

審査の結果の要旨

氏名 白石 勇太郎

区分同位体標識を用いた β_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と題する本論文は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種であるヒト由来 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) を、溶液 NMR 法を用いて解析した成果を述べたものである。本論文は全4章から構成されており、第1章に序論、第2章に実験方法が記されている。第3章に実験結果がまとめられ、第4章でその結果に対する考察が記述されている。

第3章においては、まず、解析対象とする β_2 AR の調製を行っている。次に、完全アゴニストおよび逆アゴニスト結合状態における、 β_2 AR の GPCR キナーゼ 2 (GRK2) によるリン酸化活性を評価している。最後に、溶液 NMR 法を用いて、リン酸化に伴う β_2 AR の構造変化を解析している。

まず、 β_2 AR の膜貫通 (TM) ドメインと C 末端領域を、それぞれ分離インテイン融合タンパク質として調製している。その後、インテインを介したプロテインスプライシング反応により両者を連結することで、全長 β_2 AR を調製している。以上のような調製法を確立することで、C 末端領域のみが安定同位体標識された β_2 AR を調製している。その後、調製した β_2 AR を reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) の脂質二重膜中に再構成し、完全アゴニストおよび逆アゴニスト結合状態で、GRK2 による被リン酸化活性を評価し、調製した β_2 AR がリガンド依存的に GRK2 によりリン酸化されることを示している。以上のように、C 末端領域を区分同位体標識した β_2 AR を、活性を保持した状態で調製することに成功している。

次に、非リン酸化状態の β_2 AR C 末端領域の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定している。観測されたシグナルの帰属を行い、主鎖 $\text{C}\alpha$ の化学シフト値を得ることにより、C 末端領域全体が特定の二次構造を形成していない事を示している。

次に、リン酸化状態の β_2 AR C 末端領域の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、非リン酸化状態との比較を行っている。化学シフト変化のパターンとシグナル強度の解析から、C 末端領域のうち TM ドメインに近接した領域 (P region) に位置するセリン・スレオニン残基が ~100% リン酸化されている事、TM ドメインから離れた領域 (D region) に位置するセリン・スレオニン残基が 30~60% リン酸化されている事を示している。また、P region に由来する NMR シグナルが、リン酸化に伴い消失する事を示している。さらに、主鎖 $\text{C}\alpha$ の化学シフト値を得ることにより、リン酸化状態において、D region が特定の二次構造を形成していない事を示している。

次に、P region に位置する T360、D region に位置する I399 の側鎖メチル基をプローブとした NMR 解析を行っている。非リン酸化状態では T360、I399 共に先鋭なシグナルを与える事、リン酸化状態では、T360 の NMR シグナルが ^{13}C 方向に顕著に広幅化する事を示している。さらに、リン酸化状態における T360 の NMR シグナルの線形が、完全アゴニスト結合状態と逆アゴニスト結合状態で変化する事から、リン酸化状態において、T360 周囲の化学環境が TM ドメインの構造と共役している事を示している。以上のように、 β_2 AR C 末端領域のリン酸化と、これに伴う構造変化様式を、溶液 NMR 法により解析することに成功している。

第 4 章では、リン酸化に伴う構造変化様式から、リン酸化に伴いアレスチン結合が誘起されるメカニズムについて考察している。その内容は、C 末端領域のうち TM ドメインに近い領域が、リン酸化に伴い TM ドメインと相互作用を形成することで、リン酸基と TM ドメインが近接し、この結果、アレスチンがリン酸基との結合と TM ドメインとの結合の両方を同時に達成するという、GPCR 一般に適用可能な新たな概念を提唱するものである。

以上の成果は、これまで不明であった GPCR C 末端領域のリン酸化がシグナル伝達を誘起する機構を立体構造の見地から明らかとしたものであり、これを行った学位申請者は博士 (薬科学) の学位を得るにふさわしいと判断した。