

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 水村 拓也

膜環境による GPCR の活性制御機構の解明と題する本論文は、中枢神経系と末梢組織の A_{2A}AR が膜環境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ために、中枢神経系と末梢組織の脂質二重膜を再現した、DHA や ARA を含む rHDL に再構成した A_{2A}AR の活性および構造の違いを解析したものである。本論文は全 5 章から構成されており、第 1 章では序論、第 2 章では実験方法を記述している。第 3 章は、3-1 節および 3-2 節では A_{2A}AR-rHDL の NMR 解析系の確立について、3-3 節から 3-9 節では活性化状態 A_{2A}AR を対象とした実験結果について、3-10 節では活性化状態および不活性化状態の A_{2A}AR の間の平衡を対象とした実験結果について記述している。第 4 章では膜環境による GPCR の活性制御機構について、得られた結果に対する考察を述べている。第 5 章では全体の結論を述べている。

第 3 章においては、まず A_{2A}AR-rHDL の NMR 解析系を確立した成果を述べている。DHA や ARA を含まない rHDL に A_{2A}AR を再構成したうえで、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGE、リガンド結合アッセイを行うことにより、生理的なリガンド結合活性を保った状態で A_{2A}AR を rHDL に再構成できたことを示している。また、膜貫通領域ならびに細胞内キャビティにメチオニンを変異導入した、重水素化およびメチオニン側鎖メチル基を ¹³C 標識した A_{2A}AR を rHDL に再構成して、¹H-¹³C HMQC スペクトルを取得してメチオニン側鎖メチル基の NMR シグナルを観測することに成功している。これにより、A_{2A}AR の膜貫通領域や細胞内キャビティを含む分子全体にわたる構造解析を可能としている。

続いて、中枢神経系に対応する DHA 豊富な脂質組成と、末梢組織に対応する ARA 豊富な脂質組成における、活性化状態 A_{2A}AR の構造の違いを解明している。上記のように確立した NMR 解析系を用いて、NMR シグナルの化学シフトの DHA および ARA 依存

的な変化の解析、ならびに、solvent PRE 実験による各メチオニンの溶媒露出度の決定を行っている。脂質依存的な化学シフト変化とシグナル伝達活性の変化が良く相関していたこと、TM6 の回転や TM3 と TM6 の距離を反映して溶媒露出度が変化する M232, M106 の溶媒露出度が脂質依存的に変化していたことから、活性化状態 $A_{2A}AR$ は、TM6 の回転角、TM3 と TM6 の距離、G タンパク質活性化能の異なる複数の構造の平衡状態にあり、中枢神経系に対応する DHA 豊富な条件と、末梢組織に対応する ARA 豊富な条件とでは、その量比が異なっていることを明らかとしている。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 $A_{2A}AR$ を用いていることから (i) の影響はないとしたうえで、DHA と ARA が (ii) に与える影響は同程度であるにもかかわらず $A_{2A}AR$ の活性および構造に与える影響は顕著に異なっていたことから、観測された脂質による $A_{2A}AR$ の活性および構造変化は (iii) に起因すると提唱している。さらに、LUF5834 存在下の M106 シグナルが DHA 存在下の化学シフトに近い位置に観測されたことから、LUF5834 は、活性化状態 $A_{2A}AR$ の平衡を DHA と同じ方向に偏らせることによって、DHA 存在下の $A_{2A}AR$ に対する親和性が高いことを示している。

最後に、活性化状態と不活性化状態の $A_{2A}AR$ の平衡について解析している。様々なシグナル伝達強度を有するリガンドが結合した状態の $A_{2A}AR$ -rHDL の NMR 解析を行うことにより、活性化状態と不活性化状態の $A_{2A}AR$ が平衡状態にあり、リガンドは活性化状態 $A_{2A}AR$ の量比を決定することでシグナル伝達強度を制御していることを明らかとしている。さらに、活性化状態 $A_{2A}AR$ の量比は DHA や ARA によって変化しないことを明らかとしている。

本研究で明らかとした、DHA や ARA による $A_{2A}AR$ の平衡状態の違いは、中枢神経系と末梢組織における $A_{2A}AR$ の違いを説明するものであり、膜環境による GPCR の活性制御の分子機構に対して重要な知見を与えるものである。したがって、これら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。