

## 論文の内容の要旨

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

### 【序】

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、リガンドの結合に伴い活性化すると、GPCR キナーゼ (GRK) により細胞内 C 末端領域がリン酸化を受ける。リガンドにより活性化され、かつリン酸化を受けた GPCR は、アレスチンを介して G タンパク質とは異なるシグナルを誘起する (Fig.1)。リン酸化を介したシグナル伝達は GPCR 一般に保存されており、この制御機構の解明は GPCR を標的とした新規治療薬の開発に貢献すると考えられる。

一般に GPCR の C 末端領域には、複数のセリンおよびスレオニン残基が分布しており、リン酸化のアレスチンシグナルに対する寄与は部位ごとに異なる事が知られている。しかしながら、GPCR C 末端領域の構造に関する知見は乏しく、リン酸化部位ごとにアレスチンシグナルに対する寄与が何故異なるのか、その機構は不明である。そこで本研究では、GPCR の一種であるヒト由来  $\beta_2$  アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ AR) を解析対象として、 $\beta_2$ AR C 末端領域のどの部位がリン酸化される事で、どのような構造変化が生じるかを NMR 法により解析する事により、リン酸化がアレスチンシグナルを制御する機構を解明する事を目的とした。

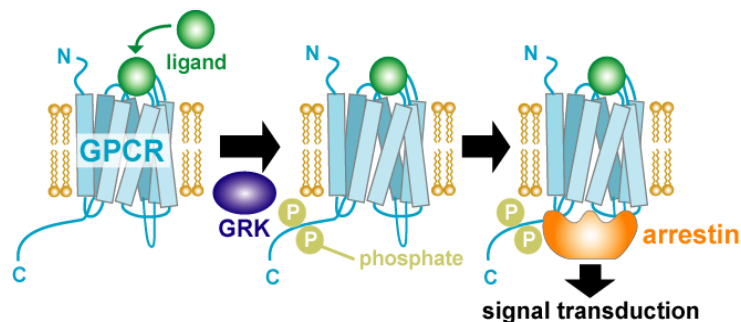


Fig.1 GPCR のリン酸化を介したシグナル伝達の模式図

## 【方法・結果】

### 1. C 末端領域を区分同位体標識した $\beta_2$ AR の調製

$\beta_2$ AR は全長 413 残基からなる高分子量タンパク質であり、NMR シグナルの縮重が解析の妨げとなる事が予想される。また、膜タンパク質である  $\beta_2$ AR は、その活性体の大量発現には昆虫細胞発現系を必要とするが、昆虫細胞発現系では大腸菌発現系と比較して安定同位体標識が可能なアミノ酸種に制限がある点が問題となる。以上の点を克服する為に、本研究ではまず、protein trans-splicing (PTS) を用いて  $\beta_2$ AR の C 末端領域を区分同位体標識する手法を確立することとした (Fig.2 (A))。PTS とは、分離インテインにより触媒されるタンパク質ライゲーション反応である。 $\beta_2$ AR の膜貫通 (TM) 領域に分離インテイン N フラグメントを融合したコンストラクト (TM-Int<sub>N</sub>) を昆虫細胞発現系で、 $\beta_2$ AR の C 末端領域に分離インテイン C フラグメントを融合したコンストラクト (Int<sub>C</sub>-Cterm) を大腸菌発現系でそれぞれ発現させ、精製した。この際、Int<sub>C</sub>-Cterm には適宜安定同位体標識を施した。精製した TM-Int<sub>N</sub>、Int<sub>C</sub>-Cterm を混合し、298 K で 6 時間インキュベートすることで PTS を行った。SDS-PAGE 解析より、収率 ~80 % 程度で PTS が進行している事を確認した (Fig.2 (B))。

PTS により調製した  $\beta_2$ AR が活性を保持しているか否かを、GRK2 によるリン酸化アッセイにより調べた。GRK による GPCR のリン酸化反応が進行するには、GPCR が脂質二重膜環境にある必要がある事が報告されているため、調製した  $\beta_2$ AR を、reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) の脂質二重膜に再構成した ( $\beta_2$ AR-rHDL)。調製した  $\beta_2$ AR-rHDL を full agonist である formoterol または inverse agonist である carazolol 存在下で GRK2 によりリン酸化した。その結果、full agonist 存在下において、inverse agonist 存在下と比較してリン酸化速度が亢進しており、その速度は先行研究で報告されたものと同程度であった (Fig.1 (C))。以上より、PTS により調製した  $\beta_2$ AR-rHDL が、リガンド依存的に GRK2 によるリン酸化を受ける活性を保持していると結論した。

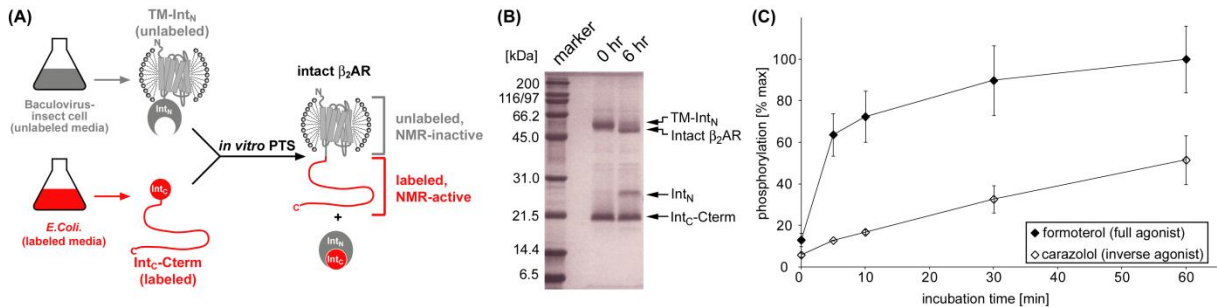


Fig.2

(A) 区分同位体標識  $\beta_2$ AR の調製スキーム

(B) PTS 反応の SDS-PAGE 解析

(C) 調製した  $\beta_2$ AR のリガンド依存的なリン酸化

### 2. 非リン酸化状態の $\beta_2$ AR C 末端領域の構造解析

確立した方法に従い、残基番号 349-413 のみを標識した  $\beta_2$ AR-rHDL を調製した (Fig.3 (A))。まず、非リン酸化状態で  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定し、構造情報を取得した (Fig.3 (B))。その結果、理論上観測可能な 63 残基に対し、59 個のシグナルを分離して観測する事に成功した。Int<sub>C</sub>-Cterm の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルとの比較、三重共鳴実験の結果より、全てのシグナルを帰

属した。各残基の C $\alpha$ の化学シフト値が、ランダムコイル状態に相当する値を示していた事から、非リン酸化状態において  $\beta_2$ AR の C 末端領域は特定の二次構造を形成しないと結論した。

### 3. リン酸化された $\beta_2$ AR C 末端のリン酸化部位及び構造の解析

次に、full agonist 存在下において、GRK2 によりリン酸化した  $\beta_2$ AR-rHDL の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定し、リン酸化部位とリン酸化後の構造解析を行った (Fig.3 (B))。その結果、残基番号 353-368 の TM-Proximal region (P region、Fig.3 (A)) に由来するシグナルは、リン酸化に伴い化学シフトの変化及び広幅化が生じており、特に残基番号 353-360 に由来するシグナルは検出できなかった。シグナルの広幅化は、リン酸化に伴い当該領域の横緩和速度が増大した事を示している。したがって、P region は、リン酸化に伴い何らかの高次構造をとっていると結論した。一方で、残基番号 369-413 の TM-Distal region (D region、Fig.3 (A)) は、S396、S401、S407 とその周囲の残基に、非リン酸化状態で観測されたシグナルに加えて、リン酸化状態に由来するシグナルが新たに観測された。また、新たに観測されたシグナルの C $\alpha$ の化学シフト値は、ランダムコイル相当の値を示していた。したがって、D region は部分的にリン酸化された状態にあり、リン酸化後も特定の二次構造を形成しないと結論した。

P region に生じた変化について詳細に解析する為に、アミド基よりも高感度のシグナルを与えるメチル基をプローブとした NMR 解析を行った。C 末端領域に分布するイソロイシンおよびスレオニン残基の側鎖メチル基を選択的に  $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$  標識した  $\beta_2$ AR-rHDL を調製して  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルを測定した (Fig.4 (A))。その結果、P region に位置する T360 の側鎖メチル基に由来するシグナルは、リン酸化に伴って  $^{13}\text{C}$  方向に顕著に広幅化していた。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により規定される。したがって、リン酸化された 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間を、ミリ秒~マイクロ秒のタイムスケールで交換していると結論した。

$\beta_2$ AR に対して full agonist が結合した状態と、inverse agonist が結合した状態では、TM ドメインの構造が異なる事が報告されている。そこで、P region に観測された化学交換に TM ドメインの構造が関与するか否かを調べるために、同サンプルを inverse agonist 結合状態としたうえで  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$

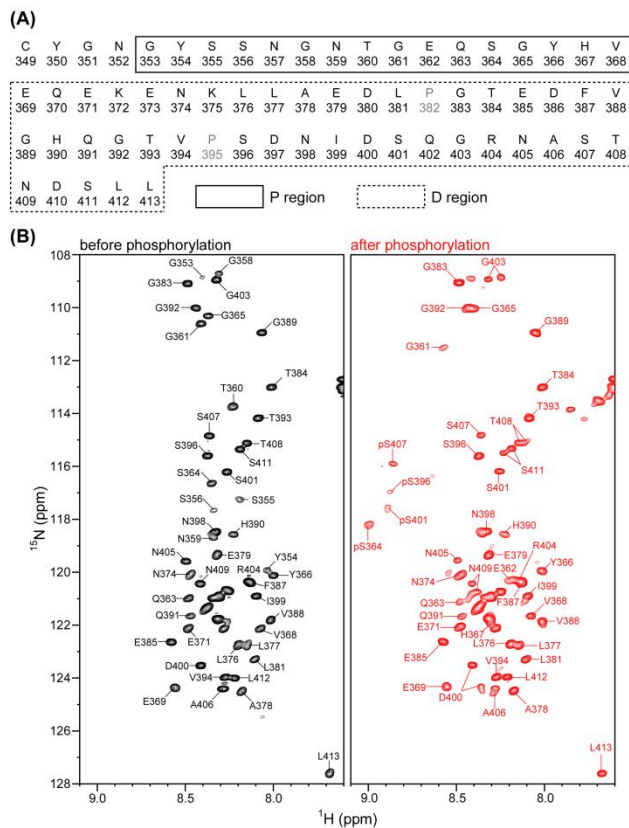
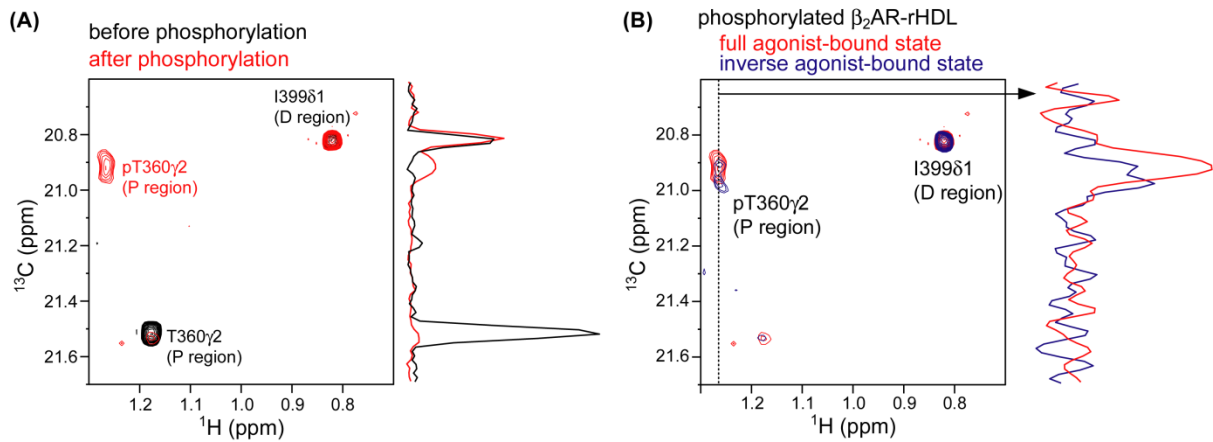


Fig.3

(A) 安定同位体標識を施した  $\beta_2$ AR C 末端領域の一次配列。P region を実線、D region を破線で示した。

(B) 非リン酸化状態 (左、黒)、リン酸化状態 (右、赤) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル

HMQC スペクトルを測定した (Fig.4 (B))。その結果、リン酸化 T360 側鎖メチル基由来のシグナルの広幅化がさらに亢進した。したがって、P region に位置するリン酸化 T360 側鎖メチル基の化学環境が、TM ドメインの構造と共役していると結論した。



**Fig.4**

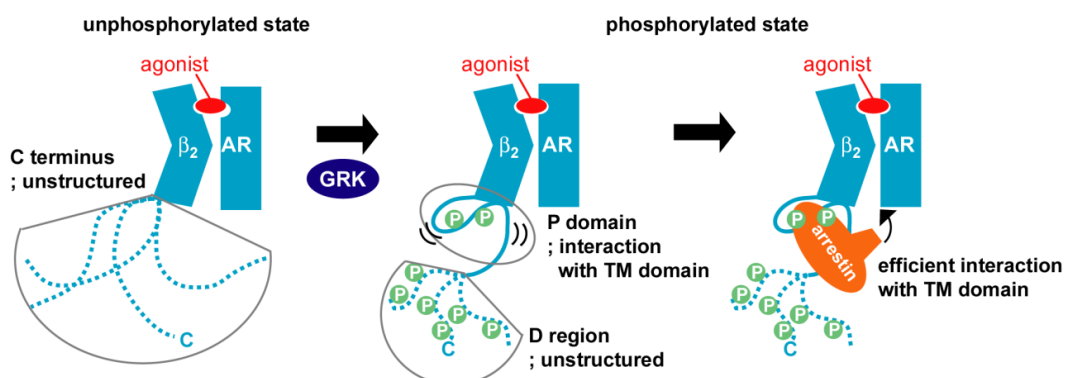
(A) 非リン酸化状態 (黒)、リン酸化状態 (赤) の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル

(B) full agonist 結合状態 (赤)、inverse agonist 結合状態 (青) の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル

**【考察】**

C 末端領域を観測対象とした NMR 解析により、P region が速やかにリン酸化を受ける事、リン酸化に伴い、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する事を示した。さらに、この化学交換が  $\beta_2\text{AR}$  の TM ドメインの構造と共役している事を見出した。この結果は、 $\beta_2\text{AR}$  C 末端領域のうち、TM ドメインに近接した P region が、リン酸化に伴って TM ドメインと相互作用している事を強く示唆している。

変異体解析より、アレスチンを介した  $\beta_2\text{AR}$  の内在化には、P region に位置する S355、S356、T360、S364 が重要である事が報告されている。また、アレスチンは、GPCR の TM ドメインとも相互作用する事が報告されている。本研究の結果から、 $\beta_2\text{AR}$  C 末端領域のうち、P region は、リン酸化に伴って TM ドメイン細胞内側と相互作用する事により、リン酸基が TM ドメインの細胞内領域に空間的に近接する。この結果、アレスチンがリン酸基との相互作用と TM ドメインとの相互作用を同時に効率よく達成することで、シグナル伝達が誘起されると考えた。



**Fig.5 本研究より考察したアレスチン結合に対するリン酸化の役割**