り出されるとともに、目的タンパク質断片がペプチド結合により連結される。この際に、一方の断片のみに安定同位体標識が施されていれば、最終的に形成される目的タンパク質は一部分のみが安定同位体標識されたものとなる。

本研究で確立を目指す、区分同位体標識  $\beta_2$ AR の調製法を Fig.3-3 に示した。 $\beta_2$ AR TMドメインに、分離インテインのNフラグメントを融合したコンストラクトを、昆虫細胞発現系を用いて非標識培地より発現、精製する。 $\beta_2$ AR C末端領域に分離インテインのCフラグメントを融合したコンストラクトを、大腸菌発現系を用いて標識培地より発現、精製する。その後、両者を *in vitro* で混合することで、PTS反応により全長  $\beta_2$ AR を調製する。このようにして調製した  $\beta_2$ AR は、C末端領域のみが安定同位体標識されたものとなる。



**Fig.3-1 高分子量タンパク質に対する安定同位体標識法と、各標識法により得られる NMR スペクトルの模式図**

均一標識では、観測されるシグナル数が多くなりシグナルの縮重を生じる  
 アミノ酸選択標識では、シグナルの縮重が回避されるものの、観測対象とする  
 ドメイン上でのプローブの分布がまばらになる。

区分同位体標識では、観測対象とするドメインを網羅的に観測しつつ、シグナルの縮重を回避できる

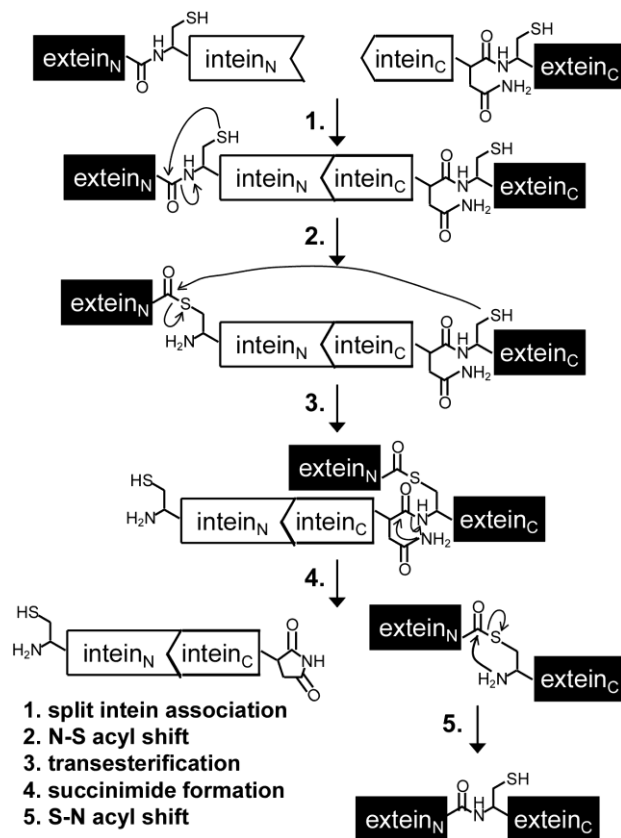


Fig.3-2 分離インテインによる protein *trans*-splicing 反応の模式図

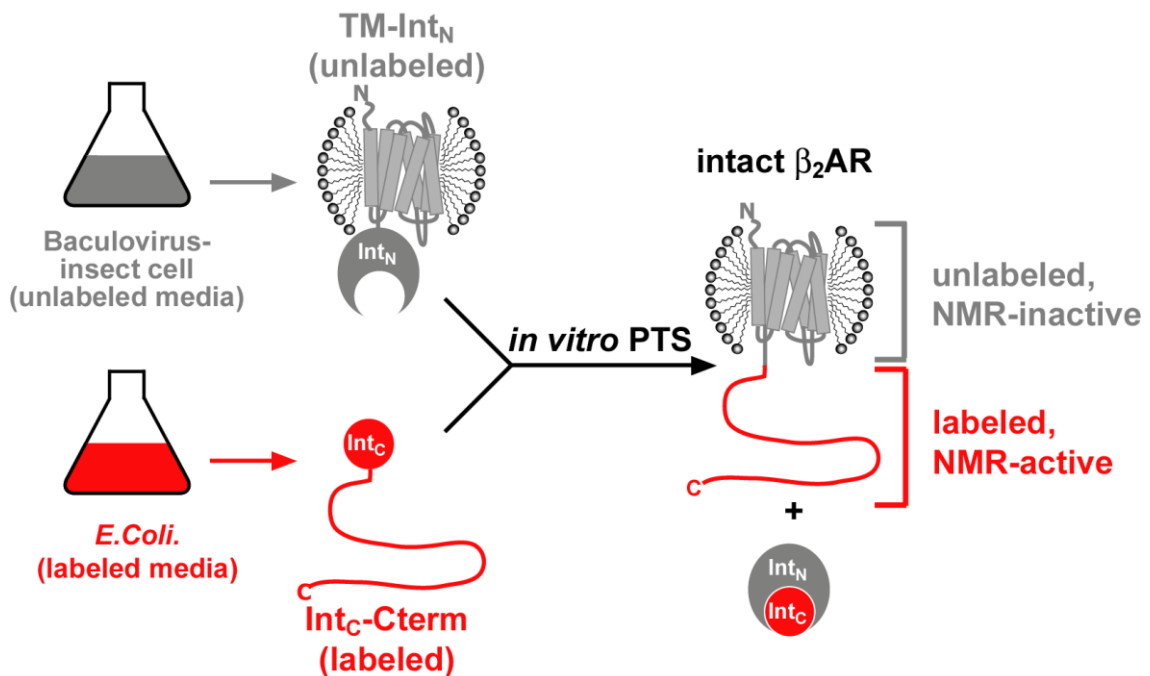


Fig.3-3 本研究で確立する区分同位体標識  $\beta_2$ AR 調製スキーム

### 3-1-2. PTS 法を利用する為のインテインの選定

まず、PTS 反応を行うための分離インテインの選定を行った。これまでに様々なインテインについて、*in vitro* での splicing 活性が解析されており、この中でも特に *Nostoc punctiforme* (*Npu*) 由来 DnaE インテインは、比較的 splicing 反応の速度が速い事が報告されている[15] (**Table 3-1**)。また、このインテインの、C 末端側のフラグメントの配列を *Synechocystis species* PCC6803 (*Ssp*) 由来 DnaE インテインの配列に置き換えたり、分離位置を C 末端側から数えて 35 残基の位置から 15 残基の位置へ変更したりする事により、インテインの直前・直後の配列に依らず比較的高い反応性を示す事が報告されている[16] [17]。したがって、*Npu/Ssp chimera* DnaE インテインを、C 末端側から数えて 15 残基の位置で分離した分離インテインを用いることにより、最低限の変異導入により、高効率の PTS 反応が達成可能であると考え、これを用いたコンストラクトの構築を検討することとした。以降、分離インテインの N 末端側のフラグメントを  $\text{Int}_N$ 、C 末端側のフラグメントを  $\text{Int}_C$  と表記する。

**Table 3-1. 様々なインテインの *in vitro* での splicing 活性の比較**  
**([15]より引用)**

Table 1 *In vitro* splicing kinetics and yields for several inteins<sup>a</sup>

Intein name	Type	Temperature (°C)	$k_{\text{splice}}$ (s <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ <sup>b</sup>	Splicing yield	Reference
<i>MxeGyrA</i>	Contiguous	25	$1.9 \times 10^{-5}$	10 h	>90% <sup>c</sup>	26
<i>PabPolIII</i>	Contiguous	70	$1.6 \times 10^{-5}$	12 h	74% <sup>d</sup>	101
<i>MjaKlbA</i>	Contiguous	42	$2.2 \times 10^{-3}$	5 min	64% <sup>d</sup>	102
<i>SspDnaB</i>	Artificially split	25	$9.9 \times 10^{-4}$	12 min	32-56% <sup>e</sup>	103
<i>ScvVMA</i>	Artificially split	25	$1.2 \times 10^{-3}$	10 min	67-73% <sup>e</sup>	103
<i>SspDnaE</i>	Naturally split	37	$1.5 \times 10^{-4}$	76 min	<50% <sup>c</sup>	70
<i>NpuDnaE</i>	Naturally split	37	$3.7 \times 10^{-2}$	19 s	>90% <sup>f</sup>	70
<i>AvaDnaE</i>	Naturally split	37	$3.1 \times 10^{-2}$	23 s	>90% <sup>f</sup>	70
<i>CraDnaE</i>	Naturally split	37	$1.2 \times 10^{-2}$	58 s	>90% <sup>f</sup>	70
<i>CspDnaE</i>	Naturally split	37	$1.8 \times 10^{-2}$	39 s	>90% <sup>f</sup>	70
<i>CwaDnaE</i>	Naturally split	37	$5.0 \times 10^{-3}$	140 s	80-90% <sup>f</sup>	70
<i>MchtDNaE</i>	Naturally split	37	$2.4 \times 10^{-2}$	29 s	>90% <sup>f</sup>	70
<i>OliDnaE</i>	Naturally split	37	$1.6 \times 10^{-2}$	44 s	>90% <sup>f</sup>	70
<i>TerDnaE</i>	Naturally split	37	$8.5 \times 10^{-3}$	82 s	>90% <sup>f</sup>	70
gp41-1	Naturally split	45	$1.8 \times 10^{-1}$	4 s	85-95% <sup>d</sup>	100
gp41-8	Naturally split	37	$4.5 \times 10^{-2}$	15 s	85-95% <sup>d</sup>	100
NrdJ-1	Naturally split	37	$9.8 \times 10^{-2}$	7 s	85-95% <sup>d</sup>	100
IMPDH-1	Naturally split	37	$8.7 \times 10^{-2}$	8 s	90-95% <sup>d</sup>	100

<sup>a</sup> The entries in this table represent one reported set of rates and yields for each intein, typically under conditions of optimal pH, temperature, and extein context. Thus, they roughly reflect the maximum potential of each intein. We note that several of these parameters have also been measured for these inteins under sub-optimal conditions and are reported in the primary literature. <sup>b</sup> Calculated from reported first-order rate constants. <sup>c</sup> Estimated based on visual inspection of raw data. <sup>d</sup> Reported yield. <sup>e</sup> Estimated from reported error bars at reaction endpoint. <sup>f</sup> Based on consumption of the limiting fragment (with no side products observed).

### 3-1-3. インテインを融合した $\beta_2$ AR コンストラクトの設計

次に、インテインを用いて全長  $\beta_2$ AR を調製する為のコンストラクトを設計した。

一次配列上のどの部位で  $\beta_2$ AR を分断し、インテインを融合するかについて、以下の

① ~ ④を踏まえて検討を行うこととした。

①インテインによる PTS 反応を行う際には、インテインを融合する部位の構造の自由度が高い事が、高効率の PTS 反応を達成するうえで必要である。

②本研究の目的は、 $\beta_2$ AR C 末端領域のリン酸化に伴う構造、運動性の変化からシグナル伝達機構を解明する事にある。したがって、GRK によりリン酸化される部位が全て安定同位体標識を施され、NMR により観測可能となるような位置にインテインを融合する事が必要である。

③*Npu/Ssp chimera DnaE* インテインでは、PTS 反応を生じる際に、Int<sub>C</sub> の直後に位置

するシステイン残基の側鎖チオール基を活性中心として必要とする。したがって、全長  $\beta_2$ AR に内在するシステイン残基を利用すること、あるいは変異によりシステイン残基を導入することのいずれかが必要である。

④ *Npu/Ssp chimera DnaE* インテインによる PTS 反応の効率は、活性中心となるシステイン残基の直後のアミノ酸残基の種類に依存する事が報告されている[16]。この先行報告を参照し、設計したコンストラクトで高効率の PTS 反応が達成されるか否かを推測する事が可能である。

まず、①について検討した。 $\beta_2$ AR の配列中において、残基番号 31 ~ 341 の領域は、7 本の膜貫通ヘリックスと 1 本の両親媒性ヘリックスからなる高次構造を形成している。また、C341 はパルミトイル化を受ける部位であるため、この部位は昆虫細胞発現系を用いて発現させる事が望ましい。この事から、PTS 反応を行う部位は、残基番号 342 番以降の部位とするべきであると考えた。

次に、②について検討した。質量分析を用いた先行報告において、GRK による  $\beta_2$ AR C 末端領域の被リン酸化残基が同定されている[11]。このうち、もっとも N 末端側に位置している残基は S355 である。したがって、GRK による被リン酸化残基を全て安定同位体標識する為には、PTS 反応を行う部位を残基番号 354 番以前の部位とするべきであると考えた。

次に、③について検討した。①、②より、PTS 反応部位として、残基番号 342 ~ 354 の領域が候補となっているが、この配列中にはシステイン残基は存在しない。したがって、変異導入によりこの領域のいずれかの残基をシステインに置換することとした。変異導入に伴う活性の変化を最小とするために、 $\beta_2$ AR の一次配列を異なる種間で比較して、保存性が低い残基に対してシステイン残基を導入することとした。配列保存性の検討の結果、human  $\beta_2$ AR の L347 は、rat  $\beta_2$ AR と mouse  $\beta_2$ AR では対応する残基



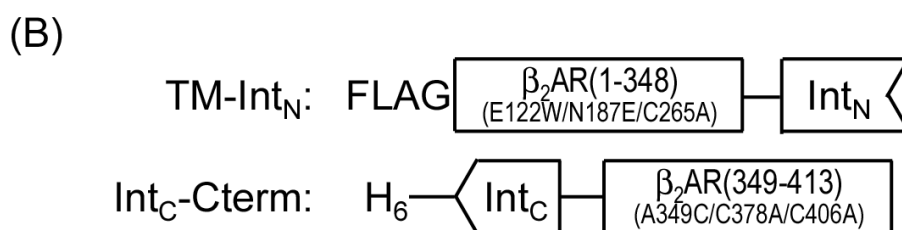
が S である事、human  $\beta_2$ AR の A349 は rat  $\beta_2$ AR と mouse  $\beta_2$ AR では対応する残基が T であり、種間で保存されていない事が分かった (Fig.3-4)。したがって、L347、A349 のいずれかをシステインに置換して、インテインの活性中心として利用すれば、変異導入による活性の変化を生じる恐れが少なくなると考えた。

最後に、④について検討した。human  $\beta_2$ AR の一次配列上で、L347 の直後の残基のアミノ酸は K、A349 の直後の残基のアミノ酸は Y である (Fig.3-4)。活性中心となるシステインの直後の残基のアミノ酸種に対する PTS 反応の効率を解析した先行論文では、当該残基が K である場合の反応効率が ~ 30 % である一方で、Y である場合の反応効率が ~100 % であると報告されている[16] (Fig.3-5)。したがって、A349 をシステインに置換した上で、活性中心として利用する方が、より高い効率で PTS 反応を達成可能であると考えた。

以上の検討より、全長  $\beta_2$ AR の残基番号 349 を A から C に変異した上で、残基番号 1-348 の C 末端側に Int<sub>N</sub> を融合したコンストラクトと、残基番号 349-413 の C 末端側に Int<sub>C</sub> を融合したコンストラクトをそれぞれ調製することとした。残基番号 1-348 に Int<sub>N</sub> を融合したコンストラクトには、N 末端側に精製のための FLAG タグを付加して、コンストラクトの熱安定性を向上させる E122W 変異[18]、糖鎖修飾の不均一性を解消する為の N187E 変異、反応性が高いチオール基を除去する為の C265A 変異を導入した。以降、このコンストラクトを TM-Int<sub>N</sub> と表記する。また、残基番号 349-413 に Int<sub>C</sub> を融合したコンストラクトには、N 末端側に精製のための H<sub>6</sub> タグを付加して、反応性が高いチオール基を除去する為の C378A/C406A 変異を導入した。以降、このコンストラクトを Int<sub>C</sub>-Cterm と表記する。なお、上記の変異導入は、シグナル伝達活性に大きな影響を与えない事が先行報告により報告されている[9] [19]。

(A)

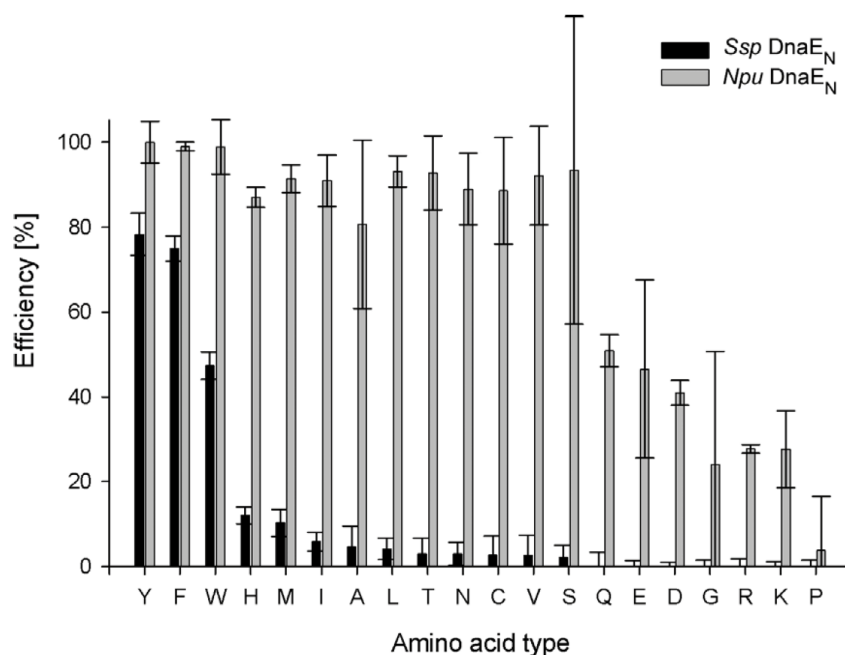
residue number	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355
human	(C)	L	R	R	S	S	L	<b>K</b>	A	<b>Y</b>	G	N	G	<b>Y</b>	(S)
rat	(C)	L	R	R	S	S	S	<b>K</b>	T	<b>Y</b>	G	N	G	<b>Y</b>	(S)
mouse	(C)	L	R	R	S	S	S	<b>K</b>	T	<b>Y</b>	G	N	G	<b>Y</b>	(S)



**Fig.3-4**

(A) インテインを融合する候補部位の配列。高次構造を形成する C341 から、GRK による被リン酸化残基である S355 の間の配列のうち、human、rat、mouse で保存されている残基をオレンジで示した。芳香環を有するチロシン残基を Bold で示した。最終的にインテインの融合部位と定めた部位を▼で示した。

(B) 設計したコンストラクトの模式図



**Fig.3-5** *Npu/Ssp* chimera DnaE および *Ssp* DnaE の PTS 反応における、活性中心のシステイン残基の直後のアミノ酸種に対する反応効率の変化[16]

#### 3-1-4. TM-Int<sub>N</sub> の調製

TM-Int<sub>N</sub> の発現には、GPCR TMドメインの大量発現の実績が豊富であるバキュロウイルス—昆虫細胞発現系を採用した。3-1-2.にて設計した TM-Int<sub>N</sub> の N 末端側にヘマグルチニンシグナル配列を付加し、ポリヘドリンプロモーターの制御下で発現させるリコンビナントバキュロウイルスを調製し、これを SF+細胞に感染させることで大量発現を行った。超遠心により膜画分を取得した後に、DDM による可溶化を行い、N 末端に付加した FLAG タグを用いた抗体アフィニティー精製、サイズ排除クロマトグラフィーにより順次精製した。最終精製標品の SDS-PAGE 解析の結果から、DDM ミセルに可溶化した TM-Int<sub>N</sub> を精製度 80 ~ 90 %、1 L 培養分当たり 150 µg 程度の収量で得られたと結論した。

#### 3-1-5. Int<sub>C</sub>-Cterm の精製

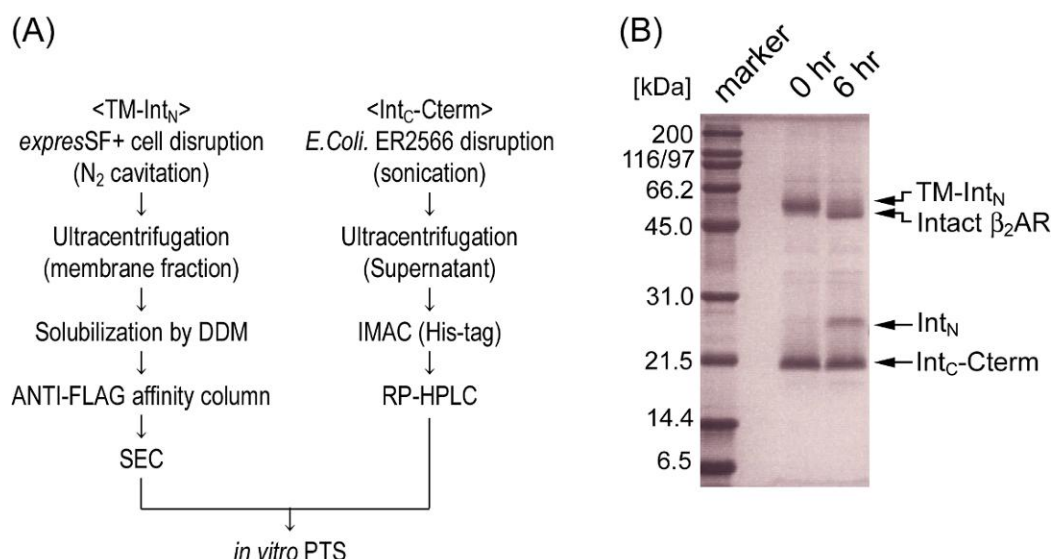
Int<sub>C</sub>-Cterm の発現には、様々な安定同位体標識の手法が報告されている大腸菌発現系を採用した。3-1-2.にて設計した Int<sub>C</sub>-Cterm を T7 プロモーターの制御下で発現させる発現用プラスミドを大腸菌 ER2566 株に形質転換し、安定同位体標識用の培地で大量発現を行った。菌体破碎液の遠心上清を N 末端に付加した H<sub>6</sub> タグを用いたアフィニティー精製、逆相 HPLC により順次精製した。最終精製標品の SDS-PAGE 解析および 280 nm の吸光度より、Int<sub>C</sub>-Cterm を精製度 > 95 %、M9/D<sub>2</sub>O 培地 1 L 培養分当たり 8 mg 程度の収量で得られたと結論した。

#### 3-1-6. *in vitro* PTS 反応による全長 β<sub>2</sub>AR の調製

3-1-3.、3-1-4.により調製した TM-Int<sub>N</sub>、Int<sub>C</sub>-Cterm を混合して、インキュベートする事により、両コンストラクトに付加した分離インテインを介した *in vitro* PTS 反応を行

った。25 °C で 6 時間インキュベートした前後のサンプルを SDS-PAGE 解析に供したところ、インキュベート前の反応液には TM-Int<sub>N</sub>、Int<sub>C</sub>-Cterm に対応するバンドのみが検出されたのに対し、インキュベートから6時間後の反応液ではTM-Int<sub>N</sub>に対応するバンドが顕著に減少するとともに、分子量~45 kDa の泳動度にインキュベート前には検出されていないバンドが新たに検出された。このバンドの分子量が全長 β<sub>2</sub>AR の理論分子量 47.5 kDa とおおむね対応していることから、インキュベートに伴い、*in vitro* PTS 反応により全長 β<sub>2</sub>AR が精製したと判断した。バンドの強度から、反応の収率を 80 % 程度と見積もった。

なお、予備的な解析より、反応温度 4 °C では 16 時間インキュベートしても PTS 反応の収率が < 50 % にとどまる事、反応温度 37 °C では反応開始から 5 時間後に TM-Int<sub>N</sub> または PTS 反応により生じた全長 β<sub>2</sub>AR に由来する凝集を生じる事、反応温度 25 °C では 6 時間以上インキュベートしても全長 β<sub>2</sub>AR の収量の有意な増加は観察されない事を確認している。したがって、今回の反応条件は今回調製したコンストラクトを用いた反応条件として十分最適化されていると考えている。



**Fig.3-6**

(A) *in vitro* PTS 法による全長 β<sub>2</sub>AR 調製スキーム

(B) *in vitro* PTS 反応液の SDS-PAGE 解析

### 3-1-7.rHDL を用いた膜タンパク質の脂質二重膜再構成

ここまでで調製した全長  $\beta_2AR$  は、DDM ミセルに可溶化された状態にある。しかしながら、GRK による GPCR のリン酸化を *in vitro* の再構成系で達成する為には、脂質が必要である事が報告されており、DDM ミセルに可溶化された状態は GRK による GPCR のリン酸化を解析するうえでは不適當である[20]。

そこで、調製した  $\beta_2AR$  を、reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) の脂質二重膜中に再構成することとした。rHDL は、ApoA-I の改変体である MSP1 2 分子が、脂質二重膜を取り囲むようにして構成される、直径約 10 nm の円盤状の粒子であり、この脂質二重膜中に様々な膜タンパク質を再構成する事が可能である[21]。 $\beta_2AR$  を含む複数の GPCR において、rHDL への再構成を行う事により、活性化依存的な GRK によるリン酸化を *in vitro* で達成可能である事が報告されている[22, 23]。また、rHDL は他の脂質二重膜再構成法と比較して、溶液中で単分散であり、分子径が小さい点が溶液 NMR 法による解析に適しており、実際に  $\beta_2AR$  を含む複数の膜タンパク質において、rHDL へ再構成した状態での NMR 解析が報告されている[24-26]。したがって、C 末端領域に区分同位体標識を施した  $\beta_2AR$  の rHDL への再構成は、GRK によるリン酸化に伴う構造・運動性の変化を解析するうえでは有効な方法であると考えた。

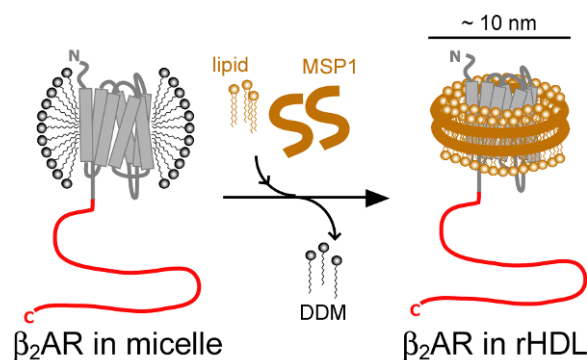
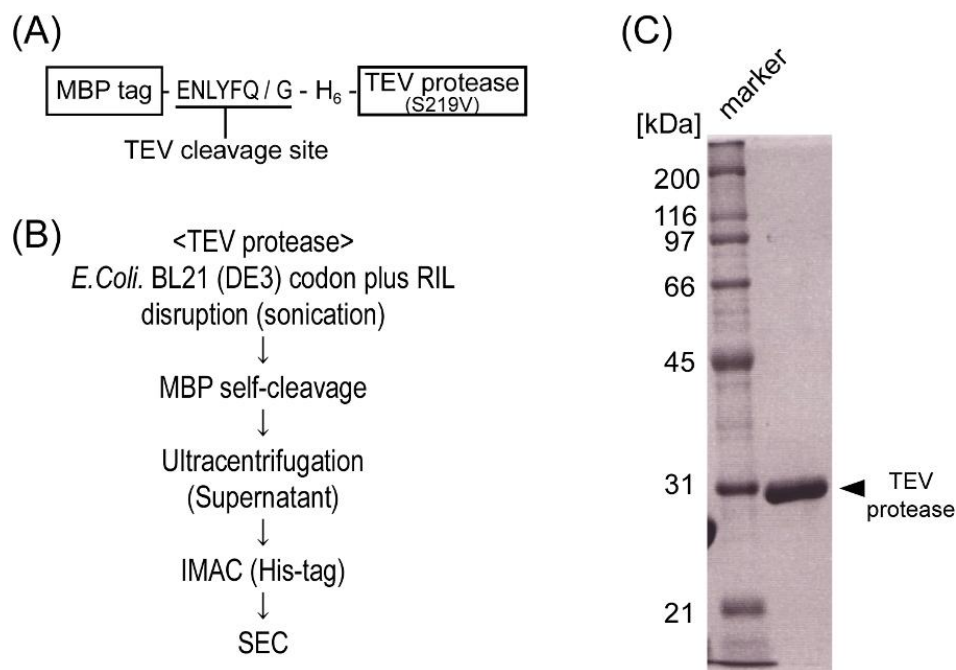


Fig.3-7  $\beta_2AR$  の rHDL 再構成の模式図

### 3-1-8. TEV プロテアーゼの調製

rHDL を形成する MSP1 の調製には、TEV プロテアーゼによるタグの切断の過程が含まれる。rHDL を用いた膜タンパク質の構造生物学的解析には大量の MSP1 を必要とするため、まずタグの切断に必要な TEV プロテアーゼを大量調製することとした。TEV プロテアーゼとして、自己切断による不活性化を抑制する S219V 変異体を調製することとした[27]。以降、この変異体を単に TEV プロテアーゼと表記する。N 末端に MBP タグ、TEV プロテアーゼ切断配列、H<sub>6</sub> タグを付加した TEV プロテアーゼを大腸菌にて大量発現させた (Fig.3-8 (A))。菌体破碎液の遠心上清から、自身の活性により MBP タグが切断された目的タンパク質を、N 末端に付加した H<sub>6</sub> タグを付加したアフィニティー精製、サイズ排除クロマトグラフィーにより順次精製した (Fig.3-8 (B))。最終精製標品の SDS-PAGE 解析、280 nm の吸光度より、精製度を > 95 %、収量を 1 L 培養当たり 80 mg と見積もった (Fig.3-8 (C))。



**Fig.3-8**

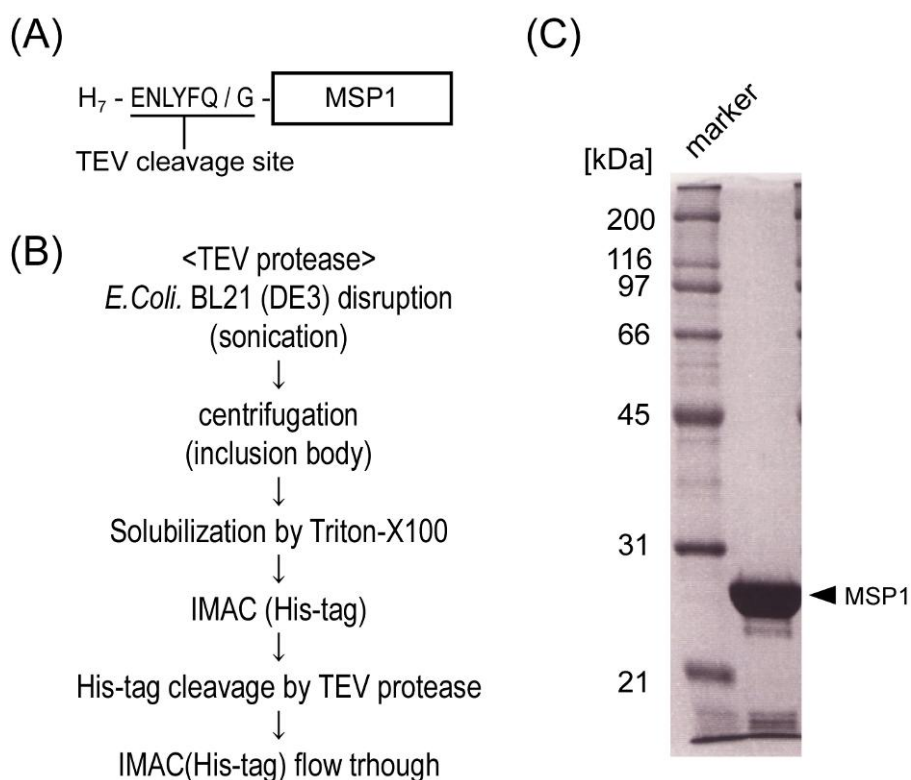
(A) TEV プロテアーゼのコンストラクトの模式図

(B) TEV プロテアーゼ調製スキーム

(C) 最終精製標品の SDS-PAGE 解析

### 3-1-9. MSP1 の調製

rHDL の形成に必要な、MSP1 の調製を行った。N 末端に H<sub>7</sub> タグ、TEV プロテアーゼ切断配列を付加した MSP1 を大腸菌にて大量発現させた (Fig.3-9 (A))。菌体破碎液より不溶画分を取得し、Triton-X100 による可溶化を行ったうえで、N 末端に付加した H<sub>7</sub> タグを用いたアフィニティー精製、3-1-7.にて調製した TEV プロテアーゼによるタグの切断、HIS-Select を素通らせることによる切断後のタグ、H<sub>7</sub> タグ未切断の MSP1、および TEV プロテアーゼの除去を行う事により順次精製した (Fig.3-9 (B))。最終精製標品の SDS-PAGE 解析、280 nm の吸光度より、精製度を ~ 90 %、収量を 1 L 培養当たり 100 mg と見積もった (Fig.3-9 (C))。



**Fig.3-9**

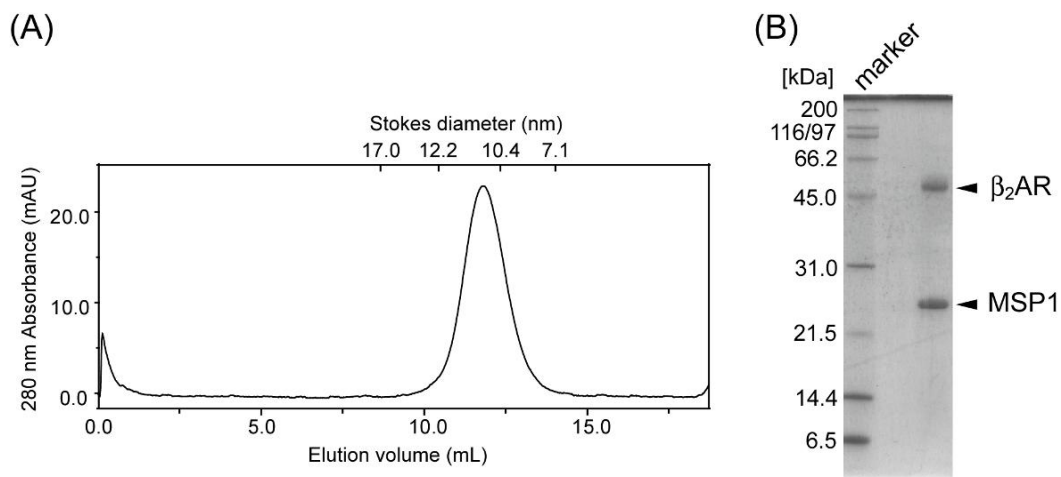
(A) MSP1 のコンストラクトの模式図

(B) MSP1 調製スキーム

(C) 最終精製標品の SDS-PAGE 解析

### 3-1-10. $\beta_2$ AR の rHDL への再構成と単離

3-1-5.にて調製した全長  $\beta_2$ AR を含む PTS 反応溶液に対し、3-1-8.にて調製した MSP1 と、脂質を添加して、界面活性剤を除去する事により、rHDL への再構成を行った。脂質の組成は、GRK による  $\beta_2$ AR のリン酸化が達成される事が報告されている POPC:POPG = 3:2 を用いた[23]。再構成後のサンプルを、 $\beta_2$ AR の N 末端側に付加した FLAG タグを用いた抗体アフィニティー精製、サイズ排除クロマトグラフィーに供することで、 $\beta_2$ AR が再構成されており、かつ rHDL が正しく形成されている分子種を単離した。最終精製標品のサイズ排除クロマトグラフィー解析において、Stokes 径  $\sim 11$  nm に対応する溶出位置に、単分散の溶出プロファイルが確認されており、これが先行報告されている rHDL の Stokes 径とよく対応している事から、 $\beta_2$ AR が rHDL へ正しく再構成されていると判断した[21] (**Fig.3-10 (A)**)。また、最終精製標品の SDS-PAGE 解析より、精製度を 90 % 程度、収量を昆虫細胞 1 L 培養当たり  $\beta_2$ AR 30  $\mu$ g 程度と見積もった (**Fig.3-10 (B)**)。



**Fig.3-10**

(A) 調製した  $\beta_2$ AR-rHDL の SEC 解析

カラムは Superdex 200 10/300 GL (GE) を用いた。Stokes 径のキャリブレーションは thyroglobulin (17.0 nm)、ferritin (12.2 nm)、catalase (10.4 nm)、BSA (7.1 nm) の溶出位置を基準に行った。

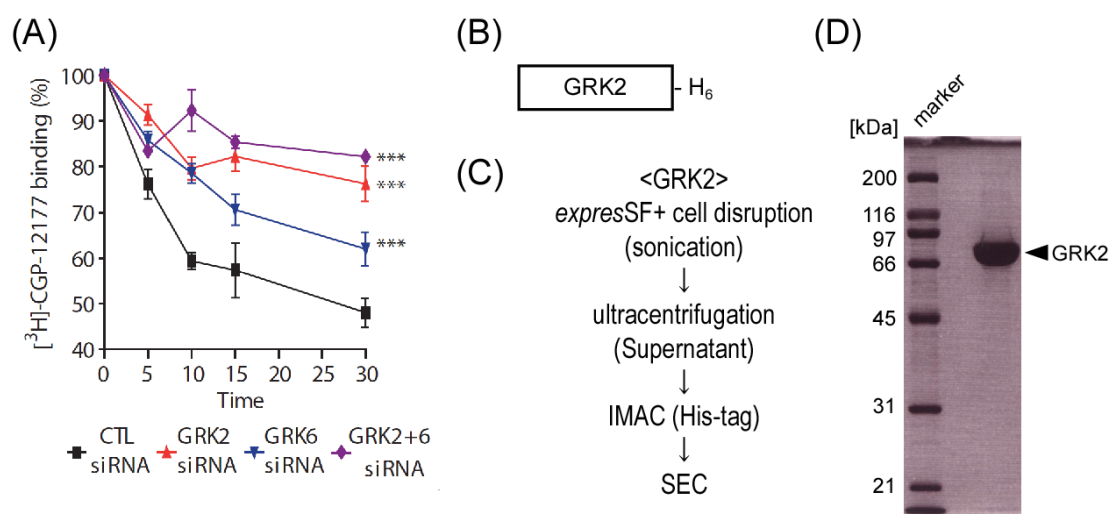
(B) 調製した  $\beta_2$ AR-rHDL の SDS-PAGE 解析



### 3-2. GRK2 の調製

GRK2 は、 $\beta_2$ AR をリン酸化する複数の GRK の中でも、特にインターナリゼーションにおいて重要な役割を担っている。実際に、培養細胞を用いた解析では、GRK6 をノックダウンした場合と比較して、GRK2 をノックダウンした場合には、アレスチンを介した  $\beta_2$ AR のインターナリゼーションがより顕著に抑制される事が報告されている[11] (**Fig.3-11 (A)**)。また、GRK2 のホモノックアウトマウスは胚性致死となる一方で、他の GRK のホモノックアウトマウスでは表現形に違いがみられるものの生存する事から、GRK2 の機能が他の GRK サブタイプと比較して生存により重要である事が示唆される[28]。したがって、GRK2 により  $\beta_2$ AR をリン酸化すれば、シグナル伝達を達成するうえで重要な構造・運動性の変化が十分に生じると考えられる。そこで、GRK2 の調製を行った。

C 末端に H<sub>6</sub> タグを付加した GRK2 を昆虫細胞にて大量発現させた (**Fig.3-11 (B)**)。細胞破碎液上清を C 末端に付加した H<sub>6</sub> タグを用いたアフィニティー精製、サイズ排除クロマトグラフィーにより順次精製した (**Fig.3-11 (C)**)。最終精製標品の SDS-PAGE 解析、280 nm の吸光度より、精製度を >95 %、収量を 1 L 培養当たり ~ 50 mg 程度と見積もった (**Fig.3-11(D)**)。



**Fig.3-11**

- (A) GRK2 および GRK6 のノックダウンが  $\beta_2AR$  のインターナライゼーションに与える影響[11]。横軸にアゴニスト刺激後のインキュベート時間、縦軸に細胞表面の  $\beta_2AR$  量を示す。
- (B) 調製した GRK2 のコンストラクトの模式図 (B) GRK2 調製スキーム
- (C) 最終精製標品の SDS-PAGE 解析

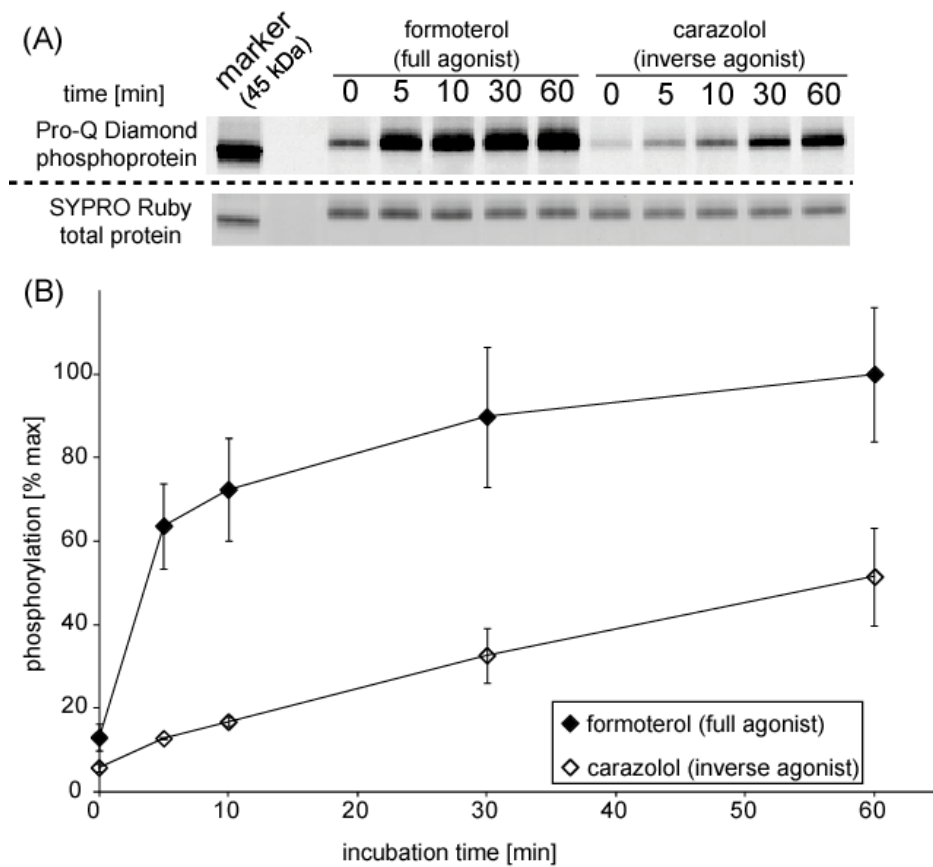
### 3-3. GRK2 による $\beta_2AR$ -rHDL のリン酸化解析

3-1 にて *in vitro* PTS を用いて調製した  $\beta_2AR$ -rHDL が活性を保持しているか否かを評価する為に、3-2.にて調製した GRK2 によるリン酸化アッセイを行った。GRK2 によるリン酸化速度が、 $\beta_2AR$  に結合したリガンドの種類に依存して変化するか否か、観測されたリン酸化速度が先行報告において解析されている、野生型  $\beta_2AR$  のリン酸化速度と比較して大きく変化しているか否かを指標として、*in vitro* PTS を用いて調製した  $\beta_2AR$ -rHDL が活性を保持しているか否かを評価した。

調製した  $\beta_2AR$ -rHDL を、完全アゴニストである formoterol 結合状態、あるいは逆アゴニストである carazolol 結合状態としたうえで、GRK2、ATP を混合し、インキュベートする事によりリン酸化反応を行った。反応液の SDS-PAGE を行い、リン酸基数に比例した蛍光強度を与える Pro-Q Diamond (Molecular Probes)、及び、総タンパク質

量に比例した蛍光強度を与える SYPRO Ruby (Molecular Probes) により染色し、 $\beta_2$ AR に由来するバンドの蛍光強度を解析する事により、リン酸化の進行度を評価した [29]。

$\beta_2$ AR に由来するバンドの強度を解析したところ、完全アゴニスト結合状態、逆アゴニスト結合状態のいずれにおいても、Pro-Q Diamond 染色ではインキュベート時間に応じて蛍光強度増大が観測された一方で、SYPRO Ruby 染色により観測される蛍光強度はインキュベート時間に依らずほぼ一定であった (**Fig.3-12 (A)**)。この事から、インキュベートに伴い  $\beta_2$ AR が GRK2 によりリン酸化されていると考えた。また、リン酸化速度を完全アゴニスト結合状態と逆アゴニスト結合状態で比較したところ、完全アゴニスト結合状態の方が、逆アゴニスト結合状態と比較してよりリン酸化速度が亢進している事が分かった (**Fig.3-12 (B)**)。さらに、完全アゴニスト存在下でリン酸化を行った際には、反応開始 30 分程度でリン酸化が~ 80 % 進行しており、この速度は、リポソームに再構成した野生型  $\beta_2$ AR を GRK2 によりリン酸化した先行報告の結果と対応していた [30]。以上の事から、*in vitro* PTS を用いて調製した  $\beta_2$ AR-rHDL は、リガンド依存的に GRK2 によりリン酸化される活性を保持していると結論した。



### Fig.3-12 GRK2 による $\beta_2$ AR-rHDL のリン酸化アッセイ

(A) Pro-Q Diamond (上段) および SYPRO Ruby (下段) により染色した  $\beta_2$ AR に由来するバンドの染色像。左側に formoterol (full agonist) 結合状態、右側に carazolol (inverse agonist) 結合状態の結果を示す。

(B) インキュベート時間に対するリン酸化の進行度のプロット

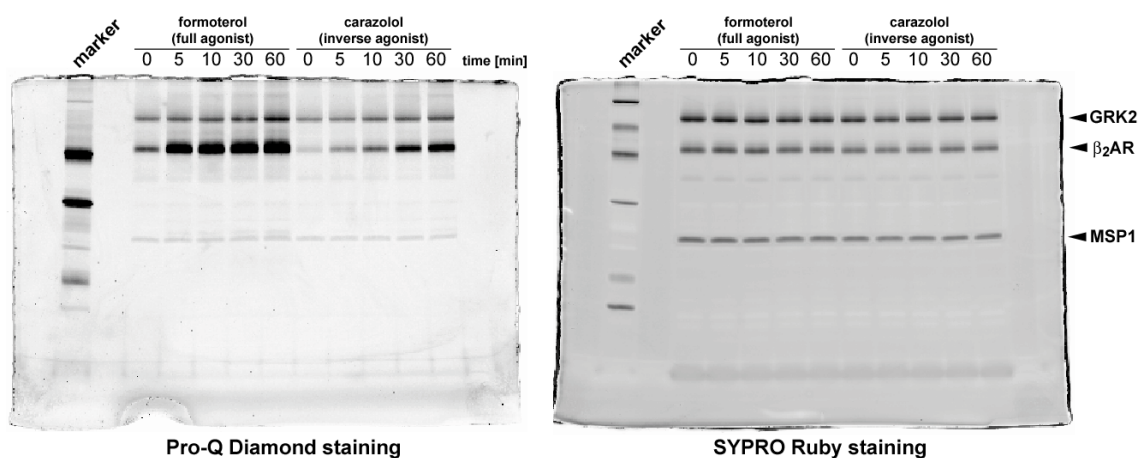


Fig.3-13 リン酸化解析に用いたゲルの全体像

### 3-4. $\beta_2$ AR-rHDL C 末端領域を観測対象とした NMR 解析

ここまでの検討により、C 末端領域のみに安定同位体標識を施した  $\beta_2$ AR-rHDL を調製し、これが活性を保持している事を確認した。そこで、調製した  $\beta_2$ AR-rHDL の NMR 解析を非リン酸化状態、リン酸化状態の両方で行う事により、リガンド依存的なリン酸化が C 末端領域のどの残基で生じているのか、リン酸化に伴う構造・運動性の変化が C 末端領域に生じているか否かを解析した。

#### 3-4-1. $\beta_2$ AR-rHDL の NMR シグナルの帰属の指針

タンパク質の主鎖 NMR シグナルの帰属を行う上では、均一( $^2\text{H}$ )  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識を施したサンプルで一連の三重共鳴測定を行い、 $\text{C}\alpha$ 、 $\text{C}\beta$ 、 $\text{CO}$  の化学シフトのマッチングに基づく連鎖帰属を行う方法が一般的である[31]。しかしながら、確立した方法に従い調製した  $\beta_2$ AR-rHDL は、 $\text{TM-Int}_N$  の培地当たりの収量が  $\sim 150 \mu\text{g/L culture}$  と低いために、高濃度の試料を調製する事が困難である。このため、 $\text{C}\alpha$  の化学シフトのマッチングを行う上で必要な  $\text{HNCA}$ 、 $\text{HN(CO)CA}$  は十分な感度でシグナルを検出する事が可能であったものの、 $\text{C}\beta$  の化学シフトのマッチングを行う上で必要な  $\text{HNCACB}$ 、 $\text{HN(CO)CACB}$ 、 $\text{CO}$  の化学シフトのマッチングを行う上で必要な  $\text{HN(CA)CO}$  においては、十分な感度でシグナルを検出する事ができなかった。

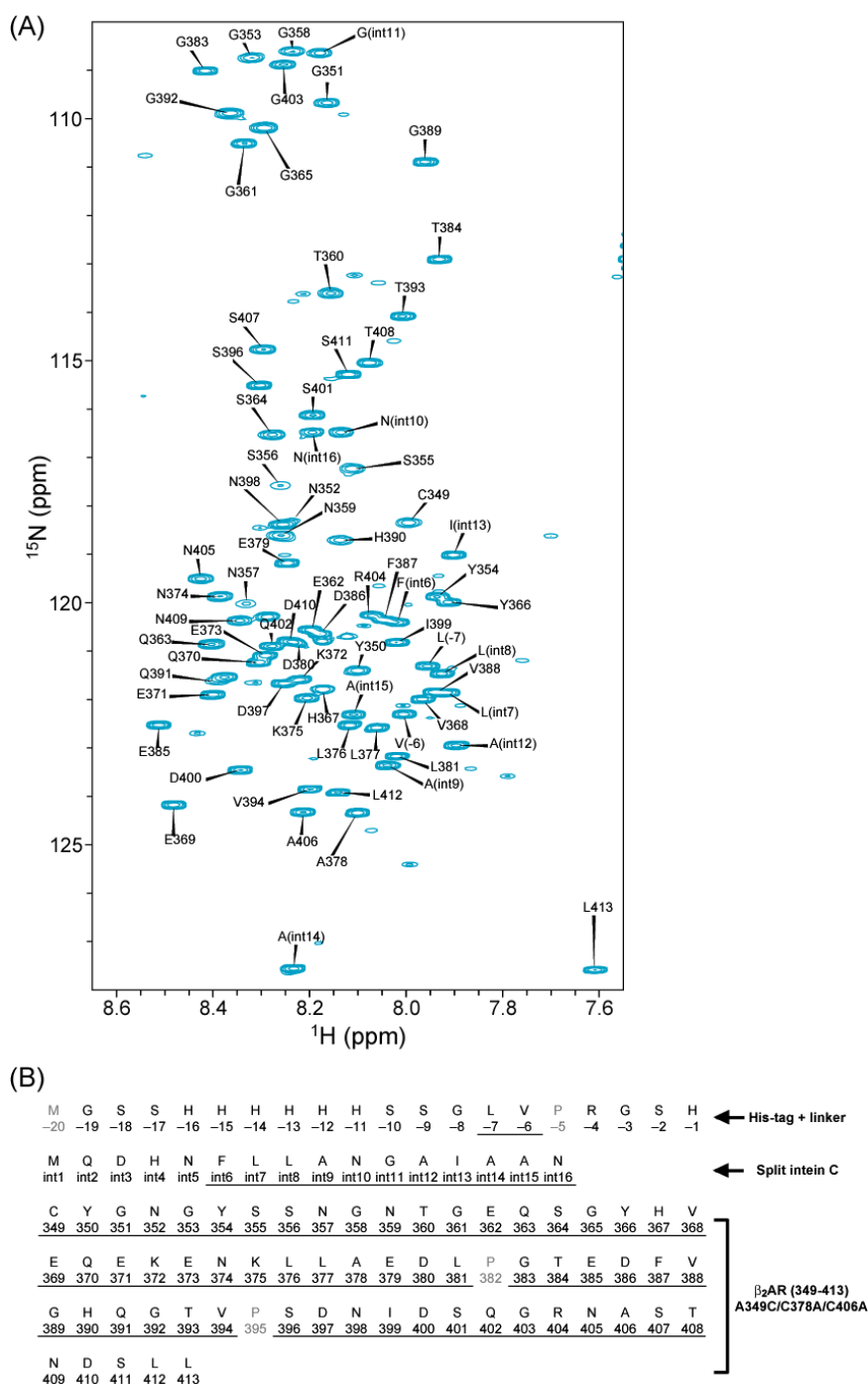
予備的な検討の結果から、 $\beta_2$ AR-rHDL C 末端領域の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuclear single quantum coherence (HSQC) スペクトルで観測されるシグナルは、*in vitro* PTS 反応の前駆体として調製した  $\text{Int}_C$ -Cterm の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルで観測されるシグナルと化学シフトがよく一致している事が分かった。 $\text{Int}_C$ -Cterm は  $\text{M9/D}_2\text{O}$  培地より  $\sim 8 \text{ mg/L culture}$  と高収量で得られるため三重共鳴測定に要する高濃度のサンプル調製が容易である。したがって、 $\beta_2$ AR-rHDL の NMR シグナルの帰属を得るために、まず

Int<sub>C</sub>-Cterm の NMR シグナルを C $\alpha$ 、C $\beta$ の化学シフト値のマッチングに基づき帰属することとした。その後、Int<sub>C</sub>-Cterm の NMR スペクトルと  $\beta_2$ AR-rHDL C 末端領域の NMR スペクトルを比較する事により、Int<sub>C</sub>-Cterm で得られている帰属を  $\beta_2$ AR-rHDL へ移行した。その後、この方法により行った帰属の妥当性を、 $\beta_2$ AR-rHDL のスペクトルで観測されている C $\alpha$ の化学シフト値のマッチングから検証することとした。

### 3-4-2. Int<sub>C</sub>-Cterm の NMR シグナルの帰属

均一  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識を施した Int<sub>C</sub>-Cterm の、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC、HNCACB、HN(CO)CACB、HNCA、HN(CO)CA を測定し、C $\alpha$ 、C $\beta$ のマッチングに基づく主鎖連鎖帰属を行った。理論上観測可能な 97 残基に対して、76 個の主鎖アミド基に由来する NMR シグナルを観測し、これらすべての帰属を完了した (**Fig.3-14 (A)**)。特に、 $\beta_2$ AR C 末端領域に対応する配列に関しては、理論上観測可能な 63 残基全てを帰属する事に成功した (**Fig.3-14 (B)**)。この事から、 $\beta_2$ AR-rHDL の NMR シグナルへ帰属を移行するうえで十分な帰属を達成できたと結論した。

未帰属の残基は、H<sub>6</sub> タグ、リンカー、Int<sub>C</sub> に由来する残基であり、これらの領域に分布する残基には、G、S、H といった、アミドプロトンと溶媒のプロトンの交換が比較的速いアミノ酸種が多く含まれる。この事から、これらの領域に分布する残基の多くは、アミドプロトンと溶媒のプロトンとの交換に由来する化学交換によりシグナルが広幅化しており、その結果 NMR シグナルが観測されていないと考えた。



**Fig.3-14**

(A) Int<sub>C</sub>-Cterm の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの帰属

(B) Int<sub>C</sub>-Cterm の一次配列

帰属が確立した残基に下線を付した。主鎖アミド基のシグナルが観測されない残基をグレーで示した。

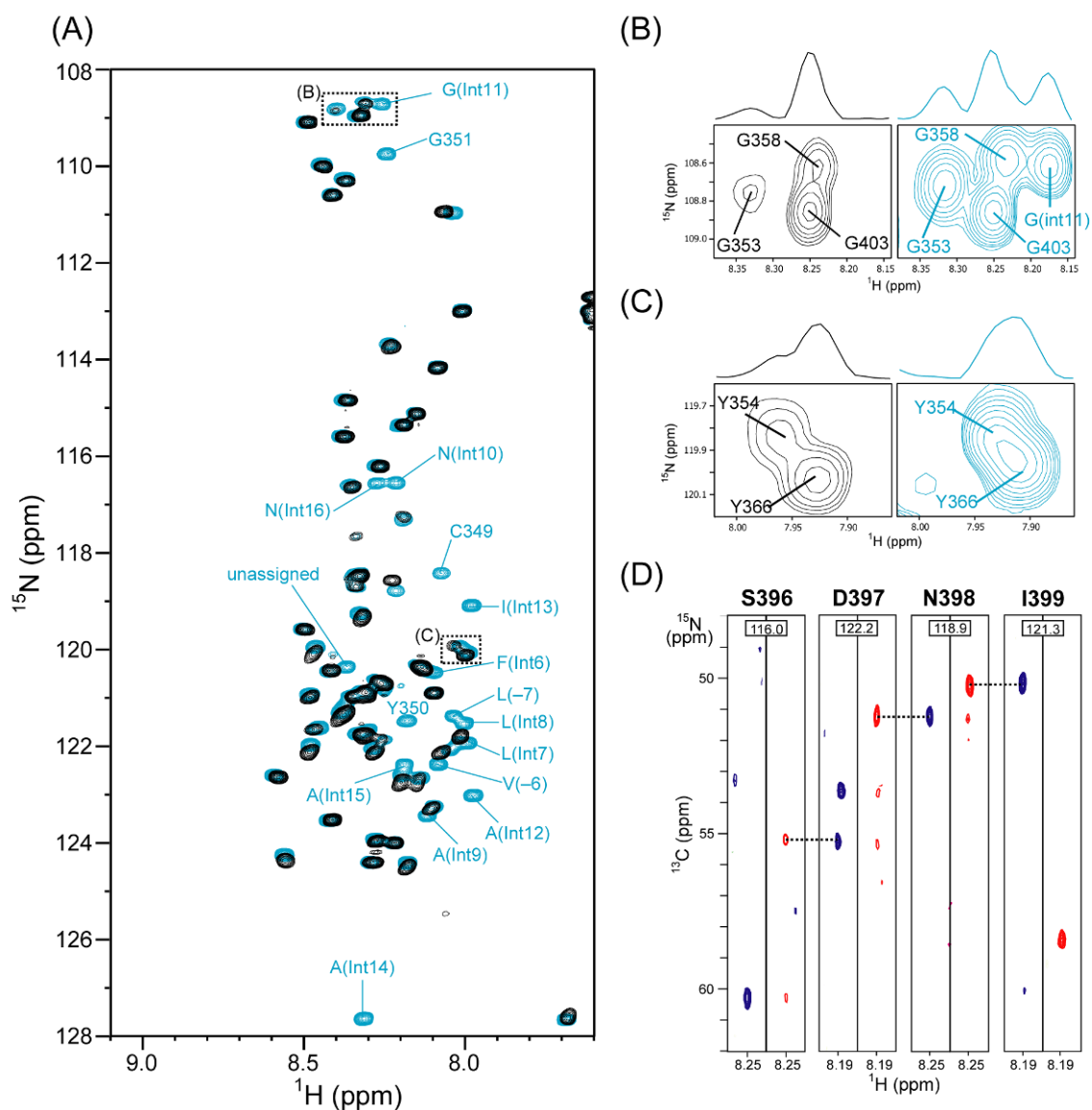
### 3-4-3. 非リン酸化状態の $\beta_2$ AR-rHDL の NMR シグナルの帰属

次に、C 末端領域を  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識した、非リン酸化状態の  $\beta_2$ AR-rHDL の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC、TROSY-HNCA、TROSY-HN(CO)CA を測定した。

まず、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを解析したところ、理論上観測可能な 63 残基に対し、59 個のシグナルが観測されていた。得られたスペクトルを 3-4-2. で帰属を確立した Int<sub>C</sub>-Cterm の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルと比較したところ、 $\beta_2$ AR-rHDL で観測されているシグナルはすべて、Int<sub>C</sub>-Cterm で  $\beta_2$ AR の残基番号 353 以降の残基由来と帰属されたシグナルと化学シフトが一致していた (**Fig.3-15**)。したがって、これらのシグナルについては Int<sub>C</sub>-Cterm で得られた帰属を  $\beta_2$ AR-rHDL のスペクトルに移行した。シグナルが観測されていない残基は、C349、Y350、G351、N352 の 4 残基であった。これらの残基に一次配列上近接している G353 や Y354 に関しては、 $\beta_2$ AR-rHDL のスペクトル上では Int<sub>C</sub>-Cterm のスペクトル上と比較して相対的なシグナル強度が減少していた事から、これらの領域は分子運動が抑制されており回転相関時間  $\tau_c$  が増大している、あるいは何らかの化学交換が生じている等の原因により、横緩和速度  $R_2$  が増大しており、その結果シグナルが観測されていないと考えた (**Fig.3-15 (B), (C)**)。

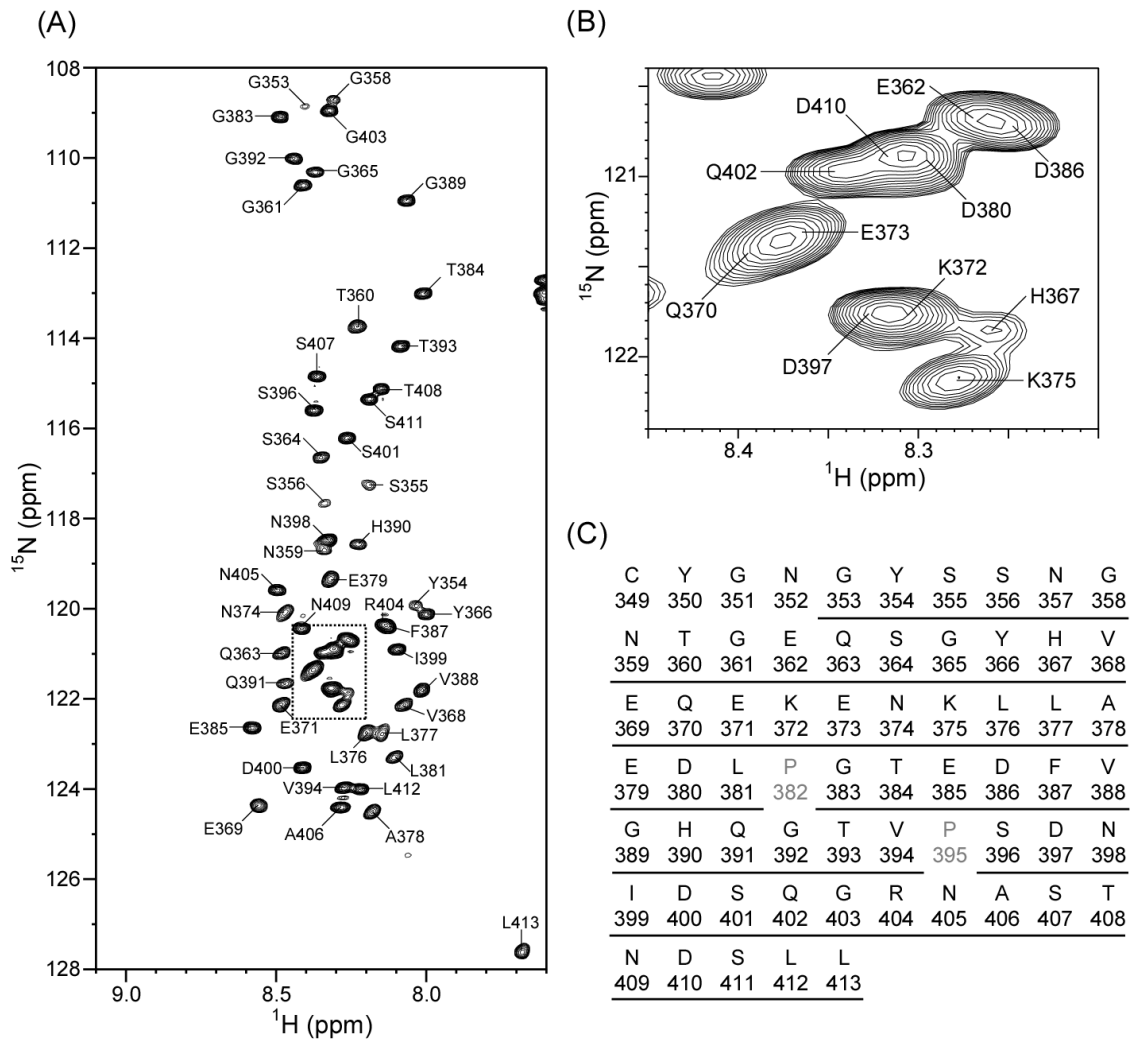
Int<sub>C</sub>-Cterm から移行した帰属の妥当性を検証する為に、TROSY-HNCA、TROSY-HN(CO)CA 測定を行った。その結果、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル上で観測されている残基に関して、シグナルを観測する事ができた。C $\alpha$ の化学シフトのマッチングを行い、Int<sub>C</sub>-Cterm から移行した帰属に矛盾がなかった事から、帰属が妥当である事が支持された (**Fig.3-15 (D)**)。





**Fig.3-15**

(A)  $\beta_2\text{AR-rHDL}$  (黒) と Int<sub>C</sub>-Cterm (シアン) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの重ね合わせ。Int<sub>C</sub>-Cterm のスペクトルでのみ観測されているシグナルに帰属を付した。  
 (B) (C) スペクトルの拡大と投影図  
 (D)  $\beta_2\text{AR-rHDL}$  の TROSY-HNCA (赤) 、TROSY-HN(CO)CA (青) に基づく帰属の確認。S396 ~ I399 の strip を一例として示した。



**Fig.3-16**

(A) 非リン酸化状態の  $\beta_2$ AR-rHDL の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの帰属

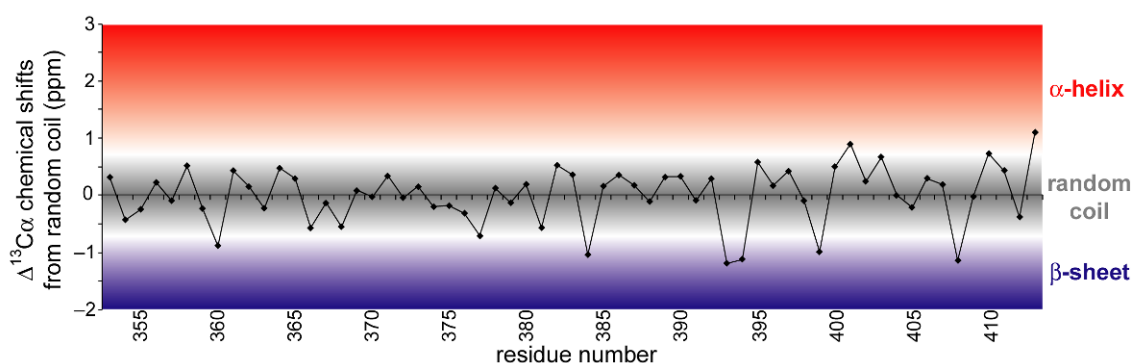
(B) スペクトルの拡大図

(C)  $\beta_2$ AR-rHDL の観測対象とする C 末端領域の一次配列。帰属を確立した残基に下線を付した。主鎖アミド基が観測されないプロリン残基をグレーで示した。

### 3-4-4. 非リン酸化状態の $\beta_2$ AR-rHDL C 末端領域の二次構造

タンパク質の主鎖  $C\alpha$  の化学シフトは、二次構造の情報を反映する事が報告されている[32]。そこで、観測した  $C\alpha$  の化学シフトをもとに非リン酸化状態の  $\beta_2$ AR C 末端領域の二次構造の推定を行った。各残基について、観測された化学シフト値と、当該残基のアミノ酸種のランダムコイル状態における化学シフト値の差を算出し、残基ごとにプロットした。その結果、観測された残基の多くが、ランダムコイル相当の値を示しており、3残基以上連続して  $\alpha$ -ヘリックスもしくは  $\beta$ -sheet に相当する値を示している領域は存在しなかった (**Fig.3-17**)。したがって、 $\beta_2$ AR C 末端領域は、非リン酸化状態において、特定の二次構造を形成しないと結論した。

3-4-3. の  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC スペクトルで観測されているシグナルの  $^1H$  の化学シフトは、8.0 ~ 8.5 ppm の付近に限局しており、各シグナルの線幅は  $\beta_2$ AR-rHDL の見かけの分子量~ 200 kDa に対して先鋭である (**Fig.3-16**)。このようなスペクトルは、タンパク質中において特定の二次構造を形成せず、運動性が高い領域に由来する残基に特徴的なものであり、 $C\alpha$  の化学シフトから導いた結論と合致していると考えた。



**Fig.3-17 被リン酸化状態の  $\beta_2$ AR C 末端領域の二次構造推定**

観測された  $^{13}C\alpha$  の化学シフトと、各アミノ酸種のランダムコイル状態の  $^{13}C\alpha$  の化学シフトの差を残基ごとにプロットした。

### 3-4-5. リン酸化状態の $\beta_2$ AR-rHDL の NMR シグナルの帰属

次に、完全アゴニスト結合状態にて、GRK2 により 1 時間リン酸化反応を行った後の  $\beta_2$ AR-rHDL を調製し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC、TROSY-HNCA、TROSY-HN(CO)CA を測定した。 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを非リン酸化状態のスペクトルと比較したところ、多くのシグナルは非リン酸化状態のスペクトルと化学シフトが一致していたため、これらのシグナルについては非リン酸化状態における帰属を移行した。非リン酸化状態のスペクトルと化学シフトが一致していない残基に関しては、TROSY-HNCA、TROSY-HN(CO)CA 測定により得られた  $\text{C}\alpha$  の化学シフトのマッチングに基づき帰属を行った (**Fig.3-18 (A)**)。その結果、以下の事が分かった。

- ① G361 ~ V368 に由来する NMR シグナルは、非リン酸化状態とは異なる化学シフトを示している。
- ② S396、D400、S401、G403、A406、S407、T408、N409、S411 に関しては、非リン酸化状態と化学シフトが一致するシグナルと、非リン酸化状態とは化学シフトが異なるシグナルの 2 つが観測されている。
- ③ ①、②で観測された、リン酸化後のスペクトルにのみ観測されているシグナルのうち、S364、S396、S401、S407 については、 $^1\text{H}$  の化学シフトが ~ 9 ppm であり、非リン酸化状態のシグナルと比べて大きく低磁場シフトしている。
- ④ G353 ~ T360 に由来する NMR シグナルは、非リン酸化状態においては観測されていたがリン酸化後のスペクトル上では観測されていない。

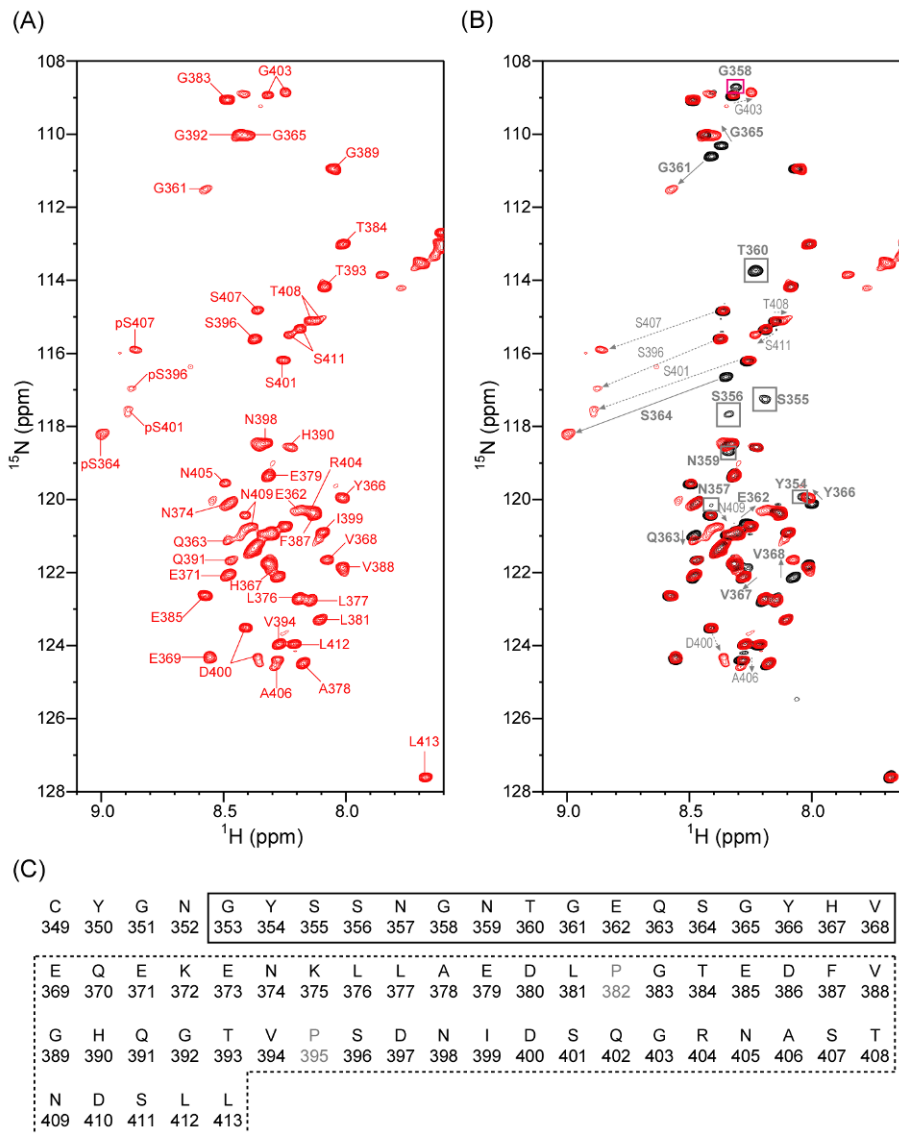
①の残基群のうち、S364 は、③で記した顕著な低磁場シフトを示した残基である。セリン・スレオニン残基の主鎖アミド基の NMR シグナルは、側鎖のリン酸化に伴い、その  $^1\text{H}$  の化学シフトが顕著に低磁場シフトする事が知られている[33](**Fig.3-19**)。S364 は非リン酸化状態に相当するシグナルが完全に消失した上で、低磁場シフトしたシグナルが観測されている事から、今回のリン酸化反応条件で ~100 % 直接リン酸化を

受けていると結論した。また、直接のリン酸化された残基に一次配列上近接する残基も、わずかに化学シフトが変化する[34]。①の残基群は全て S364 に一次配列上近接しているため、①の残基群のうち、S364 以外の残基に由来するシグナルは、S364 のリン酸化の影響を受けて化学シフトが変化していると結論した。

②の残基群のうち、S396、S401、S407 は、③で示した顕著な低磁場シフトを示した残基であり、直接リン酸化されている事が示唆される。これらのシグナルは、リン酸化反応に伴い非リン酸化状態に由来するシグナルが 30 ~ 60 %の強度減少を示している事から、S396、S401、S407 は今回のリン酸化反応条件で 30 ~ 60 %リン酸化を受けていると結論した。また、②の残基群は全て S396、S401、S407 に一次配列上近接している事から、②の残基群のうち、S396、S401、S407 以外の残基に由来するシグナルは、S396、S401、S407 の部分的なリン酸化の影響を受けて、異なる化学シフトを与えるシグナルを新たに与えていると結論した。

④の残基群には、先行報告によりリン酸化を受ける事、リン酸化がアレクチンを紹介したインターナリゼーションに重要である事が示唆されている残基である S355、S356、T360 を含んでいる。したがって、これらの残基のうちいくつかは完全にリン酸化され、リン酸化に伴い、NMR シグナルの強度減少を伴う構造変化・運動性の変化を生じている可能性が高いと考えた。

今回観測対象とする C 末端領域の中で、G353-V368 に存在するセリンおよびスレオニン残基はほぼ完全にリン酸化を受けており、これらは一次配列上 TM ドメインに近接した残基である。以降、この領域を TM-Proximal region (P-region) と呼ぶこととする。また、E369 ~ L413 に存在するセリンおよびスレオニン残基は部分的にリン酸化を受けており、これらは一次配列上 TM ドメインから離れた残基である。以降、この領域を TM-distal region (D region) と呼ぶこととする。



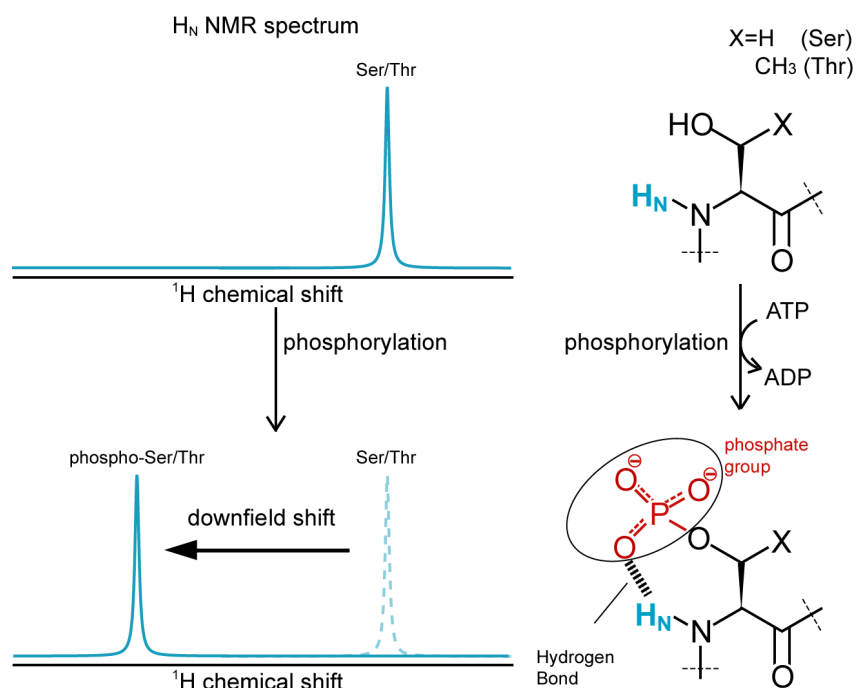
**Fig.3-18**

(A) 完全アゴニスト結合状態で GRK2 によりリン酸化した後の  $\beta_2\text{AR}$ -rHDL の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルと、確立した帰属

(B)  $\beta_2\text{AR}$ -rHDL の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルのリン酸化に伴う変化

リン酸化に伴ってシグナルが消失した残基は、リン酸化前のシグナルを四角で囲い、太字で示した。リン酸化に伴い、非リン酸化状態のシグナルが完全に消失し、新たなシグナルを与えた残基は、リン酸化前後のシグナルを実線の矢印で結び、太字で示した。リン酸化に伴い、非リン酸化状態のシグナルとともに、新たなシグナルが観測された残基は、リン酸化前後のシグナルを破線の矢印で結び、細字で示した。

(C)  $\beta_2\text{AR}$  C 末端領域の一次配列。P region を実線、D region を破線で囲って示した。



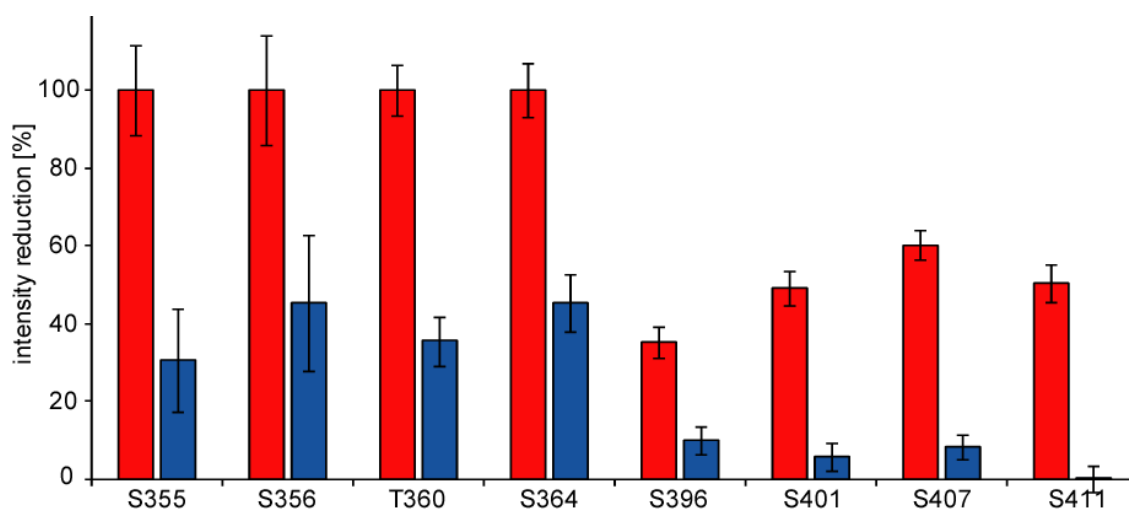
**Fig.3-19 リン酸化による  $^1\text{H}_\text{N}$  NMR シグナルの低磁場シフト**

セリンおよびスレオニン残基は、側鎖のリン酸化に伴い、リン酸基が主鎖のアミドプロトンと水素結合を形成する。この結果、主鎖アミドプロトンの NMR シグナルは顕著な低磁場シフトを示す。

### 3-4-6. リン酸化によるスペクトル変化のリガンド依存性

3-3.における解析により、調製した  $\beta_2\text{AR-rHDL}$  はリガンド依存的にリン酸化を受ける事が明らかとなった。しかしながら、リン酸化反応のリガンド依存性が、C 末端上に存在する全ての残基で同様に生じるものであるのか、それとも特定の部位のリン酸化のみがリガンド依存的に制御されるかは不明である。そこで、逆アゴニスト結合状態で同様にリン酸化反応を行った  $\beta_2\text{AR-rHDL}$  を調製し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定した。先行報告において被リン酸化残基として同定されているセリン・スレオニン残基について、非リン酸化状態に相当する NMR シグナルの、リン酸化に伴うシグナル強度減少率を残基ごとにプロットした。

その結果、解析対象とした全てのシグナルについて、完全アゴニスト結合状態の方が、逆アゴニスト結合状態と比較してよりシグナル強度減少率が大きい事が明らかとなった (Fig.3-20)。この事から、完全アゴニスト結合状態と逆アゴニスト結合状態でのリン酸化速度の違いは、部位特異的に生じるものではなく、C末端上のすべての残基で生じていると考えた。

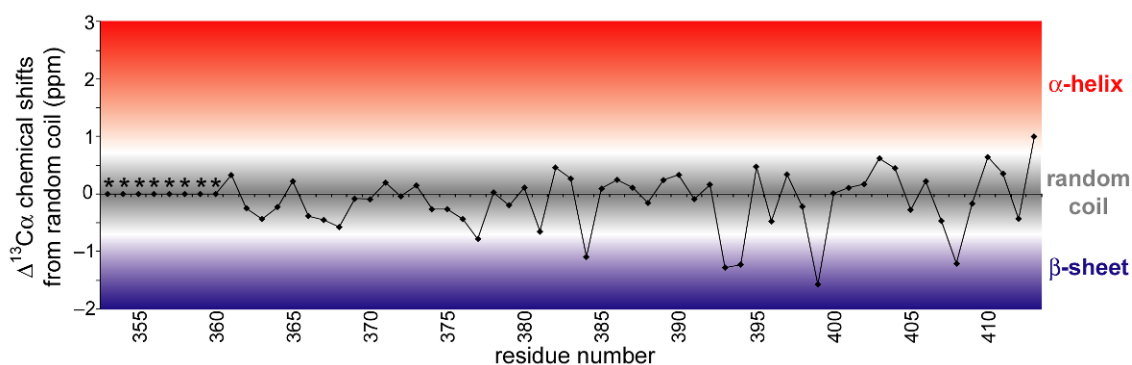


**Fig.3-20** リン酸化に伴う、非リン酸化状態に由来するシグナルの強度減少率  
 先行報告にて被リン酸化残基として同定されているセリンおよびスレオニン残基について、非リン酸化状態に由来するシグナルの、リン酸化反応に伴う強度減少率を残基ごとにプロットした。赤のバーは完全アゴニスト結合状態、青のバーは逆アゴニスト結合状態でリン酸化反応を行った際のシグナル強度減少率を示す。



### 3-4-7. リン酸化状態の $\beta_2$ AR C 末端領域の二次構造

3-4-5.にて調製したリン酸化状態の  $\beta_2$ AR-rHDL は、P region に分布する G353 ~ T360 に由来する NMR シグナルは観測できていないものの、D region 全体を含むその他のシグナルは、C $\alpha$ の化学シフトが得られている。そこで、リン酸化された  $\beta_2$ AR C 末端領域の二次構造を推定した[32]。なお、非リン酸化状態・リン酸化状態双方のシグナルが観測されている残基については、リン酸化状態に由来するシグナルの C $\alpha$ の化学シフト値を解析に用いた。各残基について、観測された化学シフト値と、当該残基のアミノ酸種のランダムコイル状態における化学シフト値の差を算出し、残基ごとにプロットした。その結果、観測された残基の多くが、ランダムコイル相当の値を示しており、3 残基以上連続して  $\alpha$ -ヘリックスもしくは  $\beta$ -sheet に相当する値を示している領域は存在しなかった。したがって、 $\beta_2$ AR C 末端領域のうち、P region のうち TMドメインから離れた G361-V368 と、D region 全体が、リン酸化後も、リン酸化前と同様に、特定の二次構造を形成しない状態にあると結論した。



**Fig.3-21 リン酸化状態の  $\beta_2$ AR C 末端領域の二次構造推定**

観測された  $^{13}\text{C}\alpha$ の化学シフトと、各アミノ酸種のランダムコイル状態の  $^{13}\text{C}\alpha$ の化学シフトの差を残基ごとにプロットした。非リン酸化状態、リン酸化状態両方のシグナルが観測されている残基については、リン酸化状態に由来するシグナルの化学シフトを用いてプロットを行った。

### 3-4-8.側鎖メチル基をプローブとした NMR 解析

ここまでの主鎖を解析対象とした  $\beta_2$ AR C 末端領域の NMR 解析において、非リン酸化状態においては P region、D region 共に特定の二次構造を形成しない状態にある事、リン酸化後には P region のうち TM ドメインから離れた残基と D region が、特定の二次構造をとらない状態にある事が明らかとなった。一方で、リン酸化状態においては、P region のうち TM ドメインに近接する G353 ~ T360 の NMR シグナルが観測されていなかった。非リン酸化状態においてはシグナルが観測されていたにもかかわらず、リン酸化反応に伴いシグナルが観測されなくなった事から、当該領域に、リン酸化に伴い NMR シグナルの強度減少を誘起するような構造・運動性の変化が生じている可能性が考えられる。

そこで、この領域にリン酸化に伴いどのような変化が起こっているかを解析する為に、主鎖アミド基よりも高感度に観測可能な、側鎖メチル基を観測対象とした NMR 解析を行うこととした。側鎖メチル基は、磁氣的に等価なプロトンを 3 個有している点、メチル基軸周りの速い運動性を有する為に横緩和速度が遅い点、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) スペクトルの測定によりメチル基内部のプロトン間の双極子-双極子相互作用の自己相関緩和と交差相関緩和が抑制的に働くために横緩和速度が遅い  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  多量子コヒーレンスの成分を検出できる点のため、高感度で NMR シグナルを観測する事が可能である[35]。したがって、主鎖を観測対象とした NMR 解析においては観測する事ができなかったリン酸化後の G353 ~ T360 の領域に関しても、側鎖メチル基をプローブとする事により NMR 解析が可能になると考えた。

プローブとして、リン酸化後の状態でシグナルが観測されなかった領域に唯一存在するメチル基である、T360 の側鎖メチル基を用いることとした。当該領域から離れた部位のリン酸化の影響を排除するとともに、他のスレオニン側鎖メチル基に由来

するシグナルを除去して T360 側鎖メチル基に由来するシグナルの線形を詳細に解析する為に、T384A/T393A/S396A/S401A/S407A/T408A/S411A 変異体を解析した。この変異体は、アレスチンを介したインターナリゼーションが野生型と同等に起こる事が確認されている[12]。この変異体に、スレオニン・イソロイシン側鎖メチル基選択的<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub> 標識を施す事で、P region に位置する T360 と、D region に位置する I399 の側鎖メチル基のみを観測対象として、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC スペクトルのリン酸化に伴う変化を解析した[36] [37]。

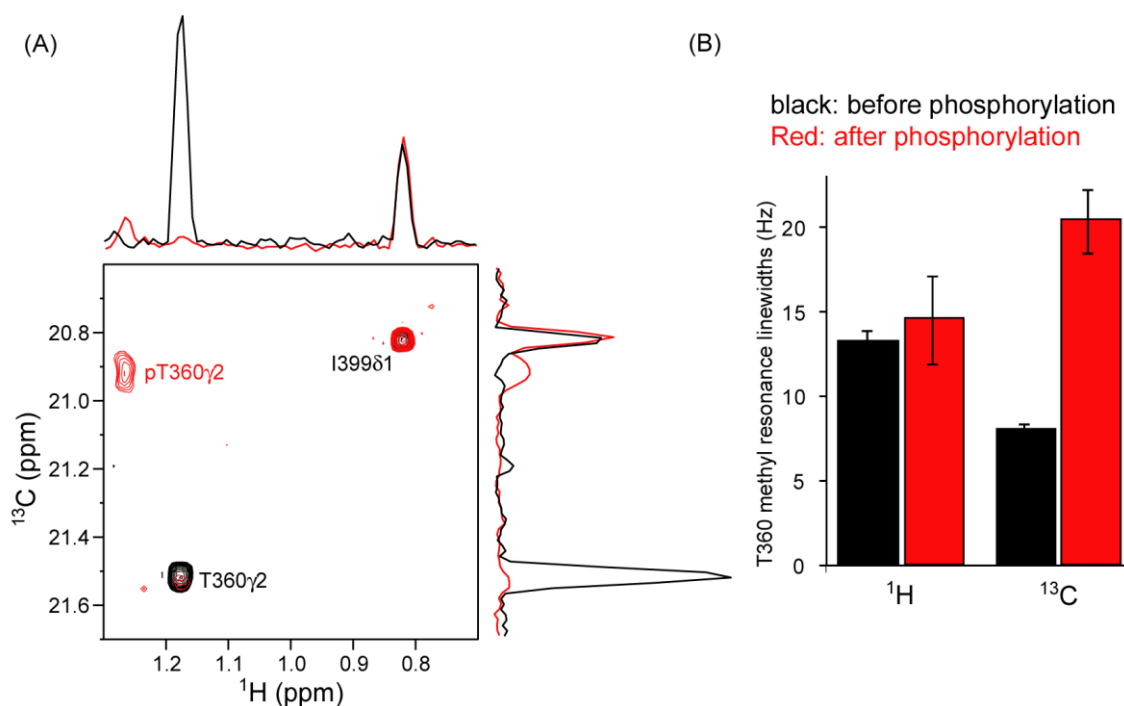
### 3-4-9. T360 メチルシグナルのリン酸化に伴う変化

3-4-8. で検討した標識体を用いて、まず、非リン酸化状態で<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC スペクトルを測定した。その結果、T360、I399 の側鎖メチル基に相当するシグナルを観測する事ができた(**Fig.3-22 (A)**)。非リン酸化状態において、P region に位置する T360、D region に位置する I399 共にシグナルは非常に先鋭であった。この事は、主鎖アミド基を用いた解析において β<sub>2</sub>AR C 末端領域が特定の二次構造を形成していなかった事を考えると妥当な結果である。

次に、完全アゴニスト結合状態において、GRK2 によりリン酸化反応を行ったうえで、同様の測定を行った。その結果、リン酸化部位を近傍に有さない I399 のシグナルには変化がない一方で、T360 のシグナルは、大きな化学シフト変化を示すとともに、シグナル強度が大きく減少していた (**Fig.3-22 (A)**)。化学シフトの変化は、この残基が直接リン酸化を受けている事を強く示唆している。また、シグナル強度減少は、3-4-5.の主鎖アミド基を観測対象とした解析で、T360 を含む領域のシグナルがリン酸化に伴い消失していたことと対応する結果である。

T360 のシグナルに観測されたシグナル強度減少の原因を調べるために、ウィンドウ関数をかけずにフーリエ変換を行ったスペクトル中における T360 メチルシグナ

ルの、 $^1\text{H}$  方向及び  $^{13}\text{C}$  方向の線幅を算出し、リン酸化前後で比較を行った。その結果、リン酸化に伴って、 $^1\text{H}$  方向の線幅には大きな変化はみられていないのに対し、 $^{13}\text{C}$  方向の線幅は顕著に増大している事が分かった (**Fig.3-22 (B)**)。この事は、リン酸化後において T360 のシグナル強度が減少している原因が、リン酸化後において T360 の周囲が、側鎖メチル基  $^{13}\text{C}$  の化学シフトが異なる複数の状態を交換しており、これに起因する広幅化を生じていることである事を示している。側鎖メチル基の  $^{13}\text{C}$  の化学シフト値は、側鎖の回転異性体の存在割合に依存する事が報告されている[38]。したがって、リン酸化後の P region は、T360 側鎖の回転異性体の存在割合が異なる複数の状態間を交換していると結論した。



**Fig.3-22**

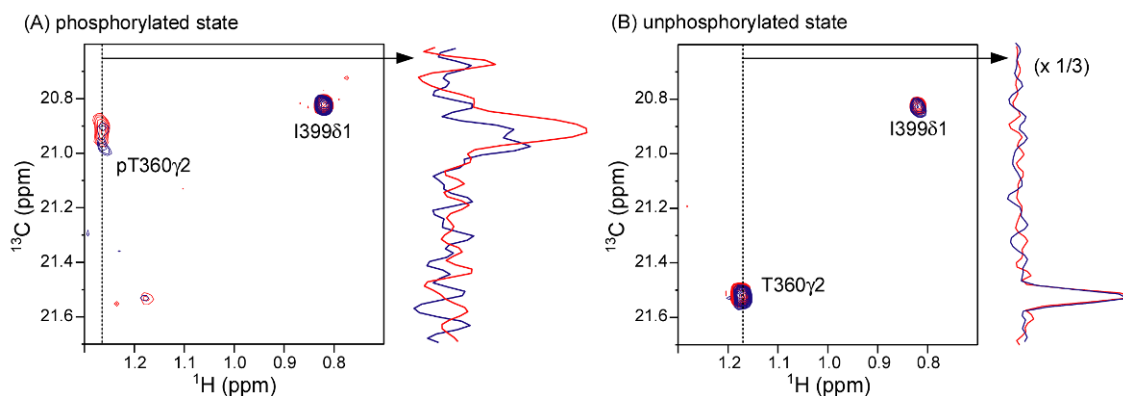
(A) T360 $\gamma$ 2、I399 $\delta$ 1 メチルシグナルを解析対象とした  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル  
 黒でリン酸化前、赤でリン酸化後のスペクトルを重ねて示す。 $^1\text{H}$  方向、 $^{13}\text{C}$  方向の投影図を示した。I399 $\delta$ 1 のシグナルは  $^{13}\text{C}$  方向に折り返している。  
 (B) T360 $\gamma$ 2 メチルシグナルの  $^1\text{H}$  方向、 $^{13}\text{C}$  方向の線幅  
 黒でリン酸化前、赤でリン酸化後の線幅を示す。線幅の算出はウィンドウ関数を外してフーリエ変換を行ったスペクトルを用いて行った。

### 3-4-10. T360 側鎖メチル基の NMR シグナルのリガンド依存性

ここまでの解析において、 $\beta_2$ AR C 末端領域は、リン酸化前は特定の二次構造をとらないが、リン酸化後の P region が、T360 側鎖の回転異性体の存在割合が異なる複数の状態を交換している事が明らかとなった。この結果を受けて、「 $\beta_2$ AR C 末端領域の P region は、リン酸化に伴って TM ドメインの細胞内側と相互作用しており、この相互作用により T360 側鎖のコンフォメーションに擾動が生じている」、という作業仮説を立てた。 $\beta_2$ AR TM ドメインの細胞内領域は、結合するリガンドが完全アゴニストである場合には主に活性化コンフォメーションをとる一方で、結合するリガンドが逆アゴニストである場合には主に不活性化コンフォメーションをとる[9]。したがって、もし上記の作業仮説が正しいならば、リン酸化状態の T360 メチルシグナルは、結合するリガンドが完全アゴニストである場合と、逆アゴニストである場合には、T360 周囲と TM ドメインの相互作用が変調を受けることにより、異なる線形を与える事が予想される。そこで、3-4-9.にて NMR 解析を行った、完全アゴニスト結合状態でリン酸化反応を行った  $\beta_2$ AR-rHDL を、完全アゴニスト結合状態から逆アゴニスト結合状態へと交換した上で、再度  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルを測定した。

3-4-9.にて測定した、完全アゴニスト結合状態のスペクトルと、本節にて測定した逆アゴニスト結合状態のスペクトルを比較したところ、リン酸化部位を近傍に有さない I399 のシグナルには変化がない一方で、T360 のシグナルは、完全アゴニスト結合状態と比較して、逆アゴニスト結合状態では大きく強度減少していた (**Fig-3-23 (A)**)。この事は、T360 周囲の化学環境が、細胞内領域が開いたコンフォメーションをとる完全アゴニスト結合状態と、細胞内領域が閉じた構造をとる逆アゴニスト結合状態では異なっている事を示している。また、同様の解析を非リン酸化状態でも行ったところ、完全アゴニスト結合状態と逆アゴニスト結合状態ではスペクトルに変化は見られなかった (**Fig.3-23 (B)**)。この事は、T360 メチルシグナルのリガンド依存的な変化が、リン酸化

状態に特異的な現象である事を示している。したがって、リン酸化された  $\beta_2\text{AR}$  C 末端領域の T360 周囲の化学環境が、 $\beta_2\text{AR}$  TMドメイン細胞内側の構造と共役している事が示された。



**Fig. 3-23**

(A) リン酸化状態の  $\beta_2\text{AR}$ -rHDL の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル

(B) 非リン酸化状態の  $\beta_2\text{AR}$ -rHDL の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル

いずれも、赤で完全アゴニスト結合状態、青で逆アゴニスト結合状態のスペクトルを示す。スペクトル右に、T360 $\gamma$ 2 メチルシグナルの  $^{13}\text{C}$  方向の切り出しを示す。I399 $\delta$ 1 のシグナルは  $^{13}\text{C}$  方向に折り返している。

## 第4章 考察

### 4-1. $\beta_2$ AR C 末端領域の区分同位体標識

本研究では、*Npu/Ssp chimera DnaE* インテインによる *in vitro* PTS 反応を利用する事により、全長  $\beta_2$ AR のうち、C 末端領域に相当する残基番号 349 ~ 413 の領域のみを区分同位体標識する方法を確立した。本研究は、膜タンパク質に対し区分同位体標識を施し、NMR 解析を行う事に成功した最初の例である。

タンパク質に区分同位体標識を施すためのタンパク質連結手法として、本研究で採用した PTS 法に加え、Expressed Protein Ligation (EPL) 法や、Sortase A の酵素活性を利用した方法が報告されている[39-41]。このうち、EPL 法は、C 末端にチオエステル基を有するペプチドと、N 末端がシステイン残基から始まるペプチドが化学選択的にペプチド結合を形成する事を利用した方法である。現在のところ、反応効率が連結部位の前後のアミノ酸配列に依存しにくい、EPL 法を利用する為のタンパク質発現用ベクターがキット化されている (IMPACT<sup>TM</sup>, New England Biolabs) などの理由から、タンパク質の区分同位体標識を行うに当たり EPL 法の方が PTS 法よりも適用例が多いといえる。しかしながら、EPL 法では連結するタンパク質間に親和性がない場合には、高効率で反応を進行させるためには前駆体タンパク質をそれぞれ mM ~サブ mM の濃度で調製し、1 day 以上反応させる事が必要である[39]。また、Sortase A は、所望の連結反応の他に、逆反応により連結産物を分離する反応もまた触媒されるため、高効率の連結を達成するには逆反応を抑制する為の条件検討を必要とし、反応条件も 1 day 以上の反応時間、もしくは 37°C ~ 42 °C の反応温度と、安定性が低いタンパク質にとっては過酷な条件を必要とする報告が多い[40, 41]。本研究で解析対象とした  $\beta_2$ AR を含む多くの膜タンパク質は、異種発現による発現量の低さから、高濃度の試料調製が困難であるため、EPL 法で必要とされる高濃度の前駆体タンパク質調製は困

難であり、また、精製状態での熱安定性も低いため、EPL 法や Sortase A による長時間の連結反応も困難である。このような理由から、これまで膜タンパク質に区分同位体標識を適用した例は存在しなかった。

本研究にて適用した、*Npu/Ssp chimera DnaE* インテインを利用した PTS 法は、目的タンパク質に連結した分離インテイン間に  $\sim$ nM オーダーの高い親和性があり、前駆体タンパク質の濃度が  $\sim$  $\mu$ M オーダーであっても高効率で反応が進行する点、反応速度が速く数時間で連結反応を完了できる点が、他のタンパク質連結手法と比較して優れている[39]。この特徴は、高収量を得る事が困難であり、熱安定性も低い膜タンパク質への適用を想定する上で特に重要であり、本研究はこれを利用する事が膜タンパク質の区分同位体標識に有効である事を実証した例であるといえる。

一方で、*Npu/Ssp chimera DnaE $\Delta$ C15* を融合した  $\beta_2$ AR TM ドメインの発現量は、全長の  $\beta_2$ AR と比較して 1/3 ~ 1/4 に低下していた。この原因として、*Npu/Ssp chimera DnaE $\Delta$ C15* は比較的水溶性が低く、かさ高いタンパク質であり、これを  $\beta_2$ AR TM ドメインに連結したために、細胞膜への組み込みが起こりにくくなったためであると考えている。NMR 解析を行う上で、目的タンパク質の発現量の低下は NMR シグナルの感度低下に直結する為、今後 PTS 法による膜タンパク質の区分同位体標識をより利用しやすくするためには、水溶性に優れて、目的タンパク質の発現を阻害しない様な分離インテインの探索・改変が行われる事が必要である。

また、今回行った区分同位体標識法の特色として、TM ドメインを含んだコンストラクトの調製にはバキュロウイルス—昆虫細胞発現系を利用している一方で、C 末端領域を含むコンストラクトの調製には大腸菌発現系を利用しているという点が挙げられる。2015 年の時点で、Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb>) には 90 件の non-visual GPCR の立体構造が登録されており、このうち 81 件がバキュロウイルス—昆虫細胞発現系を用いて試料調製がなされたものである。これは、7 回膜貫通構造



の折りたたみや、細胞膜への埋め込み、糖鎖修飾や脂質修飾といった翻訳後修飾が達成され、かつ構造生物学的解析を行うに当たり十分な収量を得る上で、バキュロウイルス—昆虫細胞発現系を利用する事が有効であることに起因する。一方で、NMR解析に供する試料調製の観点では、バキュロウイルス—昆虫細胞発現系は安定同位体標識の方法論が非常に限られている[26, 42, 43]。特に、高度な重水素化が報告されていないため、高分子量のタンパク質を対象とした解析が困難である点や、転移交差飽和 (TCS) 法をはじめとする高い重水素化率を前提とする NMR 手法の適用が不可能である点が大きな問題となる[44]。一方で、大腸菌発現系は、折りたたみが困難な膜タンパク質や、翻訳後修飾を発現に必須とするタンパク質の調製には不向きであるものの、高度重水素化や、これをバックグラウンドとした上でのメチル基選択的  $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$  標識など、洗練された安定同位体標識の手法が数多く報告されている。今回行った区分同位体標識は、解析対象とするドメインのみの選択的な観測という点のみならず、全長の発現にはバキュロウイルス—昆虫細胞発現系が必須となる GPCR に対して、大腸菌発現系による洗練された同位体標識を適用した点が、従来の昆虫細胞発現系を用いた NMR 解析と比較して優れている。今後、本研究で達成した、大腸菌発現系に利用した部分的な同位体標識を適用する事により、全長発現が困難なタンパク質について、NMR を用いた構造生物学的解析が進展する事が期待される。たとえば、N 末端領域が細胞外側でペプチドリガンド結合に関与する class B GPCR は、TMドメイン単独の結晶構造[45] [46]、細胞外領域単独の NMR 構造[47] [48]が報告されているものの、全長での構造生物学的解析はなされていない。区分同位体標識により全長の条件にて細胞外領域を NMR 解析することで、細胞外領域へのリガンドの結合がどのようにシグナル伝達を誘起するかを明らかにできる可能性がある。

**Table 4-1. PTS 法と EPL 法によるタンパク質ライゲーションの特徴  
([39]より引用)**

	PTS	NCL/EPL
Minimal reactant concentrations <sup>a</sup>	nM to $\mu$ M	mM
Reaction time	min to h	h to days
Amino acid required at the C-terminal junction at ligation point	Cys, Ser, Thr <sup>b</sup>	Cys
N-terminal junction residue	Dependent on inteins	Preferably Gly or Ala <sup>75,c</sup>
Affinity between reactants	Yes, provided by split intein fragments	No
Sensitive to denaturants	Yes/no <sup>d</sup>	No
Additional reagent	No	Yes (thiol reagent)
<i>In vivo</i> ligation	Yes	No
Multi-fragment ligation	One pot/stepwise	Stepwise

<sup>a</sup> To achieve optimal yield. <sup>b</sup> Dependent on intein; adjacent residues might also affect final yield. <sup>c</sup>  $\beta$ -Branched amino acid directly N-terminal to Cys reduces final yield.<sup>37</sup> <sup>d</sup> *Npu* DnaE and *Psp* Pol-I split inteins splice well in buffer containing up to 6 M urea.

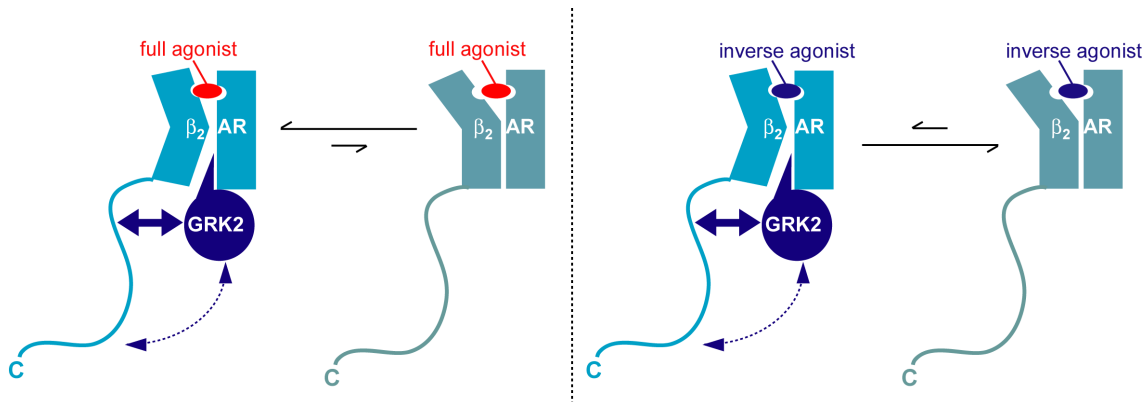
## 4-2. $\beta_2$ AR C 末端領域のリン酸化速度のリガンド依存性

GPCR と GRK2 は、その複合体の立体構造は報告がなされていないものの、生化学的な解析により、GRK2 がアゴニスト結合状態の GPCR を特異的にリン酸化する事、培養細胞内での BRET 実験により、GPCR に対する GRK2 の結合は、アゴニスト結合に伴い増強する事が、それぞれ示されている[49]。以上より GRK2 は、活性化コンフォメーションをとった GPCR TM ドメインの細胞内領域に特異的に結合し、そのキナーゼ活性が亢進するものと考えられている。一方で、多くの GPCR が GRK2 によりリン酸化を受ける事が報告されているものの、これらの GPCR の C 末端領域は一次配列に保存性が見られないため、GRK2 によるリン酸化の部位がどのようにして決定されているかは不明であった。

培養細胞を用いたリン酸化解析の先行報告により、 $\beta_2$ AR の TM ドメインに近接した領域の方がリン酸化を受けやすい傾向にある事が明らかとなっていた。しかし、この性質が単一の GRK2 によるものであるか、他のキナーゼやホスファターゼにより制御されるものであるかは不明であった。本研究では、 $\beta_2$ AR と GRK2 のみからなる再構成系による実験を行い、 $\beta_2$ AR C 末端領域のうち、TM ドメインに一次配列上近接した領域の方が、TM ドメインから離れた領域よりもリン酸化を受けやすい事を明らかとした。したがって、 $\beta_2$ AR と GRK2 間の相互作用のみで説明可能である事がはじめて明らか

となった。

一次配列に際立った特徴が見られないにもかかわらず、TMドメインに近接した領域の方が、TMドメインから離れた領域よりもリン酸化されやすかった原因として、GRK2の基質リン酸化が、GPCR TMドメインに結合したGRK2に対して空間的に近接したセリン・スレオニン残基を配列非依存的にリン酸化する事により成り立っており、C末端領域のうち、一次配列上近接している領域の方が、TMドメインに結合したGRK2に対して空間的に近接しやすいためではないかと考察した (Fig.4-1)。完全アゴニスト結合状態の方が逆アゴニスト結合状態よりもリン酸化を受けやすかった事は、完全アゴニスト結合状態の方が逆アゴニスト結合状態よりも活性化コンフォメーションの割合が多いためであると考察した (Fig.4-1)。



**Fig.4-1 GRK2による  $\beta_2$ AR のリン酸化**

GRK2は $\beta_2$ AR TMドメインと結合した状態で、C末端領域をリン酸化する。この際、GRK2には基質配列特性がなく、空間的に近接したセリンおよびスレオニン残基を非特異的にリン酸化する。 $\beta_2$ AR C末端領域は非リン酸化状態において特定の構造を形成しないため、一次配列でTMドメインに近接した領域ほど、空間的にTMドメインに結合したGRK2に近接しやすい。この結果、TMドメインに近接した領域がより効率的にリン酸化される。また、フルアゴニスト結合状態の方が逆アゴニスト結合状態よりもC末端領域全体でリン酸化速度が亢進するのは、GRK2が活性化コンフォメーションに特異的に結合し、フルアゴニスト結合状態は逆アゴニスト結合状態と比較して活性化コンフォメーションをとりやすいためである。

### 4-3. $\beta_2$ AR C 末端領域のリン酸化に伴う構造変化

本研究では、リン酸化の進行度のみならず、リン酸化に伴って  $\beta_2$ AR C 末端領域の構造・運動性がどのように変化するかを解析し、リン酸化前には C 末端領域全体が特定の二次構造を形成しない一方で、リン酸化後には、C 末端領域のうち TM ドメインに近接した P region が、T360 側鎖の回転異性体の存在割合が異なる状態間を交換していること、この交換が TM ドメイン細胞内側の構造と共役していることを示した。従来の GPCR のリン酸化解析は、質量分析によるリン酸化部位の同定や、C 末端領域を切り出したペプチドとアレスチンの相互作用解析が主たる解析方法であり、全長 GPCR を解析対象とした、リン酸化された C 末端領域の構造生物学的解析は皆無であった。本研究は、区分同位体標識を用いて溶液 NMR 法による全長 GPCR の C 末端領域の構造・運動性の解析方法を確立した点、確立した手法により、全長 GPCR のリン酸化された C 末端の運動性が、TM ドメインの構造と共役した挙動を示す事を明らかにした点に新規性がある。

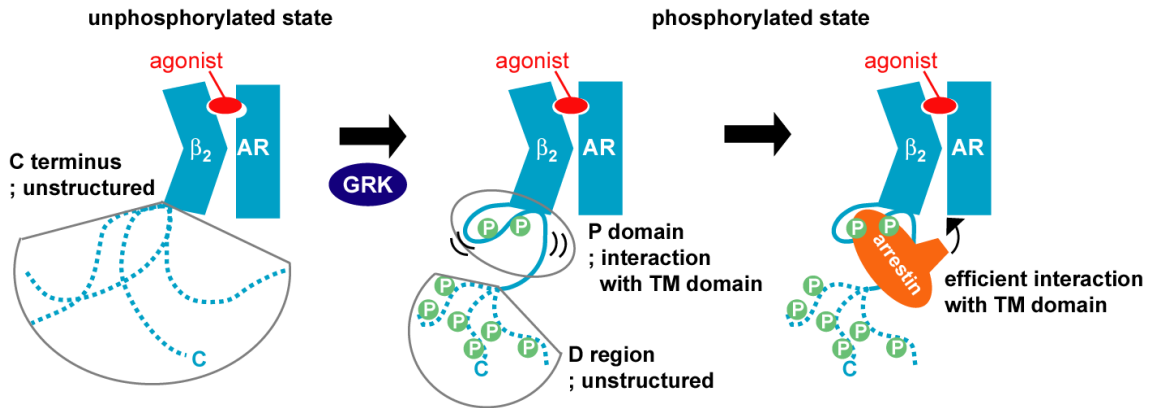
本研究で P region に観測された化学交換が、リン酸化依存的に生じたものである事、TM ドメインのコンフォメーションに依存して摂動を受ける事から、この化学交換に、リン酸基と TM ドメインとの間の相互作用が関与している事が強く示唆される。また、T360 側鎖メチル基の線形は、リン酸化に伴い  $^{13}\text{C}$  方向にのみ特異的に広幅化した一方で、 $^1\text{H}$  方向にはほとんど広幅化していなかった。側鎖メチル基  $^{13}\text{C}$  の化学シフト値は側鎖の回転異性体の存在割合で規定される一方で、 $^1\text{H}$  の化学シフト値は周囲の環電流効果により規定される。したがって、今回観測された T360 メチルシグナルの線形より、リン酸化に伴って T360 側鎖の構造はコンフォメーションに変調が生じている一方で、メチル基に対して芳香環が直接接触するような相互作用は生じていない事が強く示唆される。この事から、T360 の  $\gamma_1$  位に付加したリン酸基が TM ドメインとの直接の相互作用を担っており、この結果 T360 側鎖のコンフォメーションが規定されていると

考察した。

また、P region とは異なり、D region の NMR シグナルはリン酸化を受けても先鋭であり、P region に生じたような化学交換は観測されなかった。この事は、D region に付加したリン酸基は TM ドメインと相互作用を形成しない事を示している。TM ドメインから離れた D region に付加したリン酸基が TM ドメインと相互作用を形成する場合、TM ドメインに近接した P region に付加したリン酸基が TM ドメインと相互作用する形成する場合と比較して、より広い範囲にわたって主鎖の構造の自由度が制限される。すなわち、D region に付加したリン酸基と TM ドメインとの相互作用は、より構造エントロピーの損失が大きな相互作用である。この違いのために、P region に付加したリン酸基は TM ドメインと相互作用する一方、D region に付加したリン酸基は TM ドメインと相互作用しないと考察した。

培養細胞を用いた解析により、 $\beta_2$ AR の C 末端領域のうち、P region に分布する S355、S356、T360、S364 を変異させた場合には、アレスチンを介した  $\beta_2$ AR のインターナリゼーションが顕著に抑制される一方で、D region に分布する T384、T393、S396、S401、S407、T408、S411 を変異させてもインターナリゼーションは野生型と同程度に生じる事が報告されている[12]。本研究の解析結果より、P region に分布する S355、S356、T360、S364 を除去した変異体では、リン酸化反応後も C 末端領域全体が特定の二次構造を形成しない状態にあるのに対し、D region に分布する T384、T393、S396、S401、S407、T408、S411 を変異により除去した変異体では、リン酸化後に野生型同様、リン酸基と TM ドメインの相互作用が生じると考えられる。以上を踏まえて、アレスチンを介したインターナリゼーションが達成されるには、C 末端領域がリン酸化を受けるのみでは不十分であり、これが TM ドメインと相互作用をする事が必要であると考えた。実際に、アレスチンは C 末端領域のリン酸化のみでなく、GPCR TM ドメインとも相互作用を形成する事により、GPCR と複合体を形成する為、リン酸基があらか

じめ TMドメインに近接した状態にある事は、アレスチンがリン酸基との相互作用、TMドメインとの相互作用の両者を同時に達成するうえで有利に働くと考えられる。



**Fig.4-2 リン酸化に伴う  $\beta_2$ AR C 末端領域の構造変化**

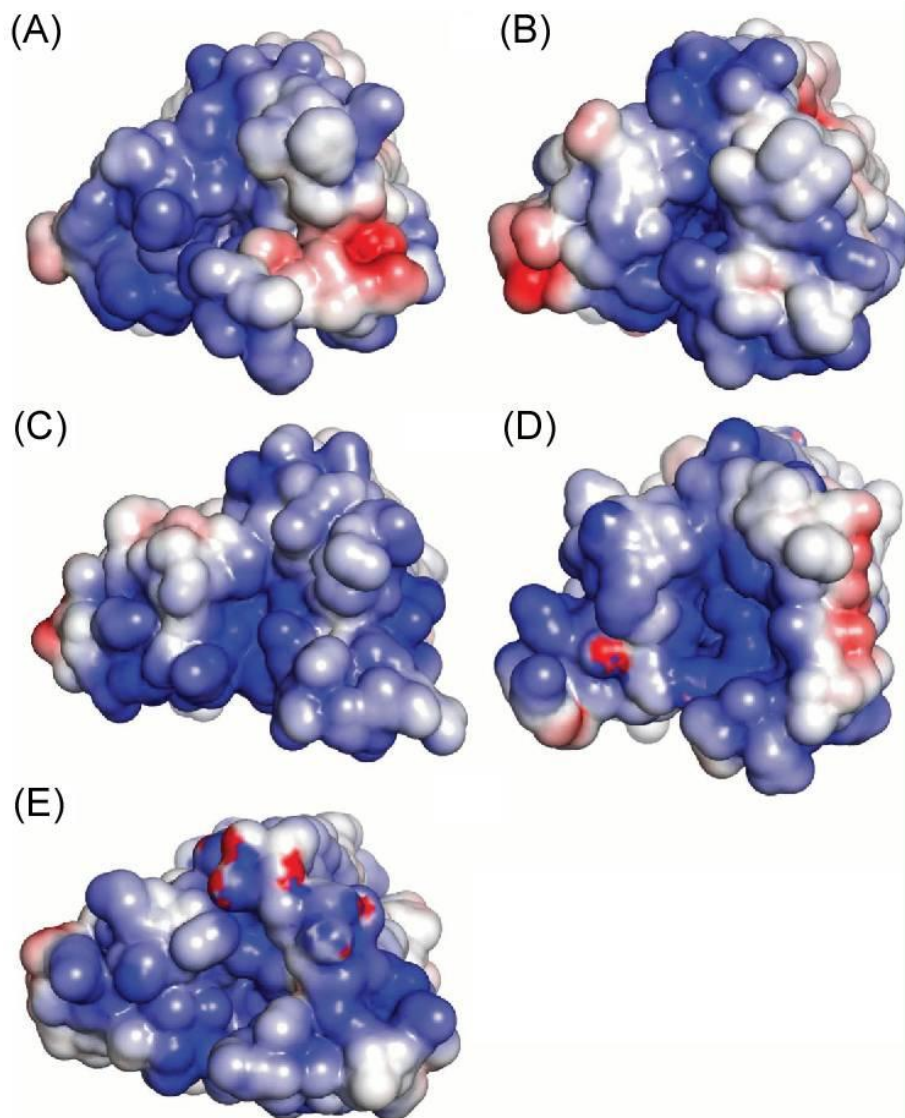
非リン酸化状態においては、C 末端領域全体が構造非形成状態にある。C 末端がリン酸化されると、D region は依然として構造非形成状態にある一方で、P region は TM ドメインと相互作用を生じる。この結果、リン酸基が TM ドメインに空間的に近接し、ここに結合したアレスチンが TM ドメインと速やかに相互作用を形成する。

	Wild type	P region mutant	D region mutant
arrestin-mediated internalization	retained	abolished	retained
schematic structures in phosphorylated state			

**Fig.4-3  $\beta_2$ AR C 末端領域のセリン・スレオニン残基への変異導入が、シグナル伝達およびリン酸化後の構造へ与える影響**

また、今回の研究結果より考察した、リン酸基と TM ドメインが空間的に近接するというモデルは、 $\beta_2$ AR 以外の GPCR にも適用可能である。GPCR C 末端領域は、その一次配列には保存性がないものの、TM ドメインに比較的近接した部位のリン酸化は複数の GPCR で報告が存在する。また、GPCR TM ドメインの立体構造は非常によく保存されており、特に細胞内側が正電荷を帯びている点が共通している[8] (Fig.4-4)。したがって、静電相互作用を想定する事により、リン酸基と TM ドメインの近接が多く GPCR で達成可能であると考えられる。一次配列に保存性がないにもかかわらず、多くの GPCR のアレスチン結合に C 末端リン酸化が必要であるのは、一次配列に依らないリン酸基の TM ドメインへの空間的な近接がアレスチン結合に重要であるためであると考えた。

一方で、アレスチンを介したシグナル伝達におけるリン酸化の役割をより詳細に明らかとするためには、今回観測された TM ドメインと P region の相互作用が具体的にどのようなものであるか、アレスチン結合状態においてリン酸化された C 末端がどのように結合するのかを解析する事が必要である。TM ドメインと P region の相互作用様式に関しては、TM ドメインから P region への飽和移動実験による直接の相互作用の検証、P region を観測対象とした CPMG 緩和分散実験による化学交換のタイムスケールの算出等を行う事で、今回の結果をより具体的に記述できるようになると考えられる。後者に関しては、アレスチン結合状態で NMR 解析を行い、そのシグナルの挙動を解析することで結合様式にせまることができると考えられる。



**Fig.4-4 GPCR TM ドメイン細胞内側の静電ポテンシャル ([8]より改変)**

- (A)  $\beta_1$  アドレナリン受容体 (PDB code: 2Y02[50])
  - (B)  $\beta_2$  アドレナリン受容体 (PDB code: 3PDS[51])
  - (C)  $A_{2A}$  アデノシン受容体 (PDB code: 3QAK[52])
  - (D) セロトニン  $5HT_{1B}$  受容体 (PDB code: 4IAR[53])
  - (E) セロトニン  $5HT_{2B}$  受容体 (PDB code: 4IB4[54])
- 正電荷の面を形成する傾向が共通している。



## 参考文献

1. Rask-Andersen, M., M.S. Almen, and H.B. Schiøth, *Trends in the exploitation of novel drug targets*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(8): p. 579-90.
2. Wisler, J.W., et al., *Recent developments in biased agonism*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **27**: p. 18-24.
3. Hara, M.R., et al., *A stress response pathway regulates DNA damage through beta2-adrenoreceptors and beta-arrestin-1*. Nature, 2011. **477**(7364): p. 349-53.
4. Gurevich, V.V., et al., *Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors*. J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 720-31.
5. Krasel, C., et al., *Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9528-35.
6. Rasmussen, S.G., et al., *Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex*. Nature, 2011. **477**(7366): p. 549-55.
7. Cherezov, V., et al., *High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor*. Science, 2007. **318**(5854): p. 1258-65.
8. Kang, Y., et al., *Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser*. Nature, 2015. **523**(7562): p. 561-7.
9. Kofuku, Y., et al., *Efficacy of the beta(2)-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1045.
10. Shukla, A.K., et al., *Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide*. Nature, 2013. **497**(7447): p. 137-41
11. Nobles, K.N., et al., *Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin*. Sci Signal, 2011. **4**(185): p. ra51
12. Krasel, C., et al., *Dual role of the beta2-adrenergic receptor C terminus for the binding of beta-arrestin and receptor internalization*. J Biol Chem, 2008. **283**(46): p. 31840-8.
13. Yang, F., et al., *Phospho-selective mechanisms of arrestin conformations and functions revealed by unnatural amino acid incorporation and (19)F-NMR*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8202.
14. Muona, M., et al., *Segmental isotopic labeling of multi-domain and fusion proteins by protein trans-splicing in vivo and in vitro*. Nat Protoc, 2010. **5**(3): p. 574-87.

15. Shah, N.H. and T.W. Muir, *Inteins: Nature's Gift to Protein Chemists*. Chem Sci, 2014. **5**(1): p. 446-461.
16. Iwai, H., et al., *Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from Nostoc punctiforme*. FEBS Lett, 2006. **580**(7): p. 1853-8.
17. Aranko, A.S., et al., *In vivo and in vitro protein ligation by naturally occurring and engineered split DnaE inteins*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5185.
18. Roth, C.B., M.A. Hanson, and R.C. Stevens, *Stabilization of the human beta2-adrenergic receptor TM4-TM3-TM5 helix interface by mutagenesis of Glu122(3.41), a critical residue in GPCR structure*. J Mol Biol, 2008. **376**(5): p. 1305-19.
19. Gether, U., et al., *Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor*. Embo J, 1997. **16**(22): p. 6737-47.
20. Pei, G., et al., *An approach to the study of G-protein-coupled receptor kinases: an in vitro-purified membrane assay reveals differential receptor specificity and regulation by G beta gamma subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3633-6.
21. Bayburt, T.H., Y.V. Grinkiva, and S.G. Sligar, *Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins*. Nano Lett, 2002. **2**(8): p. 853-856.
22. Bayburt, T.H., et al., *Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding*. J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 1420-8.
23. Li, L., et al., *G Protein-coupled Receptor Kinases of the GRK4 Protein Subfamily Phosphorylate Inactive G Protein-coupled Receptors (GPCRs)*. J Biol Chem, 2015. **290**(17): p. 10775-90.
24. Imai, S., et al., *Functional equilibrium of the KcsA structure revealed by NMR*. J Biol Chem, 2012. **287**(47): p. 39634-41.
25. Hagn, F., et al., *Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(5): p. 1919-25.
26. Kofuku, Y., et al., *Functional dynamics of deuterated beta2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR spectroscopy*. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(49): p. 13376-9.
27. Tropea, J.E., S. Cherry, and D.S. Waugh, *Expression and purification of soluble His(6)-tagged TEV protease*. Methods Mol Biol, 2009. **498**: p. 297-307.
28. Premont, R.T. and R.R. Gainetdinov, *Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 511-34.
29. Steinberg, T.H., et al., *Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed*

- Proteomics technology*. Proteomics, 2003. **3**(7): p. 1128-44.
30. Pei, G., et al., *A constitutively active mutant beta 2-adrenergic receptor is constitutively desensitized and phosphorylated*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2699-702.
  31. Sattler, M., J. Scheleucher, and C. Griesinger, *Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients*. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 1999. **34**: p. 93-158.
  32. Wishart, D.S. and B.D. Sykes, *The 13C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using 13C chemical-shift data*. J Biomol NMR, 1994. **4**(2): p. 171-80.
  33. Du, J.T., et al., *Low-barrier hydrogen bond between phosphate and the amide group in phosphopeptide*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(47): p. 16350-1.
  34. Theillet, F.X., et al., *Site-specific NMR mapping and time-resolved monitoring of serine and threonine phosphorylation in reconstituted kinase reactions and mammalian cell extracts*. Nat Protoc, 2013. **8**(7): p. 1416-32.
  35. Tugarinov, V., et al., *Cross-correlated relaxation enhanced 1H-13C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(34): p. 10420-8.
  36. Velyvis, A., A.M. Ruschak, and L.E. Kay, *An economical method for production of (2)H, (13)CH3-threonine for solution NMR studies of large protein complexes: application to the 670 kDa proteasome*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e43725.
  37. Goto, N.K., et al., *A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile (delta 1) methyl-protonated 15N-, 13C-, 2H-labeled proteins*. J Biomol NMR, 1999. **13**(4): p. 369-74.
  38. London, R.E., B.D. Wingad, and G.A. Mueller, *Dependence of amino acid side chain 13C shifts on dihedral angle: application to conformational analysis*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(33): p. 11097-105.
  39. Volkmann, G. and H. Iwai, *Protein trans-splicing and its use in structural biology: opportunities and limitations*. Mol Biosyst, 2010. **6**(11): p. 2110-21.
  40. Kobashigawa, Y., et al., *Attachment of an NMR-invisible solubility enhancement tag using a sortase-mediated protein ligation method*. J Biomol NMR, 2009. **43**(3): p. 145-50.
  41. Levary, D.A., et al., *Protein-protein fusion catalyzed by sortase A*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18342.
  42. Sitarska, A., et al., *Affordable uniform isotope labeling with (2)H, (13)C and (15)N in insect cells*. J Biomol NMR, 2015. **62**(2): p. 191-7.
  43. Opitz, C., S. Isogai, and S. Grzesiek, *An economic approach to efficient isotope labeling*

- in insect cells using homemade 15N-, 13C- and 2H-labeled yeast extracts.* J Biomol NMR, 2015. **62**(3): p. 373-85.
44. Shimada, I., et al., *Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments.* Prog. Nucl.Magn. Reson.Spectrosc., 2009(54): p. 123-140.
  45. Hollenstein, K., et al., *Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1.* Nature, 2013. **499**(7459): p. 438-43.
  46. Siu, F.Y., et al., *Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor.* Nature, 2013. **499**(7459): p. 444-9.
  47. Grace, C.R., et al., *Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(12): p. 4858-63.
  48. Sun, C., et al., *Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 7875-80.
  49. Beautrait, A., et al., *Mapping the putative G protein-coupled receptor (GPCR) docking site on GPCR kinase 2: insights from intact cell phosphorylation and recruitment assays.* J Biol Chem, 2014. **289**(36): p. 25262-75.
  50. Warne, T., et al., *The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor.* Nature, 2011. **469**(7329): p. 241-4.
  51. Rosenbaum, D.M., et al., *Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex.* Nature, 2011. **469**(7329): p. 236-40.
  52. Xu, F., et al., *Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor.* Science, 2011. **332**(6027): p. 322-7.
  53. Wang, C., et al., *Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors.* Science, 2013. **340**(6132): p. 610-4.
  54. Wacker, D., et al., *Structural features for functional selectivity at serotonin receptors.* Science, 2013. **340**(6132): p. 615-9.

## 謝辞

素晴らしい環境で研究を行う機会を与えていただき、研究の指針のみならず研究者としての在り方に至るまで、熱心なご指導を賜るとともに、常に、温かい励ましの言葉をかけていただきました、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 嶋田 一夫 教授に心から感謝申し上げます。

本研究の初期から直接のご指導を頂き、研究の方針から基本的な実験手技、文章の書き方に至るまで、懇切丁寧なご指導を賜りました、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 幸福 裕 特任助教 に心から感謝申し上げます。

常に的確なご助言で本研究の指針を与えていただくとともに、研究に対する考え方についてご指導を賜りました、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 上田 卓見 助教 に心から感謝申し上げます。

日々の研究生生活において、貴重なご助言と温かい励ましの言葉を賜りました、東京大学 大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 大澤 匡範 講師 (現 慶応大学 教授)、西田 紀貴 助教 に心から感謝申し上げます。

$\beta_2AR$  の区分同位体標識の遂行に際して、研究室への訪問を御快諾頂くとともに、非常に有意義なご助言を賜りました、**Institute of Biotechnology, University of Helsinki** 岩井 秀夫 博士に心から感謝申し上げます。

日々の研究生生活全般にわたり、様々な形で御助力を賜りました、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室の皆様心から感謝申し上げます。特に、同じ研究グループでご協力を頂きました、阿内 康平 修士、夏目 芽依 学士 に感謝申し上げます。

最後に、常に温かく私を見守り、支えてくれた家族と、研究生生活をご支援いただいた全ての方々に感謝申し上げます。

白石 勇太郎は日本学術振興会特別研究員である。