

## 論文の内容の要旨

論文題目 膜環境による GPCR の活性制御機構の解明

氏名 水村拓也

**【目的】** アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体 (A<sub>2A</sub>AR) は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種であり、中枢神経系と末梢組織の両方に広く発現している膜タンパク質である。A<sub>2A</sub>AR は、リガンド刺激に応じて G タンパク質を活性化して、細胞内にシグナルを伝達することで、神経伝達や血流の調節といった重要な生理機能を担う。生体内において、A<sub>2A</sub>AR が置かれている環境は、中枢神経系と末梢組織で顕著に異なっている。A<sub>2A</sub>AR の活性や構造に影響を与える重要な相違点としては、A<sub>2A</sub>AR が存在する脂質二重膜中において、ドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6) が中枢神経系に、アラキドン酸 (ARA, 20:4) が末梢組織に、それぞれ高濃度に含まれている点が挙げられる。したがって、生体内における A<sub>2A</sub>AR の機能を理解するうえでは、中枢神経系と末梢組織の A<sub>2A</sub>AR が、脂質二重膜中の DHA や ARA の濃度の違いによってどのように異なっているかを明らかにすることが重要である。しかし、脂質組成を制御した脂質二重膜環境における GPCR の構造を解析する適切な手法がないため、膜環境の変化による A<sub>2A</sub>AR の構造変化は不明である。そこで本研究では、ミセル状態および再構成高密度リポタンパク質 (rHDL) の脂質二重膜に再構成した GPCR の動的構造平衡を NMR 法によって明らかにした当研究室の先行研究を応用して[1-2]、中枢神経系と末梢組織の脂質組成を再現した、DHA や ARA を含む rHDL 中の A<sub>2A</sub>AR の構造の違いを明らかにすることを目的とした。

**【方法】** A<sub>2A</sub>AR を酵母 *P. pastoris* に発現させ、膜面分を取得して界面活性剤で可溶化したのち精製を行った。DHA や ARA を含まない組成、末梢組織を再現した ARA を 37.5 %含む組成、中枢神経系を再現した DHA を 37.5 %含む組成の 3 種類の脂質を用いて、A<sub>2A</sub>AR を rHDL に再構成した。以降、これらの A<sub>2A</sub>AR-rHDL をそれぞれ A<sub>2A</sub>AR-rHDL(POPC/POPG),

A<sub>2A</sub>AR-rHDL(ARA), A<sub>2A</sub>AR-rHDL(DHA) と称する (図 1 左)。内因性リガンドであるアデノシンと同等の構造および活性を有するアゴニストである NECA と、各脂質組成の A<sub>2A</sub>AR-rHDL が存在する条件において、G タンパク質の GDP/GTP 交換速度を測定した。また、野生型および細胞内キャビティの I106, A232 (図 1 右) にメチオニンを変異導入した A<sub>2A</sub>AR を対象として、重水素化とメチオニン残基選択標識を両方施した各脂質組成の A<sub>2A</sub>AR-rHDL を調製して、アゴニストが結合した状態における <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC スペクトルを測定した。さらに、A<sub>2A</sub>AR のアゴニストである LUF5834 の A<sub>2A</sub>AR に対する親和性を、<sup>3</sup>H-NECA に対する競合阻害実験によって決定した。

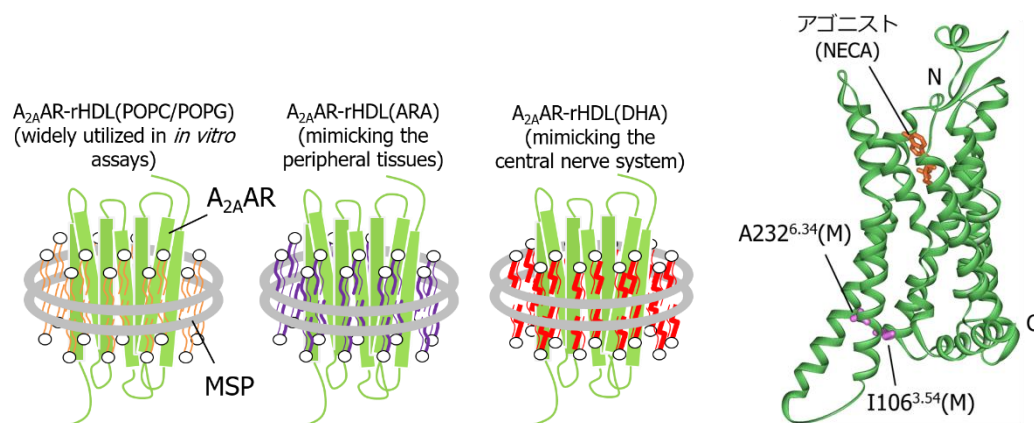


図 1. (左)本研究で解析した 3 種類の脂質組成の rHDL に再構成した A<sub>2A</sub>AR の模式図。(右)A<sub>2A</sub>AR の立体構造上における I106, A232 の位置 (PDB code: 2YDV)。

**【結果】** 各脂質組成の A<sub>2A</sub>AR-rHDL の SDS-PAGE 解析の結果、A<sub>2A</sub>AR と membrane scaffold protein (MSP) に由来するバンドがモル比 1 : 2 に対応する強度で検出された。したがって、1 分子の A<sub>2A</sub>AR を含む rHDL を調製できたと判断した。次に、各脂質組成の A<sub>2A</sub>AR-rHDL について、脂質に由来する NMR シグナルを解析した結果、A<sub>2A</sub>AR-rHDL と原料の脂質における、DHA や ARA の存在割合の差異が 2.5 % 以下であり、A<sub>2A</sub>AR-rHDL の脂質組成が制御されていることが示された。調製した A<sub>2A</sub>AR-rHDL のアゴニスト存在下における G タンパク質活性化能は、A<sub>2A</sub>AR-rHDL(POPC/POPG) < A<sub>2A</sub>AR-rHDL(ARA) < A<sub>2A</sub>AR-rHDL(DHA) の順であった (図 2 左)。したがって、脂質組成の変化によって、A<sub>2A</sub>AR の G タンパク質活性化能が変化することが示された。

アゴニスト結合状態における A<sub>2A</sub>AR-rHDL(ARA), A<sub>2A</sub>AR-rHDL(DHA) の NMR スペクトルでは、細胞内キャビティに存在する M106 および M232 に由来するシグナルの化学シフトが顕著に異なっていた。したがって、脂質組成の変化によって、A<sub>2A</sub>AR の細胞内キャビティの構造が変化することが示された。さらに、アゴニスト結合状態における A<sub>2A</sub>AR-rHDL(POPC/POPG) の NMR スペクトルと比較したところ、M106, M232 シグナルの化学シフトが連続しており (図 2 右上)、各脂質組成における A<sub>2A</sub>AR の G タンパク質活性化能と良く相関した (図 2 右下)。そこで、A<sub>2A</sub>AR が構造平衡状態にあるか調べるために、温度を下げて測定を行った。その結果、A<sub>2A</sub>AR-rHDL(POPC/POPG) において、M106 の化学シフトが DHA 存在下における化学シフトに近づくように変化した。したがって、アゴニスト結合状態の A<sub>2A</sub>AR-rHDL において、M106 および M232 が存在する細胞内キャビティが、G タンパク質活性化能の異なる複数の構造の間の平衡状態にあり、脂質組成の変化によってその量比が異なっていることが示された。

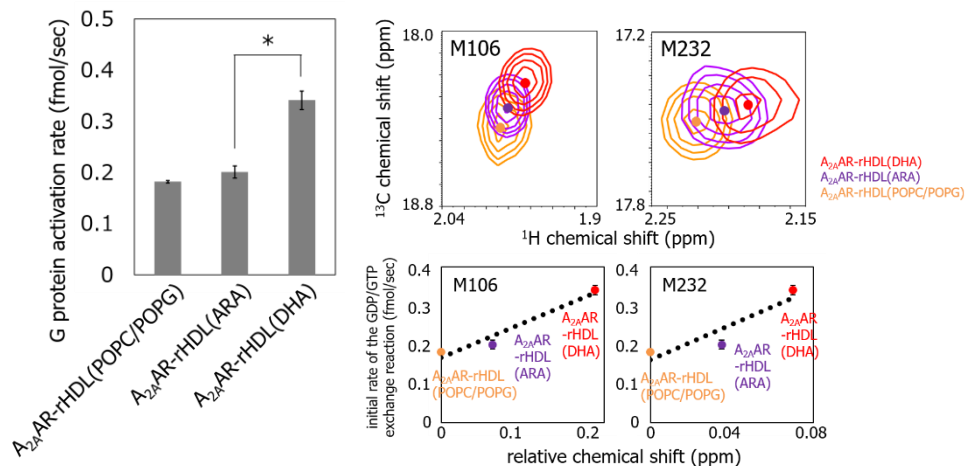


図 2. (左)各脂質組成の  $A_{2A}AR$ -rHDL の G タンパク質活性化能。  $p < 0.01$ 。(右上)各脂質組成の  $A_{2A}AR$ -rHDL における、M106 および M232 の NMR シグナル。(右下)各脂質組成の  $A_{2A}AR$ -rHDL における、G タンパク質活性化能と M106 および M232 の化学シフトの相関。

M106 は、構造上主に膜貫通ヘリックス (TM) 6 と近接することによって溶媒から遮蔽されている。実際に、これまでに報告されている、33 種類、154 個の GPCR の立体構造において、TM3 と TM6 の距離を反映する R102<sup>3.50</sup> と A232<sup>6.34</sup> の C $\alpha$ 間の距離は、M106 に対応する残基の溶媒露出度と相関する。また M232 が位置する TM6 は分子外側に位置しており、TM6 の軸周りの回転により M232 の側鎖の向きが分子内側となることで M232 は溶媒から遮蔽されている。実際に、GPCR の立体構造において、TM6 の軸周りの回転を反映する L48<sup>2.46</sup> の C $\alpha$ ・V239<sup>6.41</sup> の C $\alpha$ ・V239<sup>6.41</sup> の C $\beta$ の 3 点成す角の角度は、M232 に対応する残基の溶媒露出度と相関する。一方、各残基の溶媒露出度を、水溶性の常磁性試薬が誘起する NMR シグナルの強度減少を調べる solvent PRE 実験により決定することが可能である (図 3 左)。そこで、DHA 存在下と ARA 存在下の  $A_{2A}AR$  の主要な構造の差異を調べるために、 $A_{2A}AR$ -rHDL(ARA) および  $A_{2A}AR$ -rHDL(DHA) の solvent PRE 実験をアゴニスト存在下で行った。その結果、ARA 存在下と比較して、DHA 存在下では、M106 の溶媒露出度が減少して、M232 の溶媒露出度が増加した (図 3 中)。したがって、DHA によって  $A_{2A}AR$  は、TM3 と TM6 が近づき、かつ TM6 が軸周りに回転した状態に平衡が偏ることが示唆された (図 3 右)。

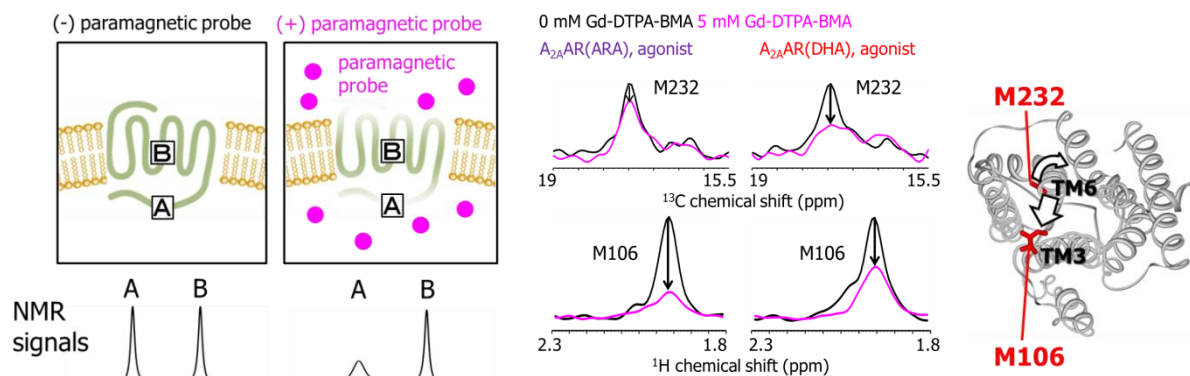


図 3. (左)solvent PRE 実験の概要。試料に常磁性試薬 Gd-DTPA-BMA を添加すると、Gd-DTPA-BMA から距離に依存して NMR シグナルが広幅化して、強度減少する。したがって、溶媒露出度の低い残基 B と比較して溶媒露出度の高い残基 A の方が、Gd-DTPA-BMA 添加に伴い大きく強度減少する。(中) DHA 存在下および ARA 存在下における、M106 および M232 シグナルの、Gd-DTPA-BMA による強度減少の比較。(右)細胞内側から見た、DHA による  $A_{2A}AR$  の構造変化 (PDB code: 2YDV)。

$A_{2A}AR$  の平衡を DHA と同じように偏らせるリガンドは、DHA 存在下の  $A_{2A}AR$  に親和性が高く、DHA 豊富な中枢神経系の  $A_{2A}AR$  に選択的に作用する薬剤となることが期待される。そこで、そのようなリガンドを探索するために、 $A_{2A}AR$  のアゴニストである LUF5834 結合状態の  $A_{2A}AR$ -rHDL(ARA) の M106 シグナルを観測した。その結果、M106 シグナルは、DHA 存在下における化学シフトに近い位置に観測された (図 4 左)。さらに、リガンド結合アッセイの結果、LUF5834 は ARA 存在下と比較して DHA 存在下の  $A_{2A}AR$  に対する親和性が高いことがわかった。したがって、LUF5834 は、 $A_{2A}AR$  の平衡を DHA と同じように偏らせることによって、DHA 存在下の  $A_{2A}AR$  に親和性が高いことが示された。

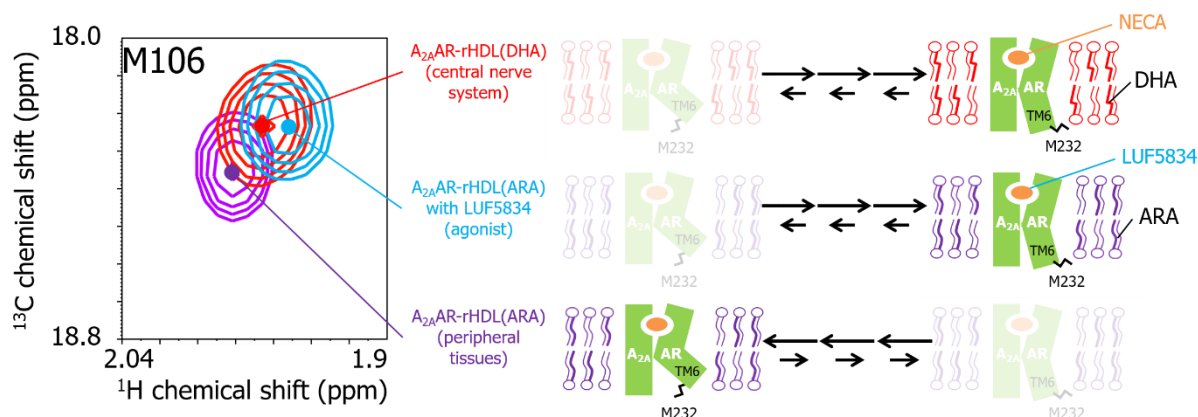


図 4. (左)各条件における M106 シグナルの比較。(右)本研究で提唱した、アゴニスト結合状態  $A_{2A}AR$  の、DHA 存在下と ARA 存在下における違い、および LUF5834 が  $A_{2A}AR$  の平衡に及ぼす影響。

**【考察】** 脂質二重膜中の脂質が GPCR に及ぼす影響は、(i) 脂質ドメインの影響、(ii) 膜の物理化学的性質の変化、(iii) 脂質の直接結合、の 3 種類に分類される。本研究では、rHDL に再構成した  $A_{2A}AR$  を用いているため、(i) の影響は排除されている。また、DHA と ARA が (ii) に与える影響は同程度であることが知られているのに対して、 $A_{2A}AR$  の活性および構造に与える影響は顕著に異なっていた。したがって、本研究で観測された DHA による  $A_{2A}AR$  の活性および構造変化は (iii) に起因すると考えた。また TM6 が軸周りに回転すると、TM6 に存在し側鎖が分子内側を向いている芳香族アミノ酸残基が脂質二重膜に露出して、DHA の二重結合と相互作用できるようになると考えられる。したがって、DHA が  $A_{2A}AR$  に結合することにより、TM6 が軸周りに回転した状態が比較的安定になると考えた。

中枢神経系において  $A_{2A}AR$  は睡眠を司っているため、 $A_{2A}AR$  のアゴニストは睡眠障害の治療薬となることが期待されている。一方、末梢組織において  $A_{2A}AR$  は血流の調節を担うため、 $A_{2A}AR$  のアゴニストは末梢組織の  $A_{2A}AR$  にも作用することで、動悸や血圧低下といった副作用を引き起こす。このような副作用を低減するためには、中枢神経系の  $A_{2A}AR$  に選択的に作用するアゴニストの開発が重要だと言われている。本研究の結果から LUF5834 は、DHA 豊富な中枢神経系の  $A_{2A}AR$  に選択的に作用することが期待される。このように、GPCR の構造平衡を指標として、特定の組織の GPCR に選択的に作用する薬剤の開発が可能であると考えた。

**【参考文献】** 1) Kofuku Y, Mizumura T, et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53** (2014) 13376–9  
2) Okude J, Mizumura T, et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54** (2015) 15771–6