

博士論文

$\mu$  オピオイド受容体が細胞内シグナルを選択的に  
活性化する機構の解明

奥出 順也

## 略語

5-HT	5-hydroxytryptamine
AEBSF	4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CCR (CXCR)	Chemokine receptor
CHS	cholesteryl hemisuccinate tris salt
CTZ	chemoreceptor trigger zone
DAMGO	[D-Ala <sup>2</sup> , N-MePhe <sup>4</sup> , Gly-ol]-enkephalin
DDM	n-dodecyl β-d-maltoside
DNA	deoxyribonucleotide
DTT	dithiothreitol
ECL	extracellular loop
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ERG	ergotamine
FPLC	fast protein liquid chromatography
GDP	guanosine diphosphate
GPCR	G protein coupled receptor
GRK	G protein coupled receptor kinase
GTP	guanosine triphosphate
HA	hemagglutinin
HEK293	human embryonic kidney 293
HEPES	hydroxyethylpiperazinethanesulfonic acid
ICL	intracellular loop
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
LMNG	lauryl maltose neopentyl glycol
MAP	mitogen-activated protein
MBP	maltose binding protein
MSP	membrane scaffolding protein
MWCO	molecular weight cut-off
NMR	nuclear magnetic resonance
NOP	nociceptin/orphanine FQ receptor
PAGE	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine

POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylglycerol
PVDF	polyvinylidene fluoride
RI	radio isotope
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEC	size exclusion chromatography
SOFAST-HMQC	band-selective optimized flip-angle short transient hetero-nuclear multi quantum coherence
TB	Terrific broth
TBS	tris buffered saline
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEV	tobacco Etch Virus
TM	transmembrane
TTBS	Tween 20-TBS
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
rHDL	reconstituted high density lipoprotein
tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
$\beta$ -FNA	$\beta$ -funaltrexamine
$\beta_2$ AR	$\beta_2$ adrenergic receptor
$\delta$ OR (DOR)	$\delta$ opioid receptor
$\kappa$ OR (KOR)	$\kappa$ opioid receptor
$\mu$ OR (MOR)	$\mu$ opioid receptor

# 目次

第1章 序論	6
1.1. オピオイド受容体の概略	6
1.2. GPCR における signaling bias 機構	8
1.3. GPCR のシグナル伝達機構に関する構造生物学的知見	13
1.3.1. 三量体 G タンパク質と GPCR の複合体の X 線結晶構造解析	13
1.3.2. アレスチンペプチドと GPCR の複合体の X 線結晶構造解析	14
1.3.3. バイアスリガンド結合状態の GPCR の X 線結晶構造解析	15
1.3.4. efficacy の異なるリガンド結合状態の GPCR の NMR 解析	17
1.4. $\mu$ OR の構造に関する知見	19
1.5. 目的	21
第2章 材料と方法	22
2.1. 試薬・バッファー・培地組成	22
2.1.1. バッファー	22
2.1.2. 培地組成	27
2.2. アミノ酸の重水素化	29
2.2.1. cystathionine- $\gamma$ -synthase の調製	29
2.2.2. [methyl- $^{13}\text{C}$ ] <sub>L</sub> -methionine の[ $\alpha,\beta,\beta$ ,- $^2\text{H}_3$ ] 化反応と反応進行の評価	30
2.2.3. [ $^2\text{H}_7$ ] <sub>D,L</sub> -tyrosine の調製	31
2.3. $\mu$ OR の発現系の構築	32
2.3.1. $\mu$ OR の発現系	32
2.3.2. $\mu$ OR の各種変異体の発現系の構築	32
2.4. $\mu$ OR の発現	33
2.4.1. 昆虫細胞	33
2.4.2. $\mu$ OR 発現用のリコンビナントバキュロウイルスの調製	33
2.4.3. $\mu$ OR の非標識体の発現	34
2.4.4. $\mu$ OR の[methyl- $^{13}\text{C}$ Met] 標識体の発現	34
2.4.5. $\mu$ OR の[ $^2\text{H}$ -8AA, methyl- $^{13}\text{C}$ Met] 標識体の発現	35
2.5. $\mu$ OR の精製	36
2.5.1. 形質膜画分の調製	36
2.5.2. TEV protease の調製	36
2.5.3. $\mu$ OR を発現した膜画分の可溶化および精製	37
2.6. $\mu$ OR の rHDL への再構成	38
2.6.1. MSP1 の調製	38
2.6.2. $\mu$ OR の rHDL への再構成	39
2.7. $\mu$ OR-rHDL を用いた[ $^3\text{H}$ ] diprenorphine 結合実験	40

2.8. $\mu$ OR-rHDL を用いた GDP-GTP 交換実験 .....	40
2.8.1. $G\alpha i3$ の調製 .....	40
2.8.2. $G\beta 1\gamma 2$ の調製 .....	41
2.8.3. $G\alpha i3\beta 1\gamma 2$ の調製 .....	42
2.8.4. GDP-GTP 交換実験 .....	42
2.9. $\mu$ OR-rHDL を用いたリン酸化実験 .....	43
2.9.1. GRK2 の調製 .....	43
2.9.2. GRK2 による $\mu$ OR-rHDL のリン酸化 .....	43
2.10. NMR 試料の調製 .....	44
2.11. NMR 測定および解析 .....	44
2.11.1. $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ SOFAST HMQC 法 .....	45
2.11.2. $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC 法 .....	45
第3章 結果 .....	46
3.1. $\mu$ OR の調製 .....	46
3.1.1. ミセル中での $\mu$ OR の精製 .....	46
3.1.2. $\mu$ OR の rHDL への再構成 .....	47
3.2. rHDL に再構成した $\mu$ OR のリガンド結合活性の評価 .....	49
3.2.1. [ $^3\text{H}$ ] diprenorphine 結合実験 (saturation binding assay) .....	49
3.2.2. [ $^3\text{H}$ ] diprenorphine を用いた競合阻害実験 .....	50
3.3. rHDL に再構成した $\mu$ OR のシグナル伝達活性の定量的評価 .....	53
3.3.1. [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S を用いた GDP-GTP 交換実験 .....	54
3.3.2. GRK2 による $\mu$ OR のリン酸化 .....	56
3.3.3. N152A 変異体のシグナル伝達活性の評価 .....	58
3.3.4. 各状態の bias factor の算出 .....	59
3.4. メチオニン側鎖メチル基選択標識した $\mu$ OR の NMR 解析 .....	60
3.4.1. $\mu$ OR の NMR 解析の概要と戦略 .....	60
3.4.2. $\mu$ OR の[methyl- $^{13}\text{C}$ ] 標識体の NMR スペクトル .....	62
3.4.3. NMR スペクトルの簡略化 .....	63
3.5. $\mu$ OR の $^2\text{H}$ 標識体の調製 .....	67
3.5.1. $^2\text{H}$ 標識の概要と戦略 .....	67
3.5.2. $^2\text{H}$ 標識アミノ酸の選定 .....	68
3.5.3. 均一重水素化 tyrosine ([ $^2\text{H}_7$ ] D,L-Tyr, $^2\text{H}$ -Tyr) の合成 .....	69
3.5.4. [ $^2\text{H}$ -8AA, methyl- $^{13}\text{C}$ Met] $\Delta 6\text{M}$ 変異体の NMR スペクトル .....	72
3.6. メチオニンシグナルの帰属 .....	74
3.6.1. M245 <sup>5,49</sup> のメチルシグナルの帰属 .....	76
3.6.2. M163 <sup>3,46</sup> のメチルシグナルの帰属 .....	77
3.6.3. M257 <sup>5,61</sup> のメチルシグナルの帰属 .....	79
3.6.4. 他のメチオニン残基の帰属に関して .....	82

3.7. TM5 の膜貫通領域中腹に位置する M245 <sup>5,49</sup> の構造変化.....	83
3.7.1. antagonist および full agonist 結合状態の NMR 解析 .....	83
3.7.2. partial agonist 結合状態の NMR 解析.....	85
3.7.3. G protein biased partial agonist 結合状態の NMR 解析.....	86
3.7.4. アレスチンをより活性化する N152A 変異体の NMR 解析 .....	86
3.8. TM3 の膜貫通領域中腹に位置する M163 <sup>3,46</sup> の構造変化.....	87
3.8.1. antagonist および full agonist 結合状態の NMR 解析 .....	87
3.8.2. partial agonist 結合状態の NMR 解析.....	89
3.8.3. G protein biased partial agonist 結合状態の NMR 解析.....	90
3.8.4. アレスチンをより活性化する N152A 変異体の NMR 解析 .....	91
第 4 章 考察.....	92
4.1. 不活性化状態および活性化状態における $\mu$ OR の動的構造 .....	92
4.2. partial agonist 結合状態における $\mu$ OR の動的構造 .....	94
4.3. biased ligand 結合状態における $\mu$ OR の動的構造.....	97
4.4. signaling bias 機構に関してこれまでに提唱されている機構と本研究で提唱する機構との比較.....	102
4.5. 本研究の創薬への応用に関して .....	103

# 第 1 章 序論

## 1.1. オピオイド受容体の概略

オピオイド受容体は、ニューロペプチドであるエンドルフィンやエンケファリン、ダイノルフィンの受容体で、中枢神経系および末梢の腸管筋層の神経叢など多岐にわたって分布している。 $\mu$  ( $\mu$ OR または MOR), および  $\kappa$  ( $\kappa$ OR または KOR),  $\delta$  ( $\delta$ OR または DOR), ノシセプチン/OFQ 受容体 (NOP) の 4 種のサブタイプがあり、 $\mu$ OR は主に脳幹や視床内側野に、 $\kappa$ OR は主に大脳辺縁系や他の間脳領域、脳幹、脊髄に、 $\delta$ OR は脳内に広く分布している。代表的な機能としては、鎮痛および鎮静 ( $\mu$ OR,  $\kappa$ OR,  $\delta$ OR)、延髄呼吸中枢への直接作用による呼吸抑制 ( $\mu$ OR)、腸神経叢を介した消化管運動抑制 (主に  $\mu$ OR)、気道上の知覚神経刺激による鎮咳、延髄第 4 脳室底にある化学受容器引き金帯 (CTZ) への直接作用による催吐 ( $\mu$ OR)、動眼神経核刺激による縮瞳などがある。

$\mu$ OR はクラス A の  $\gamma$  サブファミリーに属する GPCR であり、疼痛や急性肺浮腫、咳嗽、下痢、振戦の治療のための有効な標的分子である。morphine などのアゴニストと結合した  $\mu$ OR は、細胞内の三量体 G タンパク質  $G_i / G_o$  を活性化する (G タンパク質シグナル) (Fig. 1-1)。活性化された  $\mu$ OR が侵害受容器である  $A\delta$  繊維や C 繊維のシナプス前神経終末に局在化し、 $G_o$  を介した電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルの阻害や  $G_i$  を介した cAMP 量の減少が生じ、グルタミン酸やサブスタンス P、カルシトニン遺伝子関連ペプチド等の神経伝達物質の侵害受容器からの放出が抑制され、鎮痛作用が生じる [1]。

$\mu$ OR にアゴニストが作用すると、三量体 G タンパク質を活性化すると同時に  $\mu$ OR の脱感作も誘起される。アゴニストが結合した  $\mu$ OR は、G タンパク質  $\beta\gamma$  サブユニットを介して G タンパク質共役型受容体キナーゼ (GRK) を活性化し、活

活性化された GRK が  $\mu$ OR をリン酸化することで  $\mu$ OR が G タンパク質と脱共役し、リン酸化された  $\mu$ OR はアレスチンを介して細胞内へ取り込まれる（アレスチンシグナル）。また、アレスチンは、様々なシグナル伝達分子の足場タンパク質として機能することから、受容体の細胞内への取り込みだけでなく、MAP キナーゼ分子群をリクルートし、MAP キナーゼカスケードを促進する [2]。 $\beta$ -arrestin 2 をノックアウトしたマウスでは、野生型と比べて、morphine の鎮痛作用が増強し、便秘や呼吸抑制、耐性などの副作用が減弱することが知られている [3, 4]。このことから、アレスチンシグナルが、便秘、呼吸抑制、耐性などの副作用に関与していることが示唆されている。

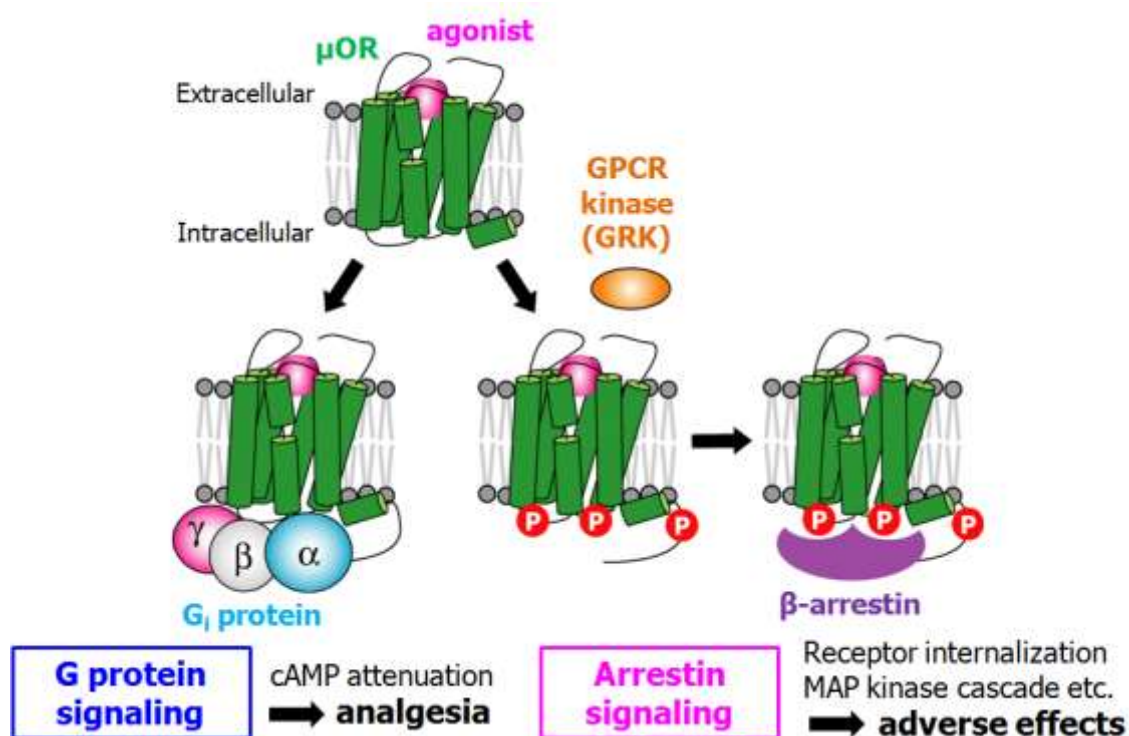


Fig.1-1  $\mu$ OR による、G タンパク質 (左) および GRK とアレスチン (右) を介したシグナルの活性化



## 1.2. GPCR における signaling bias 機構

前項で述べたように GPCR は G タンパク質を介したシグナル伝達だけでなく、G タンパク質の活性化に依存しないアレスチンを介したシグナル伝達も誘起する。G タンパク質を介したシグナル、アレスチンを介したシグナル、いずれのシグナルについても同じ大きさの活性化能、すなわち efficacy を有しているアゴニストを、balanced agonist と呼ぶ。しかしながら、近年、一方のシグナルを他方のシグナルよりも強く活性化するアゴニスト、すなわち biased agonist が存在することが明らかとなっている。このように一方のシグナルを他方のシグナルよりも強く活性化する機構を signaling bias 機構と呼び、G タンパク質を介したシグナルを強く活性化するアゴニストを G protein biased agonist、アレスチンを介したシグナルを強く活性化するアゴニストを  $\beta$ -arrestin biased agonist と呼んでいる。このような、biased agonist は、従来の医薬品よりも副作用の生じにくい薬となることが期待されている (Table. 1-1)。

$\mu$ OR のアゴニストである TRV130 は、G protein biased agonist であることが報告されている (Fig. 1-2) [4]。TRV130 と balanced agonist である morphine の薬効を比較すると、いずれのアゴニストも同程度の鎮痛作用を誘起するが、morphine では呼吸抑制や便秘などといった副作用が生じる一方、TRV130 ではこれらの副作用が生じにくいことが分かっている (Figure. 1-3, 1-4)。また、 $\mu$ OR の類縁体である  $\delta$  オピオイド受容体 ( $\delta$ OR) の TM3 に位置する N131<sup>3.35</sup> は、リガンド結合部位近傍にある Na<sup>+</sup> と相互作用しており、N131<sup>3.35</sup>A 変異体がアレスチンシグナルを恒常的にかつ選択的に活性化する  $\beta$ -arrestin constitutively active mutant であることが、生化学的な解析から示唆されている (Fig. 1-5, 1-6) [5]。したがって、 $\mu$ OR が一方のシグナルを選択的に活性化する機構を解明することは、副作用の生じにくい鎮痛薬を開発する上で重要である。

Table. 1-1 シグナルの選択性が薬効上重要であると考えられている GPCR (Kenakin, 2011)

Proposed therapeutic applications of functional selectivity and biased signaling

Receptor	Effect	Therapy
Thyroid-stimulating hormone	Activation $G_{\alpha_q} \gg G_{\alpha_r}$	Selective thyroid hormone synthesis
$\beta$ -Adrenoceptor	Activation $G_{\alpha_s} \gg G_{\alpha_1}$	Treatment of congestive heart failure
Histamine	$\uparrow$ cAMP $\gg$ allergic response	Neuropsychiatric/neurodegenerative disorders
GPR109	$G_{\alpha_i} \gg \beta$ -arrestin activation	$\downarrow$ Triglycerides with no cutaneous flushing
$\alpha_2$ -Adrenoceptor	$\downarrow$ $\beta$ -Arrestin activation	Hypotension with reduced sedation
Dopamine D2	$\downarrow$ Mitogen-activated protein kinase phosphorylation + $\downarrow$ internalization	Improved profile for treatment of schizophrenia
PTH	Selective $\beta$ -arrestin activation	Improved treatment of osteoporosis
Opioid	$\downarrow$ $\beta$ -Arrestin interaction	Analgesia with $\downarrow$ tolerance/ $\downarrow$ respiratory depression/ $\downarrow$ constipation
Dopamine D1	$\downarrow$ Internalization	Improved therapy for Parkinson
Angiotensin	$\uparrow$ $\beta$ -Arrestin activation/ $\downarrow$ G protein activation	Antihypertensive therapy with antiapoptotic effect
Angiotensin	$\uparrow$ $\beta$ -Arrestin activation/ $\downarrow$ G protein activation	Antihypertensive effect with cardioprotection
5-Hydroxytryptamine	$\downarrow$ Interaction with PTEN	Treatment of addiction
Gastrin-releasing peptide/ Arg vasopressin	Receptor blockade + ERK stimulation	Treatment of small-cell lung cancer
$\beta$ -Adrenoceptor	Receptor blockade + ERK stimulation	Improved treatment of congestive heart failure
Many overexpressed seven-transmembrane receptors	$\uparrow$ Receptor internalization	Numerous cancers
5-Hydroxytryptamine	$\uparrow$ Receptor internalization	Treatment of psychosis/depression

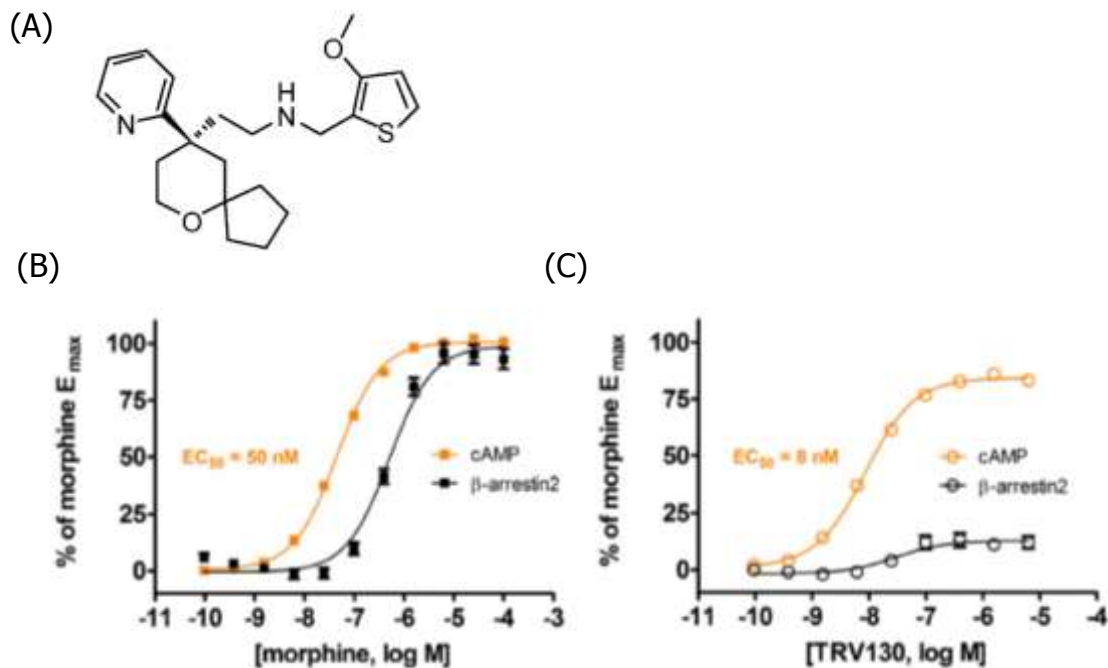


Fig. 1-2 morphine および TRV130 のシグナル伝達活性の違い (Dewire et al., 2013)

(A) TRV130 の構造式

(B, C) HEK293 細胞に morphine (B) および TRV130 (C) を添加した時の、cAMP 産生抑制量 (オレンジ) および  $\beta$ -arrestin2 の受容体への結合量 (黒)

(B) および(C) は、morphine 作用時の最大反応を 100 % として規格化して示している。

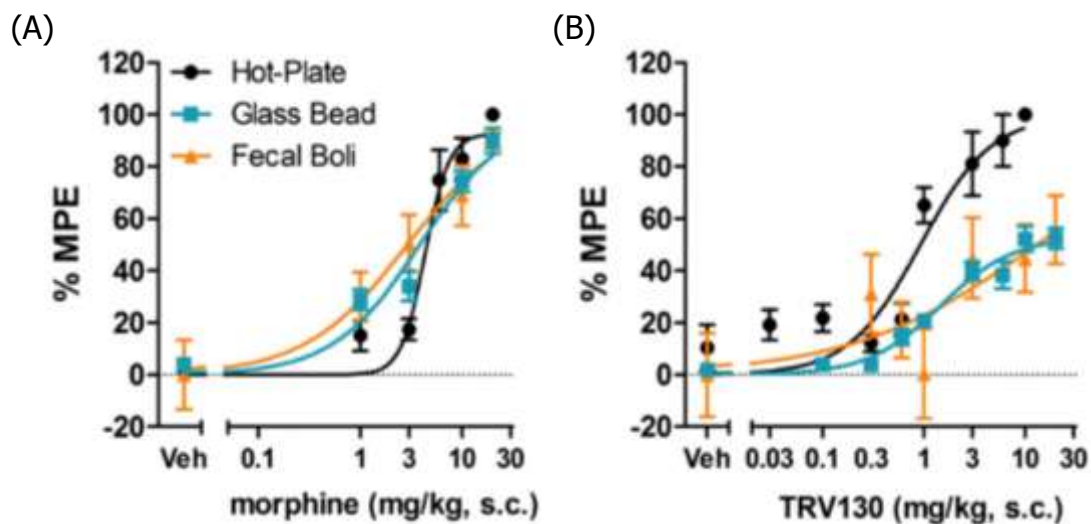


Fig. 1-3 morphine および TRV130 の薬効の違い (その 1) (Dewire et al., 2013)

morphine (A) または TRV130 (B) をマウスに投与した時の、鎮痛作用 (Hot-Plate) および便秘作用 (Glass Bead, Fecal Boli) の比較

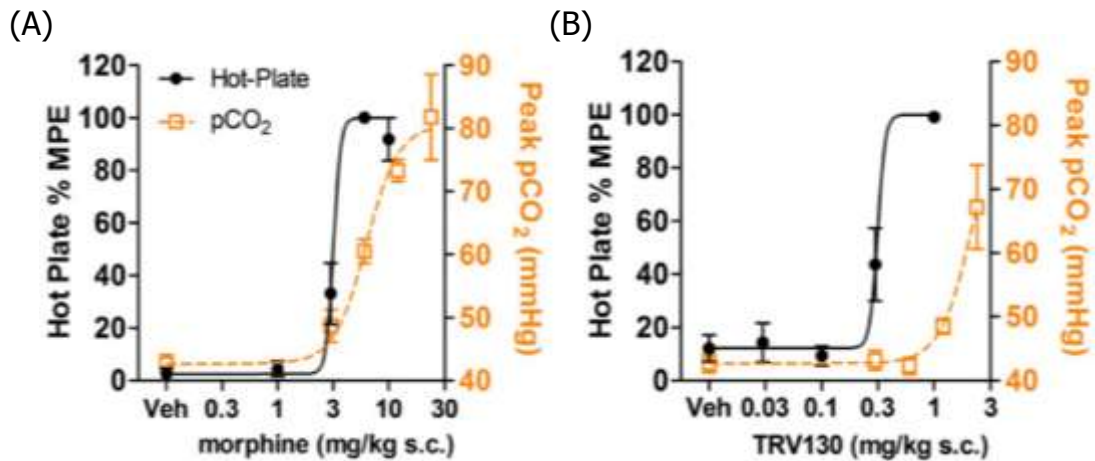


Fig. 1-4 morphine および TRV130 の薬効の違い (その 2) (Dewire et al., 2013)  
morphine (A) または TRV130 (B) をマウスに投与した時の、鎮痛作用 (Hot-Plate)  
および呼吸抑制作用 (pCO<sub>2</sub>) の比較

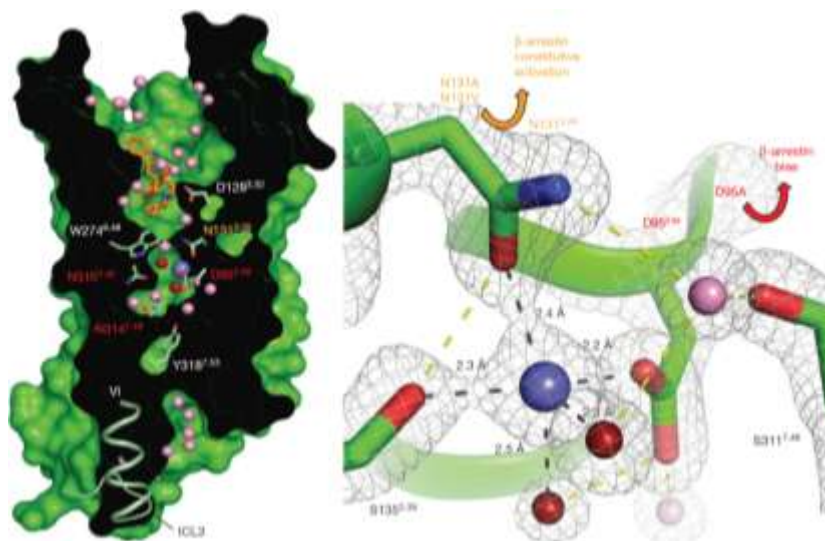
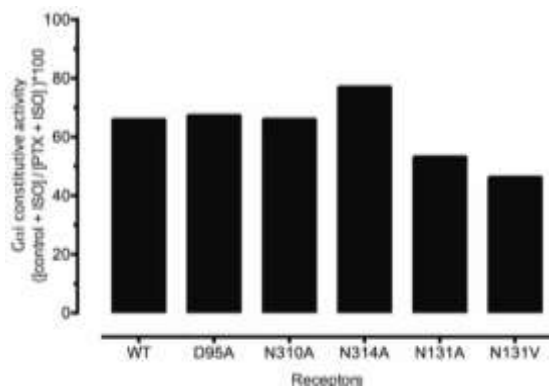
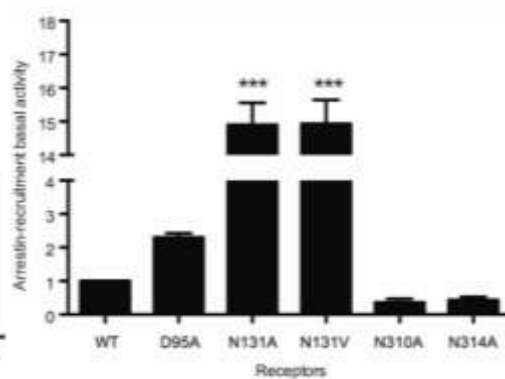


Fig. 1-5 δOR における Na<sup>+</sup> イオン結合部位近傍の構造  
(左) 表面表示、(右)スティック表示 (Fenalti et al., 2014)

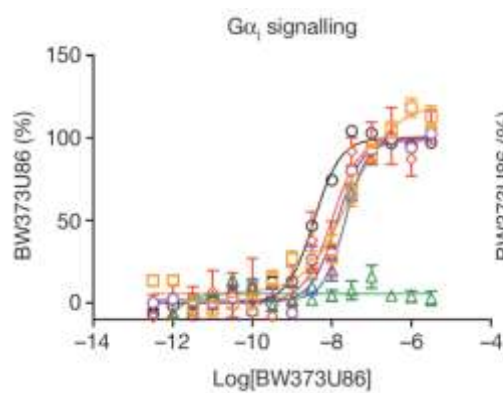
(A)



(B)



(C)



(D)

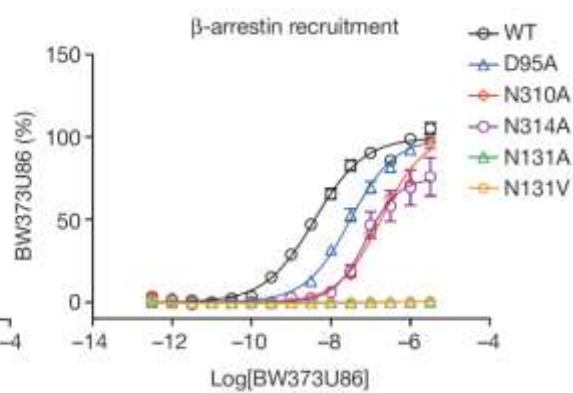


Fig. 1-6 N131A 変異導入による  $\delta$ OR のシグナル伝達活性の変化 (Fenalti et al., 2014)

(A, B) リガンド刺激非存在下 (ligand-free) における G タンパク質シグナル (cAMP 産生抑制量、A) の大きさとアレスチンシグナル (arrestin の結合、B) の大きさ。

(C, D) 各 BW373U86 (full agonist) の濃度における G タンパク質シグナル (cAMP 産生抑制量、C) の大きさとアレスチンシグナル (arrestin の結合、D) の大きさ。

### 1.3. GPCR のシグナル伝達機構に関する構造生物学的知見

#### 1.3.1. 三量体 G タンパク質と GPCR の複合体の X 線結晶構造解析

2011 年に、Brian K. Kobilka らのグループが、full agonist である BI-167107 および三量体 G タンパク質 Gs が結合した活性化状態の  $\beta_2$  アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ AR) の結晶構造を報告した [6]。活性化状態の  $\beta_2$ AR では、inverse agonist である carazolol が結合した不活性化状態の  $\beta_2$ AR の結晶構造 [7] と比較して、TM5、6 の細胞内領域が受容体外側に大きく開いていた (Fig. 1-7)。Gs は、この構造変化によって生じた空洞に入り込み、 $\beta_2$ AR と相互作用を形成していた。このことから、アゴニストの結合に伴い TM 5、6 の相対配置が変化することで、Gs との相互作用部位が形成され、Gs が結合することによってシグナルが伝達されることが明らかとなった。

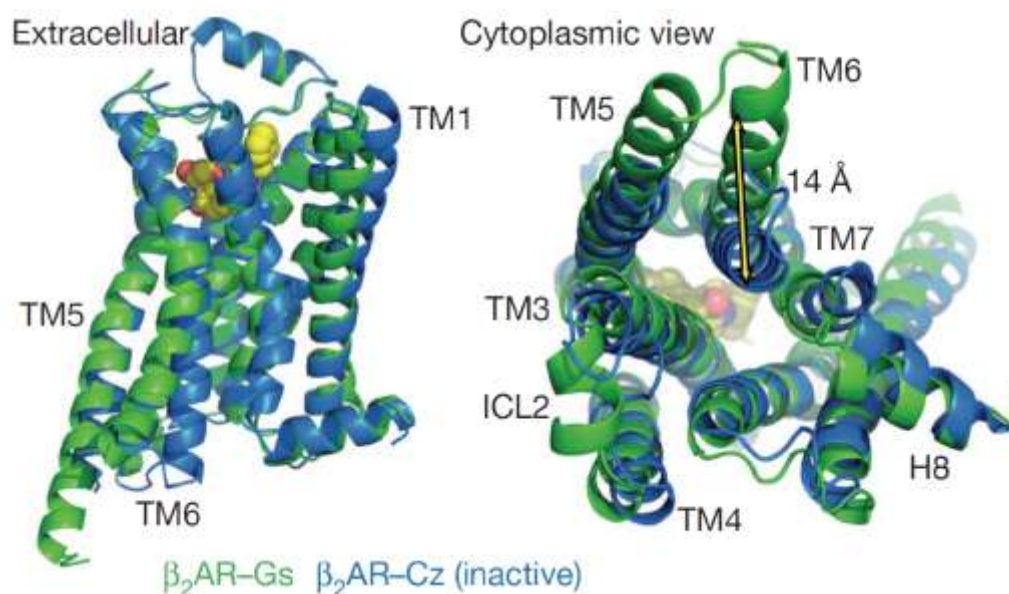


Fig. 1-7 活性化状態および不活性化状態の  $\beta_2$ AR の構造の比較 (Rasmussen et al., 2011)

(緑) full agonist である BI-167107 および三量体 G タンパク質 Gs が結合した活性化状態の  $\beta_2$ AR の X 線結晶構造 (PDB code : 3SN6)、(青) inverse agonist である carazolol が結合した不活性化状態の  $\beta_2$ AR の X 線結晶構造 (PDB code : 2RH1)



### 1.3.2. アレスチンペプチドと GPCR の複合体の X 線結晶構造解析

2014 年に、Patrick Scheerer らのグループが、rod photoreceptor arrestin の finger loop 領域由来のペプチド ( $^{67}\text{YGQEDIDVLGL}^{77} = \text{ArrFL-1}$ ) と活性化状態のオプシン (Ops\*) との複合体結晶構造を報告した (Fig. 1-8) [8]。Ops\*-ArrFL-1 の構造において、活性化状態の GPCR に特徴的な構造変化、すなわち TM6 の細胞内領域が受容体コアから 7 Å 以上開き、TM5 の細胞内領域が受容体コアの方へ動く構造変化を示した。この構造変化の結果、受容体の細胞内領域が開いた構造をとり、ArrFL-1 の結合ポケットが形成された。また、この構造は、G タンパク質  $\alpha$  サブユニットの C 末端領域 (G $\alpha$ CT) が結合した Ops\* の構造 (PDB code : 3DQB) と概ね一致していた。しかしながら、ArrFL-1 と G $\alpha$ CT とで、受容体の相互作用部位が異なっていた。ArrFL-1 において、G $\alpha$ CT と比較して TM5 および TM6 との相互作用が弱いのに対し、TM7 および H8 の NPxxY モチーフや、TM3 の E(D)RY モチーフとは G $\alpha$ CT と同様に相互作用を形成していた。以上の結果から、G タンパク質およびアレスチンとで受容体との相互作用界面の違いが、細胞内シグナルの選択性と関連していることが示唆された。

Table. 1-1 三量体 G タンパク質が結合した  $\beta_2\text{AR}$  の構造とアレスチンの finger loop 領域由来のペプチドが結合したオプシンの構造との比較

GPCR	結合している リガンド	結合している タンパク質	TM6 の平行移動の 大きさ
$\beta_2\text{AR}$ (PDB code : 3SN6)	BI-167107 (full agonist)	三量体 G タンパク質 アレスチンの	~14 Å
Opsin (PDB code : 4PXF)	なし	フィンガーグループ 領域のペプチド	6-7 Å

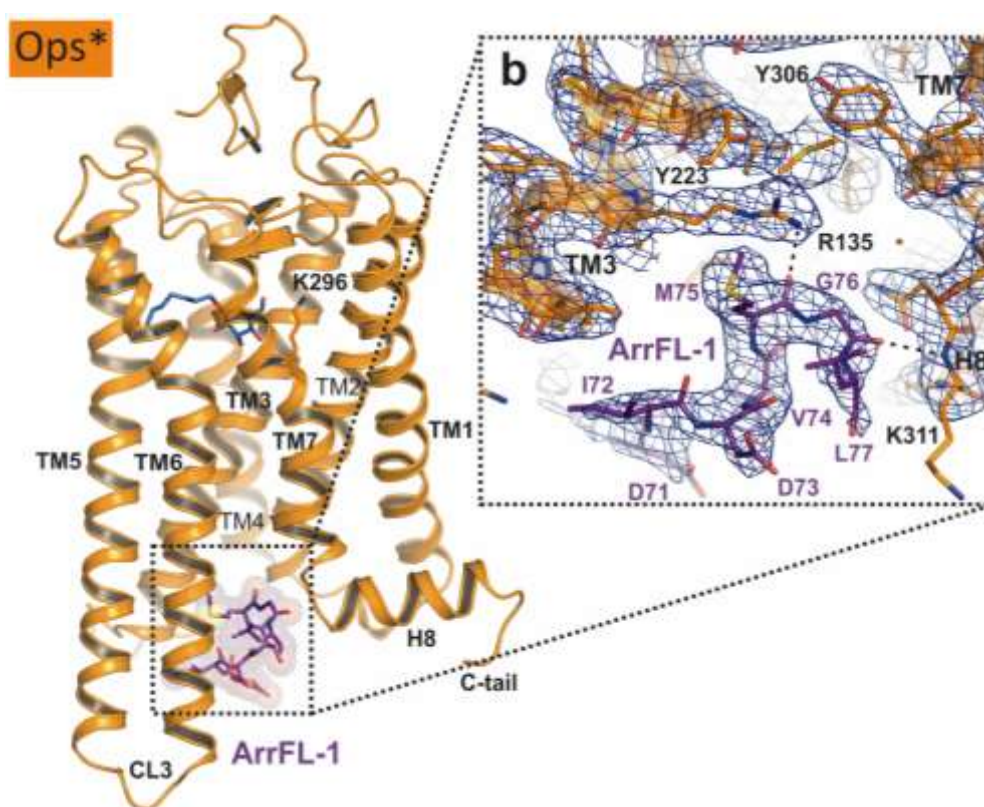


Fig. 1-8 ArrFL-1 が結合した活性化状態のオプシンの結晶構造 (PDB code : 4PXF) (Szczepek et al., 2014)

### 1.3.3. バイアスリガンド結合状態の GPCR の X 線結晶構造解析

2013 年に、Raymond C. Stevens らのグループが、GPCR の一種であるセロトニン (5-HT) 受容体のアゴニストである ergotamine (ERG) が、5-HT<sub>1B</sub> 受容体において balanced agonist として機能するのに対し、5-HT<sub>2B</sub> 受容体において  $\beta$ -arrestin biased agonist として機能することを生化学的解析から明らかにし、これら 2 種類のサブタイプの ERG 結合状態の結晶構造を得ることで、signaling bias 機構が生じる機構を提唱した [9]。

GPCR 間でよく保存され、活性化に伴う構造変化の引き金となることが知られている P/I/F モチーフの構造を 5-HT<sub>1B</sub> 受容体と 5-HT<sub>2B</sub> 受容体とで比較した (Fig. 1-9)。5-HT<sub>1B</sub> 受容体の P<sup>5.50</sup>, I<sup>3.40</sup>, F<sup>6.44</sup> (上付きの数字 (N1.N2) は、そのアミノ



酸残基が存在する膜貫通ヘリックスの番号 (N1)、その膜貫通領域で最も保存された残基を 50 とした時の相対的な番号 (N2) である (Ballesteros and Weinstein (1995) *Meth. Neurosci.* 25, 366-428)) の側鎖配向は、活性化状態の  $\beta_2\text{AR}\cdot\text{R}^*$  と一致していた。一方、5-HT<sub>2B</sub> 受容体において、P<sup>5.50</sup> および I<sup>3.40</sup> の側鎖配向は、活性化状態の  $\beta_2\text{AR}\cdot\text{R}^*$  と一致していたが、F<sup>6.44</sup> の側鎖配向は不活性化状態の  $\beta_2\text{AR}\cdot\text{R}$  と概ね一致していた。P-I-F モチーフと同様に GPCR 間によく保存され、活性化に伴い構造変化することが知られている NPxxY モチーフの構造を 5-HT<sub>1B</sub> 受容体と 5-HT<sub>2B</sub> 受容体とで比較したところ、いずれの受容体においても Y<sup>7.53</sup> の側鎖配向は、活性化状態の  $\beta_2\text{AR}\cdot\text{R}^*$  と概ね一致していた (Fig. 1-10)。

このことから、TM6 の構造変化が G タンパク質シグナル伝達に、TM7 の構造変化がアレチンシグナル伝達に重要であることが示唆され、Raymond C. Stevens らのグループが行った <sup>19</sup>F-NMR の解析と概ね対応していた[10]。

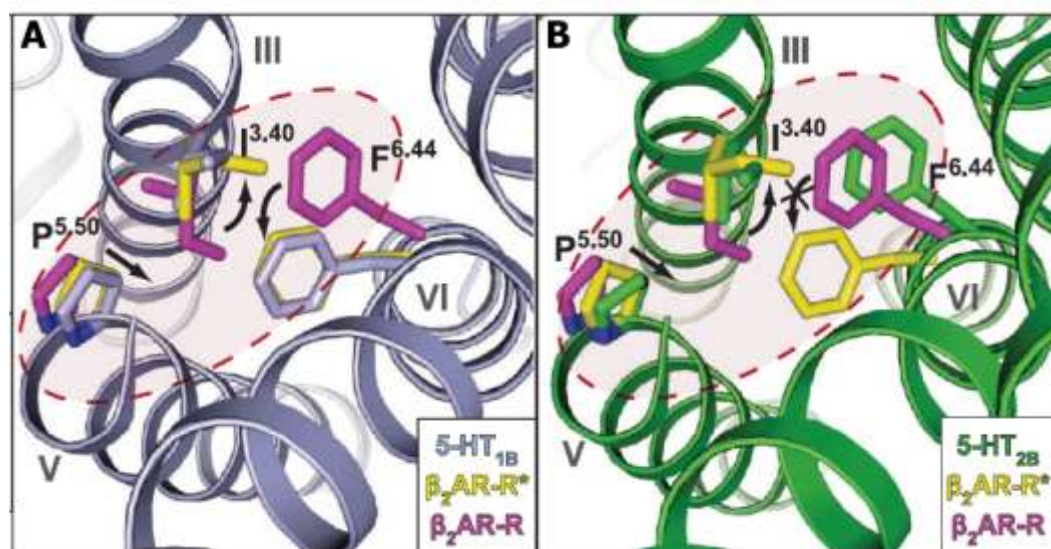


Fig. 1-9 ergotamine 結合状態の 5-HT<sub>1B</sub> 受容体と 5-HT<sub>2B</sub> 受容体の P-I-F モチーフのコンフォメーションの違い (Wacker et al., 2013)  
 活性化状態の  $\beta_2\text{AR}$  ( $\beta_2\text{AR}\cdot\text{R}^*$ 、黄) および不活性化状態の  $\beta_2\text{AR}$  ( $\beta_2\text{AR}\cdot\text{R}$ 、マゼンタ) と、(A) 5-HT<sub>1B</sub> 受容体 (灰)、(B) 5-HT<sub>2B</sub> 受容体 (緑) の、P-I-F モチーフの構造の重ね合わせ

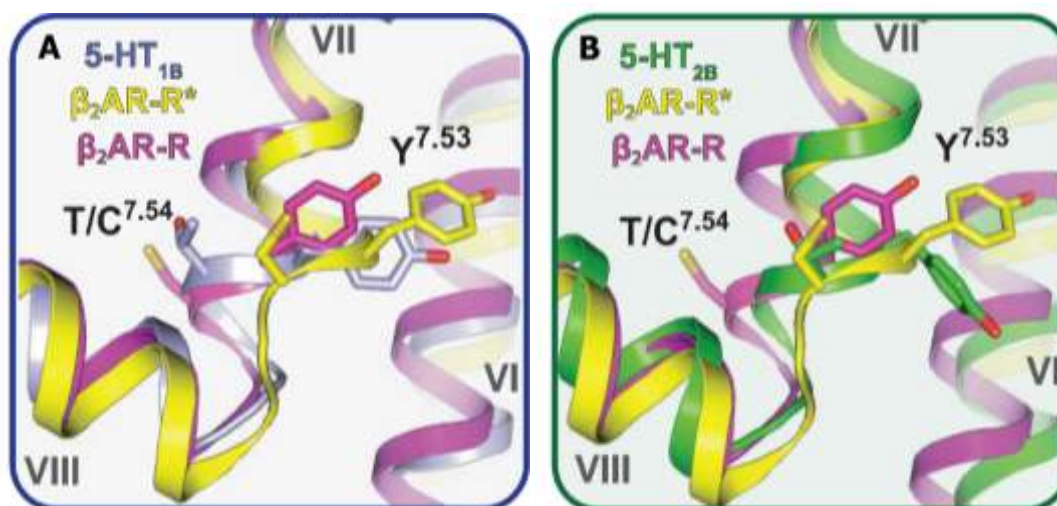


Fig. 1-10 ergotamine 結合状態の 5-HT<sub>1B</sub> 受容体と 5-HT<sub>2B</sub> 受容体の NPxxY モチーフのコンフォメーションの違い (Wacker et al., 2013)  
 活性化状態の  $\beta_2$ AR ( $\beta_2$ AR-R\*, 黄) および不活性化状態の  $\beta_2$ AR ( $\beta_2$ AR-R, マゼンタ) と、(A) 5-HT<sub>1B</sub> 受容体 (灰)、(B) 5-HT<sub>2B</sub> 受容体 (緑) の、NPxxY モチーフの構造の重ね合わせ

#### 1.3.4. efficacy の異なるリガンド結合状態の GPCR の NMR 解析

我々は、メチオニン残基の側鎖メチル基を  $^{13}\text{C}$  標識した  $\beta_2$ AR の NMR 解析を行った [11]。その結果、inverse agonist、antagonist、weak partial agonist、partial agonist、full agonist をそれぞれ添加した条件において、Met82<sup>2.53</sup> のメチル基に由来するシグナルの化学シフトが、各リガンドの efficacy に応じて連続的に変化し、さらに測定温度を変えると weak partial agonist および、partial agonist 結合状態における Met82<sup>2.53</sup> のシグナルが full agonist における Met82<sup>2.53</sup> のシグナルに近づくように化学シフトが変化した (Fig. 1-11)。このことから、 $\beta_2$ AR が活性化状態と不活性化状態の間を化学交換しており、リガンドの efficacy に応じて各状態の量比を変えることによってシグナル伝達活性を調節していることを明らかにした。

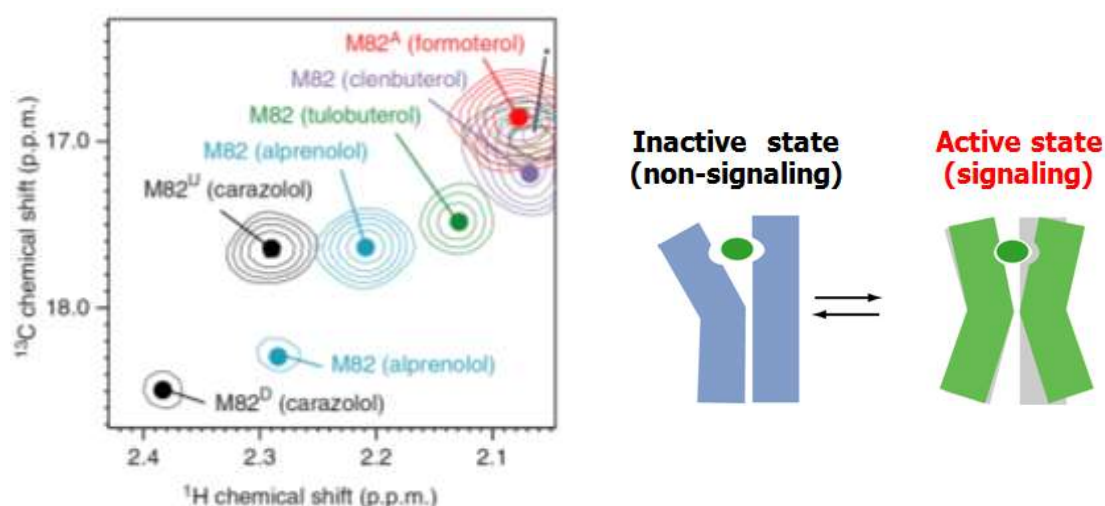


Fig. 1-11  $[\alpha, \beta, \beta\text{-}^2\text{H}_3\text{-}, \text{methyl-}^{13}\text{C-Met}] \beta_2\text{AR/4Met}$  の  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  SOFAST-HMQC の重ね合わせ (298 K、Met82 由来のシグナルを含む領域を表示、\* は夾雑タンパク質由来) (左) (Kofuku et al., 2012) と  $\beta_2\text{AR}$  の構造平衡の模式図 (右) (赤) formoterol (full agonist), (紫) clenbuterol (partial agonist), (緑) tulobuterol (weak partial agonist), (青) alprenolol (antagonist), (黒) carazolol (inverse agonist)

さらに、Met215<sup>5,54</sup>、Met279<sup>6,41</sup> に由来するシグナルは、リガンドの efficacy が増大するにつれ連続的に化学シフトが変化すると共に、顕著に広幅化し、full agonist 結合状態では観測されなくなった (Fig. 1-12)。このことから、活性化状態の  $\beta_2\text{AR}$  において、複数のコンフォメーション間の動的構造平衡にあることを明らかにした。このような、GPCR の活性化状態に存在する、複数のコンフォメーション間の動的構造平衡が、signaling bias 機構に重要な役割を担っていることが示唆された。

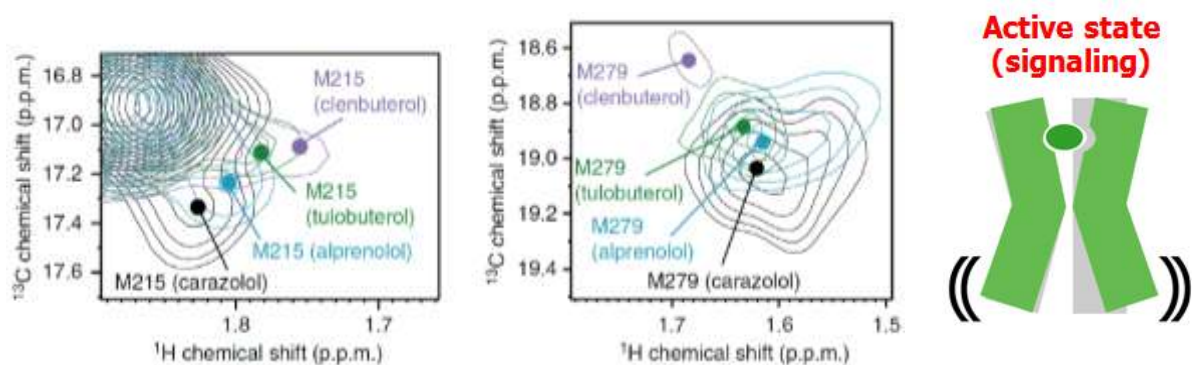


Fig. 1-12 [ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ - $^2\text{H}_3$ -, methyl- $^{13}\text{C}$ -Met]  $\beta_2\text{AR}/4\text{Met}$  の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  SOFAST-HMQC の重ね合わせ (298 K、Met215 (左) および M279 (右) 由来のシグナルを含む領域を表示) (Kofuku et al., 2012)  
(紫) clenbuterol (partial agonist), (緑) tulobuterol (weak partial agonist), (青) alprenolol (antagonist), (黒) carazolol (inverse agonist)

#### 1.4. $\mu\text{OR}$ の構造に関する知見

2012 年に、Brian K. Kobilka らのグループが、irreversible antagonist である  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA) が結合したマウス由来  $\mu\text{OR}$  の X 線結晶構造を報告した (Fig. 1-13) [12]。他の GPCR の結晶構造と同じように、 $\mu\text{OR}$  の構造は、7 本の膜貫通ヘリックス (TM1~7) とこれらヘリックスを連結する細胞外および細胞内の 6 本のループ (ECL1~3, ICL1~3) とで構成されていた。TM3 と ECL2 は、C140<sup>3.25</sup> と C217 間のジスルフィド結合により繋がっていた。また、細胞内側の TM3 および TM5、TM6 の相対配置は、ロドプシンに非常によく似ていたが、 $\beta_2\text{AR}$  と同様に、TM3 の DRY 配列と TM6 の細胞内側との間で、塩橋は形成されていなかった。

リガンドである  $\beta$ -FNA は、受容体の TM3, TM5, TM6, TM7 と相互作用し、 $\beta_2\text{AR}$  や他のモノアミン受容体のリガンド結合部位と同様の位置を占有していた。但し、 $\mu\text{OR}$  と同様にペプチドをリガンドとするケモカイン受容体 CXCR4 のリガンド



と比較して、より細胞内側にリガンドが結合していた。 $\mu$ OR のリガンド結合ポケットは、他の GPCR、例えば、ムスカリン M2, M3 受容体では、リガンドは受容体の Tyr 残基により、溶媒から遮蔽されているが、それとは異なり、溶媒に露出していた。このことは、 $K_d$  値が同じ他の GPCR リガンドと比べて、オピオイドリガンドでは、受容体からの解離が速いという知見と一致する。

また、結晶構造中では、4 つのプロトマー同士が平行に配向し、TM1 および TM2、Helix8 で形成された界面もしくは TM5 および TM6 で形成された界面で会合して、ホモテトラマーを形成していた。それぞれの相互作用界面の大きさは、TM1 および TM2、Helix8 で形成された界面では  $615 \text{ \AA}^2$ 、TM5 および TM6 で形成された界面では  $1,492 \text{ \AA}^2$  であった。TM5 および TM6 で形成された相互作用界面は、これら領域に位置するアミノ酸 28 残基の相互作用で構成されていた。 $\mu$ OR の不活性化状態の安定化に寄与している Thr279<sup>6,34</sup> のメチル基は、他方のプロトマーの Ile256<sup>5,62</sup> と相互作用していたことから、 $\mu$ OR のダイマー化が  $\mu$ OR の活性制御に寄与していることが示唆された。

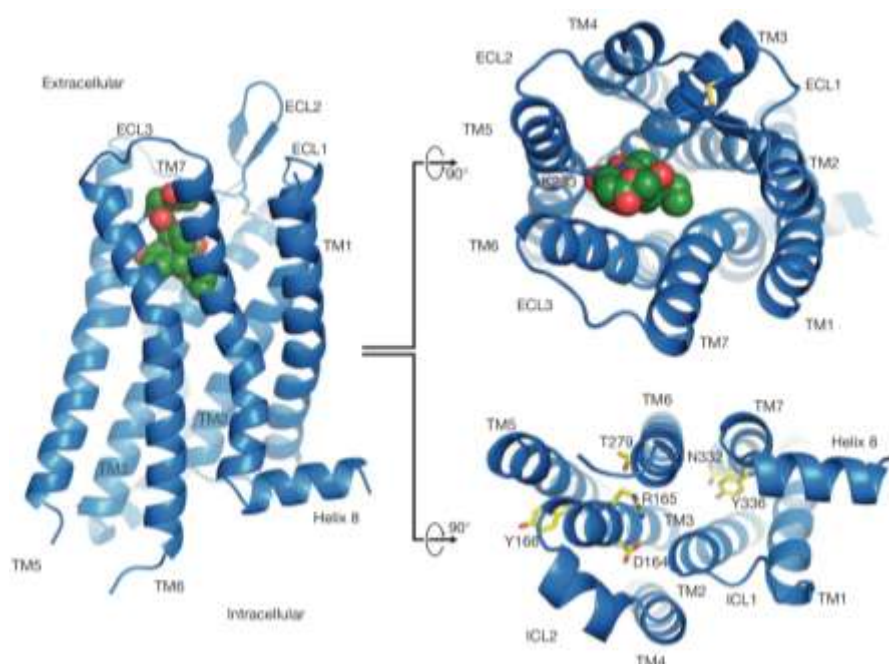


Fig. 1-13  $\beta$ -FNA が結合した  $\mu$ OR の結晶構造 (PDB code : 4DKL) (Manglik et al., 2012)

## 1.5. 目的

以上のように、GPCR の signaling bias 機構に関して、NMR 法や X 線結晶構造解析法など様々な構造生物学的手法により解析がなされ、G タンパク質との相互作用様式については多くの知見が得られているが、GRK やアレスチンとの相互作用様式に関する知見は乏しい。そのため、以下に挙げるように、未解明な点も多い。まず、biased agonist 結合状態の GPCR と balanced agonist 結合状態の GPCR とで、動的構造平衡がどのように異なっているのかについては不明である。また、アレスチンシグナルの活性化には、GPCR のどの部位のどのような構造変化が重要なのかについても不明である。

そこで、本研究では、 $\mu$ OR が細胞内シグナルを選択的に活性化する機構を解明するため、溶液 NMR 法により、antagonist (naloxone), partial agonist (morphine), full agonist (DAMGO), および G protein biased agonist (TRV130) など、efficacy の異なるリガンド存在下で、 $\mu$ OR の膜貫通領域および細胞内領域の動的構造を明らかにすることを目的とした。

本研究により、balanced agonist および G protein biased agonist 結合状態の  $\mu$ OR の動的構造の違いを NMR 法で検出することが可能となれば、G タンパク質のみを選択的に活性化する、すなわち呼吸抑制や便秘などの副作用が生じにくいことが期待される低分子化合物をスクリーニングすることが可能となる。したがって、副作用が生じにくい疼痛制御薬の開発が、加速されることが期待される。

## 第 2 章 材料と方法

### 2.1. 試薬・バッファー・培地組成

安定同位体標識化合物は Cambridge Isotope Laboratories および ISOTEC より購入した。その他の試薬は、ナカライテスク、和光純薬工業より購入した。これら 2 社以外から購入した試薬については、適宜製造元を記載した。また、各種発現系の構築に使用したオリゴ DNA は、全て Invitrogen に合成を委託した。

#### 2.1.1. バッファー

##### MetB lysis buffer

33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### MetB purification buffer

20 mM sodium phosphate, pH 8.0, 200 mM NaCl, 100 mM KCl

##### MetB D<sub>2</sub>O buffer

33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 99.8 % D<sub>2</sub>O

##### 10× MetB reaction buffer

330 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 170 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 2 mM pyridoxal phosphate, 99.8 % D<sub>2</sub>O

TEV protease buffer

50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 % glycerol

TEV protease SEC buffer

25 mM sodium phosphate, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 % glycerol

MSP1 buffer

20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, protease inhibitor cocktail

MSP1 dialysis buffer

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

G $\alpha$  lysis buffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 100 mM KCl, 20  $\mu$ M GDP, 1 mM DTT, 0.5 mg/mL

PMSF

G $\alpha$  dialysis buffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 100 mM KCl, 20  $\mu$ M GDP, 1 mM DTT

G $\beta\gamma$  lysis buffer

20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail

G $\beta\gamma$  dialysis buffer

20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 200 mM NaCl, 100 mM KCl, 20  $\mu$ M GDP, 1 mM DTT



#### Gαβγ SEC buffer

20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 μM GDP

#### GRK lysis buffer

20 mM HEPES-NaOH, pH 7.2, 250 mM NaCl, 0.02 % Triton-X 100, protease inhibitor cocktail

#### Lysis buffer

50 mM Tris-HCl, pH7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mg/mL iodoacetamide, 100 μM TCEP, 10 μM naloxone (sigma), 28 μM E64, 20 μM Leupeptin, 1mM AEBSF, 0.3 μM aprotinin, 15 μM pepstatinA

#### Membrane buffer

50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 500 mM NaCl, 30 % glycerol, 2 mg/mL iodoacetamide, 100 μM TCEP, 200 μM naloxone (sigma), 28 μM E64, 20 μM Leupeptin, 200 μM AEBSF

#### 2×solubilization buffer

50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 500 mM NaCl, 2 % DDM, 0.4 % CHS

#### Wash buffer

50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 0.1 % DDM, 0.02 % CHS, 50 μM naloxone, 20 mM imidazole

#### Elution buffer I

25 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 0.1 % DDM, 0.02 % CHS, 50  $\mu$ M naloxone, 250 mM imidazole

#### Equilibrium buffer

25 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 0.1 % DDM, 0.02 % CHS, 50  $\mu$ M naloxone, 2 mM  $\text{CaCl}_2$

#### DDM buffer

25 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl, 10 % glycerol, 0.2 % DDM, 0.04 % CHS, 50  $\mu$ M naloxone, 2 mM  $\text{CaCl}_2$

#### MNG buffer

25 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl, 10 % glycerol, 0.2 % LMNG (Carbosynth), 0.02 % CHS, 50  $\mu$ M naloxone, 2 mM  $\text{CaCl}_2$

#### Elution buffer II

20 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl, 0.01 % LMNG, 0.001 % CHS, 10  $\mu$ M naloxone, 0.2 mg/mL DYKDDDDK peptide, 5 mM EDTA

#### SEC buffer

20 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 100 mM NaCl, 0.01 % LMNG, 0.001 % CHS, 10  $\mu$ M naloxone

NMR buffer

20 mM sodium phosphate, pH 7.2, 99.8 % D<sub>2</sub>O

rHDL buffer

20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl

Ligand binding assay buffer

20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl

GDP-GTP exchange assay buffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μM GDP

Phosphorylation assay buffer

20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP

Towbin buffer

25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20 % methanol

TBS buffer

25 mM Tris-HCl, pH 7.7, 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl

blocking buffer

3 % gelatine, TBS buffer

### TTBS buffer

0.05 % Tween-20, TBS buffer

### Antibody buffer

1 % gelatine, TTBS buffer

## 2.1.2. 培地組成

特に記載のない場合、以下の組成の培地を用いた。

### LB 培地

10 g Bacto Tryptone

5 g Bacto Yeast Extract

5 g NaCl

以上を 1L H<sub>2</sub>O にて溶解

### TB 培地

24 g Yeast Extract

12 g Tryptone

9.4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

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

4 ml glycerol

以上を 1 L H<sub>2</sub>O に溶解

#### TNM-FH 培地

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

50 mL Fetal Bovine Serum (Biowest)

5 mL 10% Pluronic F68 (Gibco)

2.5 mL Antibiotics-antimycotics (Gibco)

#### Sf-900II 培地

1 L Sf-900<sup>TM</sup> II SFM (Gibco)

5 mL Antibiotics-antimycotics (Invitrogen)

#### メチオニン欠損培地

1 L ESF921, Insect Cell Culture Medium, Methionine Deficient (ExpressionSystems)

5 mL Antibiotics-antimycotics (Invitrogen)

#### アミノ酸欠損培地

1 L ESF921, Insect Cell Culture Medium, Amino Acid Deficient (ExpressionSystems)

5 mL Antibiotics-antimycotics (Invitrogen)

#### 4×DEQN 添加培地

1 L ESF921, Insect Cell Culture Medium, Amino Acid Deficient (ExpressionSystems)

5 mL Antibiotics-antimycotics (Invitrogen)

12 g L-glutamine

8 g L-glutamic acid monosodium salt monohydrate

6 g L-aspartic acid monosodium salt monohydrate

6 g L-asparagine monohydrate

以上を混合し、完全に溶解した後、Stericup (Millipore) でフィルター濾過した。

### $^2\text{H}$ 標識用培地

250 mL Erlenmeyer フラスコ (Corning) に、以下の培地およびアミノ酸を添加した。

アミノ酸欠損培地 52 mL

4×DEQN 添加培地 25 mL

50 mg/mL (each) glycine,  $^{\text{L}}$ -serine,  $^{\text{L}}(-)$ -proline,  $^{\text{L}}$ -hydroxyproline,  $^{\text{L}}$ -alanine 1 mL

30 mg/mL  $^{\text{L}}$ -histidine 1 mL

50 mg/mL  $^{\text{L}}$ -tryptophan 1 mL

5.2 mg/mL  $^{\text{L}}$ -cystine dihydrochloride 2.5 mL

20 mg/mL [ $^2\text{H}_7$ ]  $^{\text{D,L}}$ -tyrosine (in 160 mM NaOH) 0.5 mL

10 mg/mL [ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ - $^2\text{H}_3$ , methyl- $^{13}\text{C}$ ]  $^{\text{L}}$ -methionine 3 mL

5 mg/mL E64 (ペプチド研究所) 0.1 mL

10 mM naloxone (Sigma) 0.1 mL

## 2.2. アミノ酸の重水素化

### 2.2.1. cystathionine- $\gamma$ -synthase の調製

東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室 幸福裕特任助教が作製した、cystathionine- $\gamma$ -synthase をコードする DNA 配列を含む pET15b ベクターを、大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、2L の LB 培地にて培養した。OD<sub>650</sub> 値が 1.2 となったところで 1 mM となる IPTG を添加し、37 °Cにて 18 時間培養した。4°C、7,000 rpm×15

分の遠心により菌体を回収し、60 mL の MetB lysis buffer にて懸濁した。細胞懸濁液に protease inhibitor cocktail を添加した上で、超音波により菌体を破碎した。4℃、100,000 g×1 時間にて遠心し、沈殿を除去した。上清に対し、10 mL bed volume の His Select Nickel Affinity Gel (Sigma) を添加し、4 °Cにて2 時間攪拌した。カラムにアプライし、素通り画分を回収した後、MetB purification buffer 5 CV、10 mM imidazole を含む MetB purification buffer 5 CV、25 mM imidazole を含む MetB purification buffer 5 CV にてレジンを洗浄した後、300 mM imidazole を含む MetB purification buffer 5CV にて目的タンパク質をレジンより溶出させた。MWCO 100 K の Amicon Ultra-15 (Millipore) にて溶出液を濃縮した後、MetB D<sub>2</sub>O buffer により濃縮液を希釈し再度濃縮する操作を繰り返し、元のバッファー成分を最終的に 1,000 倍希釈した。最終的に、MetB D<sub>2</sub>O buffer を加え全量を 20 mL とし、遮光して4℃にて保存した。

### 2.2.2. [methyl-<sup>13</sup>C] L-methionine の[α,β,β,-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>] 化反応と反応進行の評価

L-methionine (methyl-<sup>13</sup>C, 99%) 1200 mg に 30 mL の D<sub>2</sub>O を加え、50 °C の湯浴にて加熱し溶解した。10×MetB reaction buffer 4 mL および、1.5 mL の MetB 溶液 (2.2.1. 節) を加え、D<sub>2</sub>O にて 40 mL までメスアップした。この溶液を遮光し、37 °C にて 12 時間インキュベートした。反応前後の試料をサンプリングし、MetB D<sub>2</sub>O buffer にて 80 倍希釈し、直径 5 mm の NMR 試料管に加えた。Avance 400 分光器 (Bruker Biospin) およびTXI プローブ (Bruker Biospin) を用い、測定温度 298 K にて <sup>1</sup>H 1D スペクトルを取得し、重水素化が進行しているかを確認した。MWCO 10K の Amicon Ultra-4 にて限外ろ過した後、凍結乾燥し、得られた粉末を、-20 °Cにて保存した。細胞に添加する直前に、H<sub>2</sub>O にて 10 mg/mL となるように溶解した。

### 2.2.3. $[^2\text{H}_7]$ D,L-tyrosine の調製

L-tyrosine の交換性プロトン (OH, NH) の混入や L-tyrosine による DCl の中和を軽減するため、 $\text{D}_2\text{O}$  と少量の濃塩酸 ( $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$ ) を加えて加熱、溶解後、凍結乾燥を行うことで、交換性プロトンを重水素に置換した L-tyrosine hydrochloride を調製した。調製した L-tyrosine hydrochloride 1 g を DCl 2.5 mL に耐圧チューブ (ACE GLASS 社) 中で溶解し、 $180\text{ }^\circ\text{C}$  の油浴中で 24~48 時間攪拌した。反応後の溶液を濃アンモニア水により中和し、 $[\alpha, \delta, \epsilon\text{-}^2\text{H}_5]$  D,L-tyrosine を析出させた。同様の反応を 2 回行った。続いて、析出させた  $[\alpha, \delta, \epsilon\text{-}^2\text{H}_5]$  D,L-tyrosine と  $\text{D}_2\text{O}$  20 mL、Pd/C (5 wt%) 触媒 (Sigma) 200 mg、Pt/C (5 wt%) 触媒 (Sigma) 200 mg を混合し、 $\text{H}_2$  雰囲気下、 $180\text{ }^\circ\text{C}$  の油浴中で 48~60 時間攪拌した。反応後、反応溶液に 3 M NaOH を 3 mL 添加して  $[^2\text{H}_7]$  D,L-tyrosine を溶解し、Steriflip (Millipore) で触媒を除去した。触媒除去後の溶液を AG1 陰イオン交換担体 (Bio-Rad) 5.0 g に吸着させ、10 mM formic acid を含む溶液にてレジンから溶出させた。精製後の溶液をエバポレーターで乾固し、DCl で溶解して  $[^2\text{H}_7]$  D,L-tyrosine hydrochloride にした。濃アンモニア水により中和し、 $[^2\text{H}_7]$  D,L-tyrosine を析出させ、 $\text{H}_2\text{O}$  で洗浄した後、凍結乾燥により  $\text{H}_2\text{O}$  をとばした。得られた結晶を、細胞に添加する直前に、160 mM NaOH にて 20 mg/mL となるように溶解した。

各反応の進行度は、BBO プローブを装着した 400 MHz の分光計にて反応液の  $^1\text{H}$ -1D スペクトルおよび  $^{13}\text{C}$ -1D スペクトルを測定し、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  の J-カップリングおよび  $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  の J-カップリングから見積もった。



## 2.3. $\mu$ OR の発現系の構築

### 2.3.1. $\mu$ OR の発現系

本研究では、ヒト由来  $\mu$ OR の C 末端 38 残基 (残基番号 363-400) を欠失し、熱安定性を向上させるため F158<sup>3,41</sup> を Trp に置換した発現系を解析に用いた。また、N 末端に HA シグナル配列および FLAG タグ、53 残基目と 54 残基目の間に TEV protease 認識配列を、C 末端に 8×His タグを付加したものとなっている (Fig. 2-1)。但し、2.9.2. 節のリン酸化実験を行う際には、C 末端を欠失していない全長の  $\mu$ OR の発現系を用いた。

overlap extension PCR 法 [13] により、HA シグナル配列および FLAG タグ、TEV protease 認識配列、ヒト由来  $\mu$ OR、8×His タグをコードする DNA 配列を増幅した。得られた DNA 配列を、pFastBac1 ベクター (Invitrogen) に *EcoRI* サイトと *XhoI* サイトを用いてライゲーションし、発現コンストラクトを得た。得られた発現コンストラクトについて、BigDye Terminator Kit Ver. 3.3 を用いて ABI Prism 310 Genetic Analyzer (いずれも Applied Biosystems) により全発現領域の DNA 配列を確認した。

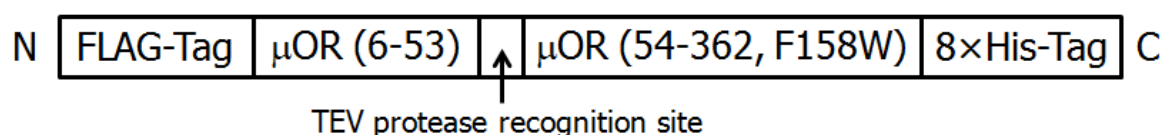


Fig. 2-1 本研究で用いた、ヒト由来  $\mu$ OR のコンストラクト

### 2.3.2. $\mu$ OR の各種変異体の発現系の構築

$\mu$ OR の各種変異体は、QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) によって作製した。変異導入の確認は、BigDye Terminator Kit Ver. 3.3 を用いて ABI Prism 310 Genetic Analyzer を用いた DNA シーケンシングによって行った。

## 2.4. $\mu$ OR の発現

### 2.4.1. 昆虫細胞

昆虫細胞は、TNM-FH 培地を用いて 27 °C にて培養された Sf9 細胞 (Invitrogen)、ならびに SF-900II 培地を用いて 27 °C にて培養された *expresSF+* 細胞 (以下、Sf+ 細胞と表記、Protein Science) を用いた。

### 2.4.2. $\mu$ OR 発現用のリコンビナントバキュロウイルスの調製

$\mu$ OR のリコンビナントバキュロウイルス作製を、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いて、以下のように行った。

はじめに、 $\mu$ OR の遺伝子配列を含むバクミド DNA の調製を行った。調製した  $\mu$ OR の昆虫細胞発現用プラスミドをヒートショック法により大腸菌 DH10Bac<sup>TM</sup> に形質転換した。形質転換後のコロニーから LB 培地 5 mL での培養を 37 °C にて 18 時間行った。培養後の菌体は 3000 rpm で 10 分間遠心することにより菌体をペレットとし、得られたペレットに 300  $\mu$ L の Resuspension Buffer (S.N.A.P.<sup>TM</sup> MidiPrep Kit, Invitrogen) を加え懸濁した。混合液に 300  $\mu$ L Lysis Buffer (S.N.A.P.<sup>TM</sup> MidiPrep Kit, Invitrogen) を加え転倒混和し、室温にて 5 分間静置した。その後、300  $\mu$ L Precipitation Salt (S.N.A.P.<sup>TM</sup> MidiPrep Kit, Invitrogen) を加え、氷上で 10 分間静置した。14000 rpm で 10 分間遠心した上清をさらに 14000 rpm で 5 分間遠心し、沈殿を除去した。上清に 750  $\mu$ L isopropanol を加え転倒混和し、氷上にて 10 分静置した。生成した沈殿を 14000 rpm、10 分間の遠心により回収した。沈殿は 500  $\mu$ L 70 % ethanol で洗浄した。風乾により ethanol を除去した後、40  $\mu$ L 滅菌水に懸濁した。

続いて、 $\mu$ OR の遺伝子配列をコードしたバクミド DNA を用いて、リコンビナントバキュロウイルス作製のための co-transfection を行った。以降の操作には、Sf9 細胞を TNM-FH 培地を用いて 27 °C にて培養したものを用いた。6 well プレー

トに  $4.5 \times 10^5$  cells/mL の細胞を 2 mL ずつ分注し、接着させた後に 2 mL グレース昆虫細胞培養培地 (サプリメント不含) (Invitrogen) にて洗浄した。5  $\mu$ L の調製したバクミド DNA 液、6  $\mu$ L Cellfectin reagent (Invitrogen) にそれぞれ 100  $\mu$ L グレース昆虫細胞培養培地 (サプリメント不含) を加え、室温にて 30 分間インキュベートした。これらを混合し、800  $\mu$ L グレース昆虫細胞培養培地 (サプリメント不含) を加え、細胞に添加した。27  $^{\circ}$ C にて 4 時間インキュベートした後に、細胞上清を除去し、新たに 2 ml TNM-FH 培地を加え、培養を続けた。co-transfection から 3 日後に培養液を回収し、P-1 ストックとした。そのうち 100  $\mu$ L を  $6.0 \times 10^6$  個の細胞を播いた 75 cm<sup>2</sup> フラスコに加えて 7 日間培養し、P-2 ストックとした。500 mL Sf9 細胞浮遊培養液 ( $2.0 \times 10^6$  cells/mL) に 10 mL の P-2 ストックを加え、27  $^{\circ}$ C 7 日間培養し P-3 ストックとした。ウイルスストックはいずれも 4  $^{\circ}$ C にて遮光保存した。

#### 2.4.3. $\mu$ OR の非標識体の発現

$\mu$ OR の非標識体の発現は、先行報告に従って行った [12]。 $\mu$ OR の大量発現に用いる細胞としては、Sf+ 細胞を用いた。Sf+ 細胞の培養には、250 mL Erlenmeyer フラスコを用い、 $2.0 \times 10^6$  cells/mL の細胞 100 mL に P-3 ウイルスストック 5 mL、5  $\mu$ g/mL となるシステインプロテアーゼ阻害剤 E64 (ペプチド研究所)、10  $\mu$ M となる naloxone (Sigma) を加え 27  $^{\circ}$ C 130 rpm にて 2 日間培養した。培養後の細胞を、800 $\times$ g, 10 分遠心することにより回収した。

#### 2.4.4. $\mu$ OR の[methyl-<sup>13</sup>C Met] 標識体の発現

$\mu$ OR の[methyl-<sup>13</sup>C Met] 標識体の発現は、先行報告に従って行った [11, 12]。細胞密度  $5.0$ - $6.0 \times 10^6$  cells/mL となるように Sf+ 細胞を培養し、200 $\times$ g、10 分間にて遠心し、上清をアスピレーターにて吸引除去して細胞を回収した。細胞をメチオニン

欠損培地にて穏やかに懸濁して、250 mL Erlenmeyer フラスコ中に細胞密度  $2.0 \times 10^6$  cells/mL となるように、細胞懸濁液を 94 mL 調製した。ここに P-3 ストックを 4 mL 加えて感染させた。また、 $5 \mu\text{g/mL}$  となるシステインプロテアーゼ阻害剤 E64 (ペプチド研究所)、 $10 \mu\text{M}$  となる naloxone (Sigma) を加えた。 $27^\circ\text{C}$  130 rpm にて 18 時間培養したのち、 $[\alpha, \beta, \beta\text{-}^2\text{H}_3, \text{methyl-}^{13}\text{C}] \text{L-methionine}$  を終濃度  $200 \text{ mg/L}$  となるように添加して、 $27^\circ\text{C}$  130 rpm にて 30 時間培養した。培養後の細胞を、 $800\times g$ , 10 分遠心することにより回収した。

#### 2.4.5. $\mu\text{OR}$ の $[\text{}^2\text{H-8AA, methyl-}^{13}\text{C Met}]$ 標識体の発現

$\mu\text{OR}$  の $[\text{}^2\text{H-8AA, methyl-}^{13}\text{C Met}]$  標識体の発現は、先行報告に従って行った [12, 14]。細胞密度  $5.0\text{-}6.0 \times 10^6$  cells/mL となるように Sf+ 細胞を培養し、 $200\times g$ , 10 分間にて遠心し、上清をアスピレーターにて吸引除去して細胞を回収した。細胞を  $^2\text{H}$  標識用培地にて穏やかに懸濁して、250 mL Erlenmeyer フラスコ 10 本に、それぞれ細胞密度  $2.0 \times 10^6$  cells/mL となるように、細胞懸濁液を 89.5 mL 調製した。ここに P-3 ストックを 4 mL 加えて感染させた。また、 $5 \mu\text{g/mL}$  となるシステインプロテアーゼ阻害剤 E64 (ペプチド研究所)、 $10 \mu\text{M}$  となる naloxone (Sigma) を加えた。 $27^\circ\text{C}$  130 rpm にて 20 時間培養したのち、 $5 \text{ mg/mL}$   $[\text{}^2\text{H}_8] \text{L-valine}/[\text{}^2\text{H}_8] \text{L-phenylalanine}$   $0.5 \text{ mL}$ ,  $25 \text{ mg/mL}$   $[\text{}^2\text{H}] \text{algalaminoacid}$   $6.0 \text{ mL}$  を、穏やかに攪拌しながら添加した。その後、 $27^\circ\text{C}$  130 rpm にて 28 時間培養した。培養後の細胞を、 $800\times g \times 10$  分遠心することにより回収した。

## 2.5. $\mu$ OR の精製

### 2.5.1. 形質膜画分の調製

$\mu$ OR を発現させた細胞 (1L culture) を氷上で解凍し、100 mL の Lysis buffer にて懸濁した。600 psi、30 分間、nitrogen cavitation (Parr Bomb) 法にて 2 回細胞を破砕した後、800 $\times$ g、10 分にて 2 回遠心し、沈殿を除去した。上清を 100,000 $\times$ g、1 時間にて遠心した。沈殿として得られた膜画分を、ダウンス型ホモジナイザー (WHEATON) を用いて、20 mL の Membrane buffer にて懸濁した。

### 2.5.2. TEV protease の調製

TEV protease (MBP-TEV protease recognition site-His6-TEV protease) 発現用プラスミド pRK793 を導入した *E.coli* BL21 (DE3) CodonPlus-RIL グリセロールストック (Stratagene) を、0.2 % glucose, 50 mg/mL ampicillin, 30 mg/mL chloramphenicol を含む LB 培地 1L にて培養し、OD<sub>650</sub> 値が 0.8 となったところで 1 mM となる IPTG を添加した。30 °C にて 5 時間培養した後、4 °C、7,000 rpm $\times$ 15 分の遠心により菌体を回収し、40 mL の TEV protease buffer にて懸濁した。細胞懸濁液に protease inhibitor cocktail を添加した上で、超音波により菌体を破砕した。破砕液に 5 % polyethyleneimine, pH 8.0 を終濃度 0.2 % となるように添加し、4 °C、142,000 $\times$ g、20 分にて遠心し、沈殿を除去した。上清に対し、10 mL bed volume の His Select Nickel Affinity Gel (Sigma) を添加し、4 °C にて終夜攪拌した。カラムにアプライし、素通り画分を回収した後、TEV protease buffer 10 CV $\times$ 2、20 mM imidazole を含む TEV protease buffer 5 CV $\times$ 2 にてレジンを洗浄した後、200 mM imidazole を含む TEV protease buffer 5CV にて目的タンパク質をレジンより溶出させた。MWCO 10 K の Amicon Ultra-15 (Milipore) にて溶出液を濃縮した後、全量を HiLoad 26/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) にインジェクトし、TEV protease SEC buffer にて SEC 精製を行っ

た。SEC 精製後の溶出体積 160~190 mL の画分を MWCO 10 K の Amicon Ultra-15 にて濃縮し、終濃度 6 mg/mL とした。液体窒素により瞬間凍結し、-20 °C で保存した。

### 2.5.3. $\mu$ OR を発現した膜画分の可溶化および精製

膜画分 20 mL に、50  $\mu$ M となる naloxone (Sigma)、5  $\mu$ g/mL となる E64、Leupeptin、AEBSF、2 mg/mL となる iodoacetamide、100  $\mu$ M となる TCEP を添加し、4 °C にて 1 時間攪拌した。続いて、2 $\times$ Solubilization buffer 20 mL を加え、4 °C にて 3 時間攪拌した後、142,000 $\times$ g, 30 分にて遠心し、沈殿を除去した。上清に対し、20 mM となる buffered imidazole, pH 7.5、700 mM となる NaCl、TALON metal affinity resin (Takara) 1 mL bed volume を添加し、4 °C にて終夜攪拌した。800 $\times$ g, 10 分にて遠心し、上清を素通り画分として回収した。レジンに Wash buffer 5 mL (5 CV) を加え攪拌したのち、エコノパックカラム (Bio-Rad) にアプライし、洗浄画分 1 として回収した。さらに、Wash buffer 5 mL (5 CV) をカラムに 4 回アプライし、洗浄画分 2-5 として回収した。最後に、Elution buffer I 5 mL (5 CV) にて  $\mu$ OR をレジンより溶出させ、溶出画分として回収した。溶出画分に、2 mM となる  $\text{CaCl}_2$  を添加した。ANTI-FLAG M1 agarose affinity gel (Sigma) 800  $\mu$ L bed volume をムロマックカラム L (室町化学工業) に充填し、溶出画分を 5 回程度アプライした。素通り画分を回収したのち、DDM buffer および MNG buffer を 1:1 および 1:4、1:10 で混合したバッファー (それぞれ 10 CV ずつ) をアプライし、洗浄画分として回収した。さらに、SEC buffer 10 CV をアプライし、洗浄画分として回収した。その後、Elution buffer II 800  $\mu$ L (1 CV) をカラムにアプライし、溶出画分として回収した。同じバッファーを 800  $\mu$ L (1 CV) アプライし、回収する操作を 4 回繰り返す、合わせて溶出画分として回収した。ここに、2.5.2 節で調製した 6 mg/mL TEV protease を 10  $\mu$ L 添加し、4 °C にて終夜静置した。この試料を、AKTA FPLC システムに接続した Superdex 200 10/300 GL カラム (GE Healthcare) にインジェクトし、溶出溶媒に SEC buffer を用いてゲルろ過精製を行った。

SDS-PAGE 解析により、目的タンパク質を含む分画を収集した。その後、MWCO 30 K の AmiconUltra-4 (Millipore) を用いて各リガンドを含む NMR buffer に置換し、目的の体積まで濃縮した。

## 2.6. $\mu$ OR の rHDL への再構成

### 2.6.1. MSP1 の調製

当研究室の豊永翔博士が作成した、MSP1 の N 末端に His<sub>7</sub> タグおよび TEV プロテアーゼ認識配列を付加したのち、pET43a に組み込んだ発現コンストラクト pET43a-MSP1 を用いた。BL21 (DE3) に塩化カルシウム法にて形質転換した。これをアンピシリン入り LB プレートにまいたのち 37 °Cにて静置し、シングルコロニーを得た。終濃度 50 mg/L となるようにアンピシリンを添加した LB 培地 20 mL にコロニーを投入し、37 °Cにて約 12 時間前培養した。終濃度 50 mg/L となるようにアンピシリンを添加した TB 培地 1 L に、前培養した菌液を 20 mL 投入し、37 °Cにて振盪培養した。OD<sub>600</sub> = 3.0 となったところで終濃度 1 mM となるように IPTG を培地に添加して発現誘導をかけ、37 °Cにて 3 時間振盪培養した。培養した菌体を 4 °C、9,000 g にて 15 分間遠心して回収し、MSP1 buffer で懸濁した。菌液は液体窒素中で凍結し、使用するまで−80 °Cにて保存した。

上記のように調製した菌液約 30 mL を水上にて解凍した。菌液に対して、間欠超音波による破碎を 3 分間ずつ 5 回行った。懸濁液を 20,000 g にて 30 分間遠心し、その沈殿を MSP1 buffer + 1 % (v/v) Triton X-100 で懸濁した。懸濁液を 100,000 g にて 1 時間遠心した。その上清を、His-select nickel affinity gel 10 mL に添加し、約 2 時間転倒混和した。レジンを、50 CV の MSP1 buffer + 1 % (v/v) Triton X-100、50 CV の MSP1 buffer + 10 mM コール酸ナトリウム、10 CV の MSP1 buffer + 10 mM

imidazole にて洗浄した後、5 CV の MSP1 buffer + 300 mM imidazole にて MSP1 を溶出させた。

調製した MSP1 溶液を、透析により MSP1 dialysis buffer に置換した。ここに、質量比で 1/20 量の TEV プロテアーゼを添加し、4 °C で約 12 時間静置することにより His タグを切断した。溶液を透析により rHDL buffer に置換した。これを、HIS-select nickel affinity gel 5 mL に添加し、約 2 時間転倒混和した。素通り画分を回収したのち、レジンを 3 CV の rHDL buffer、3 CV の rHDL buffer + 5 mM imidazole、3 CV の rHDL buffer + 10 mM imidazole にて洗浄した。12 % SDS-PAGE ゲルを用いた SDS-PAGE 解析により MSP1 が含まれる画分を調べたうえで、その画分を、AmiconUltra MWCO 10K を用いて MSP1 が約 700  $\mu$ M となるまで濃縮した。調製した MSP1 は液体窒素中で凍結し、使用するまで -20 °C にて保存した。

## 2.6.2. $\mu$ OR の rHDL への再構成

~1  $\mu$ M  $\mu$ OR (LMNG ミセル), 100  $\mu$ M MSP1, 6 mM 脂質 (POPC : POPG = 3 : 2), 18 mM コール酸ナトリウム, 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl となるように混合し、全量を 1.0 mL とした。これを遮光して氷上に 1 時間静置した。その後、Bio-Beads SM-2 Adsorbent (Bio-Rad) を 800 mg 溶液に添加し、遮光して 4 °C にて 4 時間転倒混和した (以降、 $\mu$ OR が再構成されている rHDL を  $\mu$ OR-rHDL と称する)。その後、反応液を TALON Metal Affinity Resin 0.2 mL に添加した。4 °C で約 2 時間転倒混和したのち、75 CV の rHDL buffer にて洗浄し、5 CV の rHDL buffer + 300 mM imidazole にて  $\mu$ OR-rHDL を溶出させた。溶出液を AKTA FPLC システムに接続した Superdex 200GL 10/300 (GE Healthcare) に添加し、溶出溶媒に rHDL buffer を用いてゲル濾過精製を行った。



## 2.7. $\mu$ OR-rHDL を用いた [ $^3$ H] diprenorphine 結合実験

rHDL に再構成した  $\mu$ OR に対する各種リガンドとの親和性の算出およびリガンド結合活性を持った受容体量の算出を以下のように行った。

NAP-5 column (GE Healthcare) を 10 mL の rHDL buffer で平衡化した。次に、① rHDL buffer もしくは各種リガンド (naloxone, morphine (第一三共), DAMGO (Sigma), TRV130) を含む rHDL buffer 25  $\mu$ L (0.1 nM–10 mM)、② [ $^3$ H] diprenorphine (54.9 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) を含む rHDL buffer 25  $\mu$ L (0.5–32 nM)、③  $\mu$ OR-rHDL を含む試料 50  $\mu$ L、をエッペンに添加し、氷上で 1 時間インキュベーションした。反応液を先ほどの NAP-5 column にアプライし、rHDL buffer を適量ずつ加えていき、溶出液を分取した。各溶出画分 0.2 mL に対して Optiphase Supermix (PerkinElmer Life Sciences) を 0.4 mL 添加し、vortex した後、混合液 0.2 mL を 96 well プレートにアプライして、MicroBeta<sup>2</sup> でカウントした。解析には、Excel (Microsoft) を用いた。

## 2.8. $\mu$ OR-rHDL を用いた GDP-GTP 交換実験

### 2.8.1. Gai3 の調製

当研究室の間瀬瑤子博士が作成した、Gai3 の N 末端に His<sub>10</sub> タグおよび HRV3C プロテアーゼ認識配列を付加したのち、pET24b に組み込んだ発現コンストラクト pET24b-Gai3 を用いた [15]。Gai3 発現用プラスミドを BL21 (DE3) CodonPlusRP に塩化カルシウム法にて形質転換した。これをカナマイシン入り LB プレートにまいたのち 37 °Cにて静置し、シングルコロニーを得た。終濃度 50 mg/L となるようにカナマイシンを添加した LB 培地 10 mL にコロニーを投入し、37 °Cにて約 12 時間前培養した。終濃度 50 mg/L となるようにカナマイシンを添加した

LB 培地 1 L に、前培養した菌液を 10 mL 投入し、37 °C にて振盪培養した。OD<sub>600</sub> = 1.0 となったところで終濃度 1 mM となるように IPTG を培地に添加して発現誘導をかけ、25 °C にて 8 時間振盪培養した。培養した菌体を 4 °C、9,000 g にて 15 分間遠心して回収し、Gα lysis buffer で懸濁した。

上記のように調製した菌液約 40 mL を氷上にて解凍した。菌液に対して、間欠超音波による破碎を 3 分間ずつ 5 回行った。懸濁液を 100,000 g にて 1 時間遠心した。その上清に HIS-select nickel affinity gel 3 mL に添加して約 2 時間転倒混和した。レジンに、200 mL の Gα lysis buffer、30 mL の Gα lysis buffer + 20 mM imidazole、30 mL の Gα lysis buffer + 30 mM imidazole、10 mL の Gα lysis buffer + 100 mM imidazole を流した。12 % SDS-PAGE ゲルを用いた SDS-PAGE 解析により Gαi3 が含まれる画分を調べたうえで、200 Unit の HRV3C protease (Novagen) を添加し、2 L の Gα dialysis buffer に対して透析した。これを、HIS-select nickel affinity gel 1.5 mL に添加し、素通り画分を回収した。その画分を、AmiconUltra MWCO 10K を用いて Gαi3 が約 70 μM となるまで濃縮した。調製した Gαi3 は液体窒素中で凍結し、使用するまで -20 °C にて保存した。

### 2.8.2. Gβ1γ2 の調製

ウシ由来 G タンパク質β<sub>1</sub> サブユニット (以下 Gβ1)、および、C68S 変異導入により脂質修飾部位を欠失したヒト由来 G タンパク質γ<sub>2</sub> サブユニット (以下 Gγ2) をともに発現する昆虫細胞発現系を、当研究室の横川真梨子博士が作成した [16]。Gβγ を発現した昆虫細胞を N<sub>2</sub> cavitation (600 psi、1 時間) により破碎したのち、破碎液を 4 °C、100,000 g にて 1 時間遠心した。上清を HIS-select nickel affinity gel 2 mL に添加して約 2 時間転倒混和した。レジンを、80 mL の Gβγ lysis buffer、20 mL の Gβγ lysis buffer + 10 mM imidazole にて洗浄した後、20 mL の Gβγ lysis buffer + 300 mM imidazole にて Gβ1γ2 を溶出させた。Gβγ が含まれる画分を集め、AmiconUltra

MWCO 3K にて濃縮した。

### 2.8.3. Gαi3β1γ2 の調製

2.8.1 節および 2.8.2 節で調製した Gαi3 および Gβ1γ2 を Gαi3 が過剰となるように混合して 4 °C にて 2 時間静置したのち、混合液を AKTA FPLC システムに接続した Superdex 200 GL 10/300 (GE Healthcare) に添加し、溶出溶媒に Gαβγ SEC buffer を用いてゲル濾過精製を行った。フラクションを SDS-PAGE にて解析し、Gαβγ が含まれる画分を集めて、HIS-select nickel affinity gel 1 mL に添加して約 2 時間転倒混和した。レジンを、12 mL の Gαβγ SEC buffer にて洗浄した後、20 mL の Gαβγ SEC buffer + 300 mM imidazole にて Gαi3β1γ2 を溶出させた。1 L の Gαβγ SEC buffer に対して透析した。Gαβγ は使用するまで -80 °C にて保存した。

### 2.8.4. GDP-GTP 交換実験

~20 nM μOR-rHDL (2.6.2 節), ~50 nM Gαβγ (2.8.3 節), 1 mM リガンド (naloxone, morphine (第一三共), DAMGO (Sigma), TRV130), 10 nM [<sup>35</sup>S] GTPγS (Perkin Elmer) となるようにエッペンに添加し、GDP-GTP exchange assay buffer 中にて 25 °C、10 分間インキュベートした。反応液を全量 (100 μL) NAP-5 にアプライした。続けて 400 μL, 600 μL の GDP-GTP exchange assay buffer をアプライして、後者の溶出液 200 μL と 400 μL の Optiphase Supermix を混合し、全量を MicroBeta 2 を用いてカウントした。

## 2.9. $\mu$ OR-rHDL を用いたリン酸化実験

### 2.9.1. GRK2 の調製

GRK2 の調製には、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室 白石勇太郎修士が作製した、GRK2 の C 末端に His<sub>6</sub> tag を付加したコンストラクトを用いた。2.0 × 10<sup>6</sup> cells/mL の Sf+ 細胞 100 mL に GRK2 リコンビナントウイルスを 5 mL を加え、27 °C、130 rpm にて 2 日間培養した。培養後の細胞を、800×g, 10 分遠心することで回収した。

回収した細胞に、1 L 培養あたり 150 mL の GRK lysis buffer を混ぜ、ソニケーションにより細胞を破碎した。150,000×g, 1 時間遠心し、上清を回収した。1 L 培養あたり 10 mL bed volume の TALON Metal Affinity Resin (Clontech) と混合し、4 °C、2 時間振盪した。エコノパックカラムにアプライし、① GRK lysis buffer (10 CV) × 2 回、② 10 mM imidazole を含む GRK lysis buffer (10 CV) × 2 回、にてレジンの洗浄を行った。200 mM imidazole を含む GRK lysis buffer 2 CV で溶出させた。溶出液を、AKTA に接続した HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade カラム (GE Healthcare) にて精製した。精製液を MWCO 30 K の Amicon Ultra-4 を用いて濃縮した。

### 2.9.2. GRK2 による $\mu$ OR-rHDL のリン酸化

~200 nM  $\mu$ OR-rHDL (2.6.2 節), ~20 nM GRK2 (2.9.1 節), 100  $\mu$ M リガンド (naloxone, morphine (第一三共), DAMGO (Sigma), TRV130) となるようにエッペンに添加し、Phosphorylation assay buffer 中にて 30 °C、10 分間インキュベートした。

反応液 10  $\mu$ L に対し、等量の SDS sample buffer を加え、SDS サンプルとした。SDS-PAGE ゲルに 10  $\mu$ L の SDS サンプルをアプライし、40 mM の定電流で 40 分電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを Towbin buffer を用いたセミドライ法により PVDF メンブレン (BioRad) に転写した。転写条件は 200 mA の定電流にて 30 分と

した。転写後、blocking buffer 中で 1 時間インキュベートし、メンブレンをブロッキングし、TTBS buffer で洗浄した。一次抗体には、Phospho- $\mu$ -Opioid Receptor (Ser375) Antibody (Cell signaling) を Antibody buffer にて 1000 倍希釈したものを用いた。メンブレンを、室温にて一晩インキュベートし、抗体を結合させた。TTBS buffer で洗浄した。二次抗体には、ECL<sup>TM</sup> Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey) (GE Healthcare) を、Antibody buffer にて 5000 倍希釈したものを用いた。二次抗体を 2 時間結合させ、TTBS、TBS で洗浄した。ECL<sup>TM</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて蛍光染色し、Ez-Capture MG (ATTO) により露光、解析した。

## 2.10. NMR 試料の調製

精製後の安定同位体標識  $\mu$ OR を、Amicon Ultra-4 (MWCO30K) を用いて濃縮および NMR buffer に置換した。試料の液量は $\sim$ 230  $\mu$ L とし、 $\mu$ OR の濃度を 5~10  $\mu$ M とした。各リガンドの濃度は、100  $\mu$ M とした。但し、naloxone については各リガンド結合状態の NMR 測定を行った後、その試料にリガンドを添加するため、700  $\mu$ M とした。LMNG の濃度は、0.08 % (w/v) とした。直径 5 mm の磁化率マッチング対称形マイクロ試験管 (シゲミ) に充填し、NMR 試料に供した。

## 2.11. NMR 測定および解析

$\mu$ OR の NMR スペクトルは、クライオプローブを装着した、Bruker Avance 800 (Bruker) の分光計にて取得した。測定した NMR データの解析およびプロセスには

Topspin ver.3.1 (Bruker) を用いた。

測定は、298 K にて行った。また、全てのスペクトルは、DSS の化学シフトを外部標準として校正した。

### 2.11.1. $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ SOFAST HMQC 法

[methyl- $^{13}\text{C}$  Met] 標識体の測定は、Avance800 を用いて、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  SOFAST-HMQC 法にて取得した [17]。 $^1\text{H}$  の磁化は、4 msec の PC9  $120^\circ$  パルスにて励起し、2 msec の Q3  $180^\circ$  パルスにて反転させた [11]。繰り返しのための待ち時間は 1 秒とした。

$^1\text{H}$  のデータポイント数は 1024、 $^{13}\text{C}$  のデータポイント数は 256 とした。 $^1\text{H}$  のオフセット周波数は 4.7 ppm、スペクトル幅は 16 ppm とした。 $^{13}\text{C}$  のオフセット周波数は 16 ppm、スペクトル幅は 32 ppm とした。各 FID の積算回数は 256 とした。

### 2.11.2. $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC 法

[ $^2\text{H}$ -8AA, methyl- $^{13}\text{C}$  Met] 標識体の測定は、Avance800 を用いて、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 法にて取得した。グラジエントを用いたコヒーレンス選択と、water flip back による溶媒消去を行った。繰り返しのための待ち時間は 1 秒とした。

$^1\text{H}$  のデータポイント数は 1024、 $^{13}\text{C}$  のデータポイント数は 256 または 296 とした。 $^1\text{H}$  のオフセット周波数は 4.7 ppm、スペクトル幅は 16 ppm とした。 $^{13}\text{C}$  のオフセット周波数は 16 ppm、スペクトル幅は 32 ppm または 37 ppm とした。各 FID の積算回数は 256 とした。

## 第3章 結果

### 3.1. $\mu$ OR の調製

#### 3.1.1. ミセル中での $\mu$ OR の精製

$\mu$ OR の調製は、2.4. 節および 2.5. 節に記した方法に従って、DDM を用いて可溶化した後、各種アフィニティー精製、およびサイズ排除クロマトグラフィーにより行った。SDS-PAGE 解析の結果、90 % 以上の純度にて  $\mu$ OR を精製できたと判断した (Fig. 3-1A)。ゲルろ過解析 (aSEC) の結果、試料中に含まれる  $\mu$ OR のほぼすべてがモノマーとして存在していると判断した (Fig. 3-1B)。 $[^3\text{H}]$  diprenorphine 結合実験の結果から、 $\mu$ OR の収量を  $\sim 100 \mu\text{g/L}$  culture と見積もった (data not shown)。また、同様の  $[^3\text{H}]$  diprenorphine 結合実験から、morphine 存在下において、298 K, 24 時間の条件で NMR 測定を行ってもほぼすべての  $\mu$ OR がリガンド結合活性を保持していることがわかった (Fig. 3-2)。

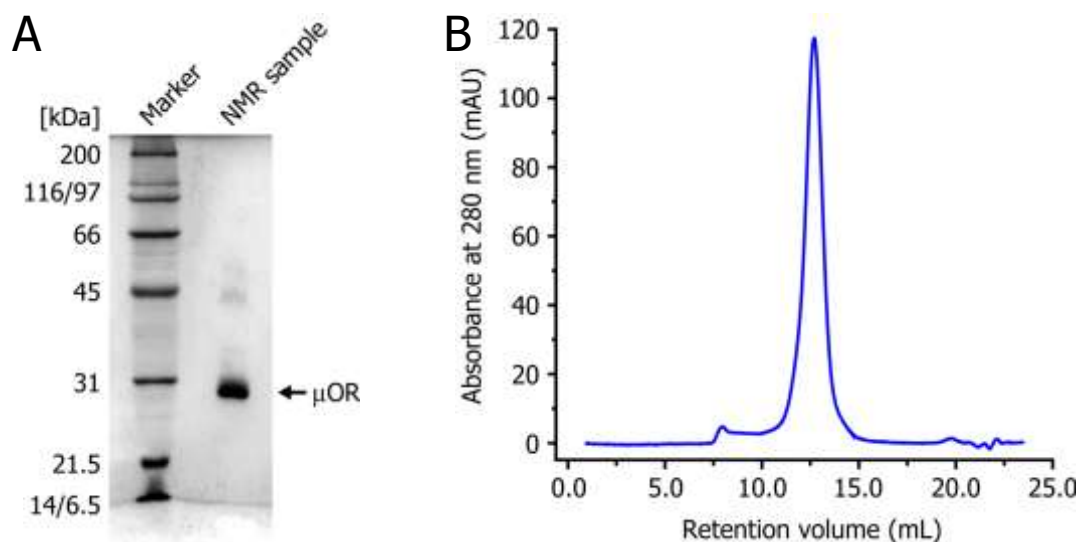


Fig. 3-1 NMR 解析に用いた  $\mu$ OR の SDS-PAGE 解析と aSEC 解析  
(A) NMR 解析に用いた試料の SDS-PAGE 解析。12 % SDS-PAGE ゲルを用い、CBB (Coomassie Brilliant Blue) により染色した。  
(B) NMR 解析に用いた試料のゲルろ過解析 (aSEC)。NMR 試料中に含まれる  $\mu$ OR のほぼすべてがモノマーとして存在している。

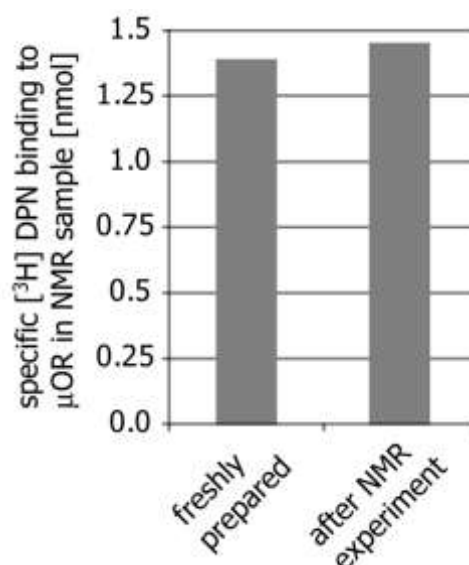


Fig. 3-2 NMR 測定前後における、 $[^3\text{H}]$  DPN 結合活性を保持した  $\mu\text{OR}$  の定量  $\mu\text{OR}$  への  $[^3\text{H}]$  DPN の特異的な結合量を、RI 標識されていない naloxone 存在下と非存在下におけるカウントの差から測定した。

### 3.1.2. $\mu\text{OR}$ の rHDL への再構成

$\mu\text{OR}$  の rHDL への再構成は、2.6. 節に記した方法に従って、MSP1 と  $\mu\text{OR}$ 、リン脂質を混和し、界面活性剤を除去することで行った。TALON 精製後の試料のゲルろ過解析 (aSEC) の結果、ストークス径が 10~11 nm の溶出位置に 280 nm の吸光度のピークが観測された (Fig. 3-3B)。aSEC の各フラクションの SDS-PAGE 解析 (銀染色) の結果、 $\mu\text{OR}$  と MSP1 のバンドが約 2 : 3 の濃さの比で検出された (Fig. 3-3A)。 $\mu\text{OR}$  と MSP1 の分子量はそれぞれ約 36,000 と約 26,000 で、1 粒子の rHDL に MSP1 が 2 分子含まれることから、 $\mu\text{OR}$ -rHDL における  $\mu\text{OR}$  : MSP1 の質量比は約 2 : 3 である。したがって、1 粒子の rHDL に 1 分子の  $\mu\text{OR}$  が再構成されていると判断した。また、TALON 精製によって空 rHDL を除去できていると判断した。 $[^3\text{H}]$  diprenorphine 結合実験の結果から、 $\mu\text{OR}$ -rHDL の収量を ~30  $\mu\text{g/L}$  culture と見積もった (data not shown)。このことから、rHDL への再構成効率 (LMNG/CHS ミセル状態でリガンド結合活性を保持していた  $\mu\text{OR}$  のうち、リガ



ンド結合活性を保持したまま rHDL に再構成された  $\mu$ OR の割合) は約 30 % と判断した。

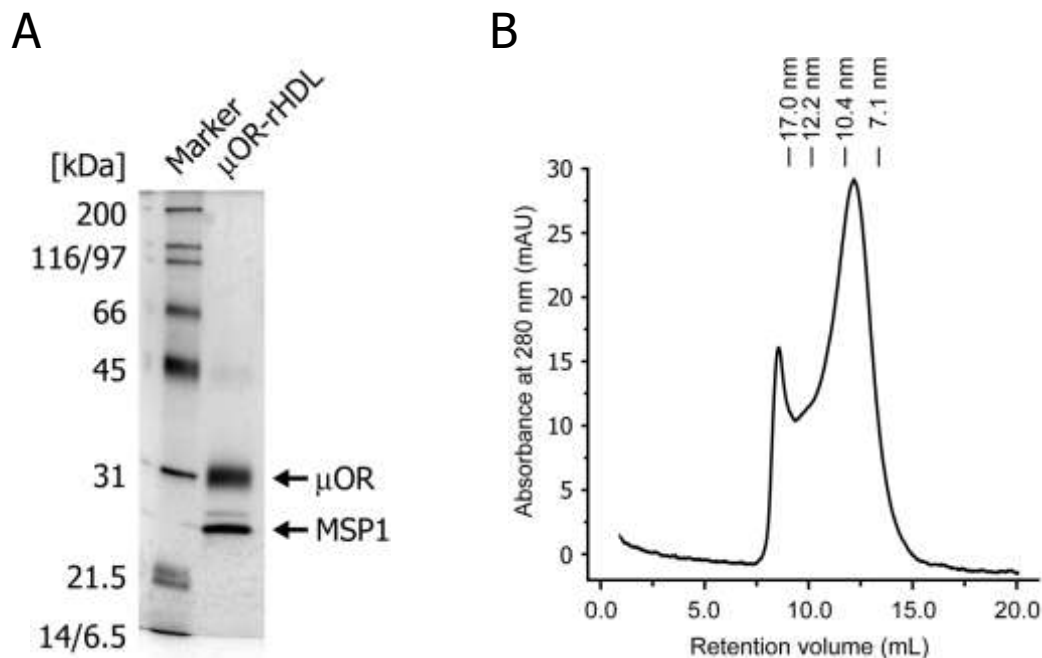


Fig. 3-3  $\mu$ OR-rHDL を含む試料の SDS-PAGE 解析と SEC 解析  
(A) ゲルろ過精製後の試料の SDS-PAGE 解析。12 % SDS-PAGE ゲルを用い、銀染色を行った。  
(B) ゲルろ過精製の際のクロマトグラム。ストークス径が 10~11 nm の溶出位置に 280 nm の吸光度のピークが観測された。

次に、 $G\alpha\beta\gamma$  を rHDL 中に再構成した論文 [18, 19] にもとづき、 $\mu$ OR-rHDL に対し過剰量の三量体 G タンパク質 ( $G\alpha\beta\gamma$ ) を添加し界面活性剤を除去することで、 $\mu$ OR-rHDL に  $G\alpha\beta\gamma$  を再構成した。SDS-PAGE 解析の結果、FLAG 精製後の溶出画分に  $\mu$ OR および MSP1、 $G\alpha_{i3}$ 、 $G\beta_1$  のバンドが検出された (Fig. 3-4)。このことから、 $\mu$ OR-rHDL に  $G\alpha_{i3}$ - $G\beta_1$ -His<sub>6</sub>-Gr<sub>2</sub> が再構成されていると判断した。 $\mu$ OR と  $G\alpha_{i3}$  (もしくは  $G\beta_1$ ) のバンドの濃さの比較から、 $\mu$ OR-rHDL に複数の  $G\alpha\beta\gamma$  が再構成されていることが示唆された。この原因として、 $\mu$ OR-rHDL に  $G\alpha\beta\gamma$  を再構成する際、 $\mu$ OR-rHDL と比較して  $G\alpha\beta\gamma$  を過剰量混合しているためであると考えた。し

かし、後述する3.2.2. 節の結果で、全ての  $\mu\text{OR}$  が  $\text{G}\alpha\beta\gamma$  と共役していたことから、 $\text{rHDL}$  に再構成された  $\text{G}\alpha\beta\gamma$  のうち少なくとも1分子は活性を保持していると考えた。

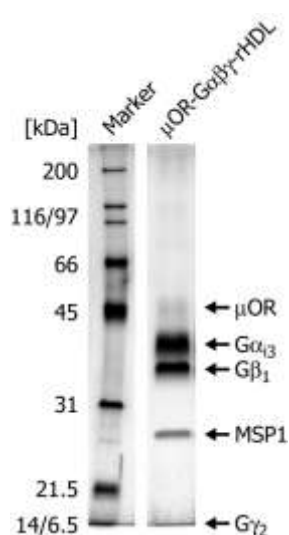


Fig. 3-4  $\mu\text{OR-G}\alpha\beta\gamma\text{-rHDL}$  の調製

最終精製試料の SDS-PAGE 解析。12 % SDS-PAGE ゲルを用い、銀染色を行った。

## 3.2. $\text{rHDL}$ に再構成した $\mu\text{OR}$ のリガンド結合活性の評価

### 3.2.1. [ $^3\text{H}$ ] diprenorphine 結合実験 (saturation binding assay)

各リガンド存在下での NMR 解析を行うにあたり、単離した  $\mu\text{OR}$  が細胞上に発現した  $\mu\text{OR}$  と同程度のリガンド結合活性を保持していることを確認する必要がある。そこで、 $\text{rHDL}$  に再構成した  $\mu\text{OR}$  の [ $^3\text{H}$ ] diprenorphine 結合実験および競合阻害実験を行い、各リガンドの  $\mu\text{OR}$  に対する親和性（解離定数、阻害定数）を算出することとした。

まず  $\mu\text{OR-rHDL}$  に対する [ $^3\text{H}$ ] diprenorphine の解離定数  $K_d$  を saturation

binding assay で算出することとした。その結果、調製した  $\mu\text{OR-rHDL}$  に対し、添加した  $[^3\text{H}]$  diprenorphine の濃度依存的に、 $\mu\text{OR-rHDL}$  に結合した  $[^3\text{H}]$  diprenorphine 量が増大し、その結合が飽和したことから、 $\mu\text{OR-rHDL}$  と  $[^3\text{H}]$  diprenorphine との特異的な結合を検出できたと判断した (Fig. 3-5A)。one site binding model の式を用いた、非線形フィッティングの結果、 $\mu\text{OR-rHDL}$  に対する  $[^3\text{H}]$  diprenorphine の解離定数  $K_d$  を  $12.9 \pm 2.9 \text{ nM}$  と算出した。この値は、修士課程の研究で使用していた全長  $\mu\text{OR}$  に対する  $[^3\text{H}]$  diprenorphine の解離定数  $8.0 \pm 0.8 \text{ nM}$  と概ね一致していた (Fig. 3-5B)。また、これらの値は、rHDL を用いた先行報告の結果と比べて妥当な値であった [19]。以上の結果から、熱安定性変異を導入した  $\mu\text{OR}$  は、野生型と同様のリガンド親和性を保持していると結論した。

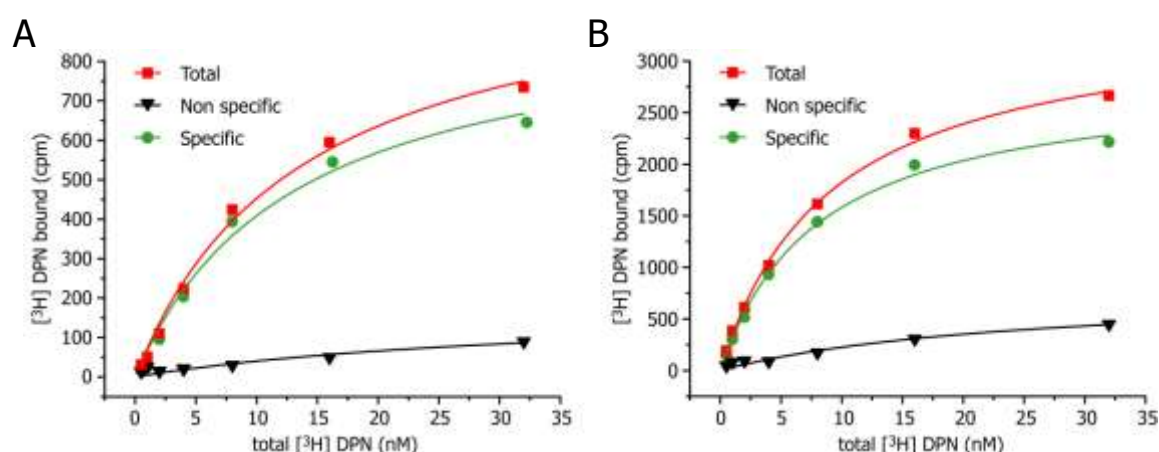


Fig. 3-5  $\mu\text{OR-rHDL}$  を用いた  $[^3\text{H}]$  diprenorphine 結合実験 (saturation binding assay)  
 (A) F158W 熱安定性変異体 (NMR 解析に用いているコンストラクト)  
 (B)  $\mu\text{OR-1D4}$  (修士課程の研究で使用していたコンストラクト)  
 フィッティングは、one site binding model の式 ( $y=B_{\text{max}}*x/(K_d+x)$ ) を用いた。

### 3.2.2. $[^3\text{H}]$ diprenorphine を用いた競合阻害実験

次に、 $\mu\text{OR-rHDL}$  に対する  $^3\text{H}$  標識されていないリガンドの阻害定数  $K_i$  を

[<sup>3</sup>H] diprenorphine と  $\mu$ OR-rHDL に対して、様々な濃度の非標識リガンドを混合して行う competition binding assay により算出することとした。その結果、いずれのリガンドにおいても、<sup>3</sup>H 標識されていないリガンドの濃度依存的にカウントが減少し、アッセイを行ったリガンド濃度域でカウントは十分に収束した (Fig. 3-6)。one site competition binding model の式を用いた、非線形フィッティングの結果、 $\mu$ OR-rHDL に対する naloxone および, morphine, DAMGO, TRV130 の阻害定数  $K_i$  を、それぞれ  $5.66 \pm 0.90$  nM および  $592 \pm 119$  nM,  $1760 \pm 800$  nM,  $473 \pm 115$  nM と算出した (Table. 3-1)。これらの値は、先行報告と比べて妥当な値であった [19, 20]。

また、 $G\alpha\beta\gamma$  を再構成した  $\mu$ OR-rHDL においても、上述と同様の実験を行った結果、morphine の濃度依存的にカウントが減少し、アッセイを行ったリガンド濃度域でカウントは十分に収束した (Fig. 3-6B)。one site competition binding model の式を用いた、非線形フィッティングの結果、 $\mu$ OR- $G\alpha\beta\gamma$ -rHDL に対する morphine の阻害定数  $K_i$  を  $65.7 \pm 12.9$  nM と算出し、G タンパク質を添加することで親和性が上昇することが分かった (Table. 3-6B)。先行報告[19] の値と比較すると、40 倍程度親和性 ( $\sim 1.7$  nM) が弱かった。この原因として、先行報告とは  $\mu$ OR のコンストラクトが異なること (先行報告では、野生型であるのに対し、本研究では、N 末端および C 末端の欠失体および F158W 変異体を用いている)、 $G\alpha_i$  のサブタイプが異なること (先行報告では isoform2 を、本研究では isoform3 を用いている) を考えた。

以上の結果から、単離した  $\mu$ OR が細胞上に発現した  $\mu$ OR と同程度のリガンド結合活性を保持していること、 $\mu$ OR- $G\alpha\beta\gamma$ -rHDL 中のほぼ 100 % の  $\mu$ OR が  $G\alpha\beta\gamma$  と共役していることが明らかとなった。

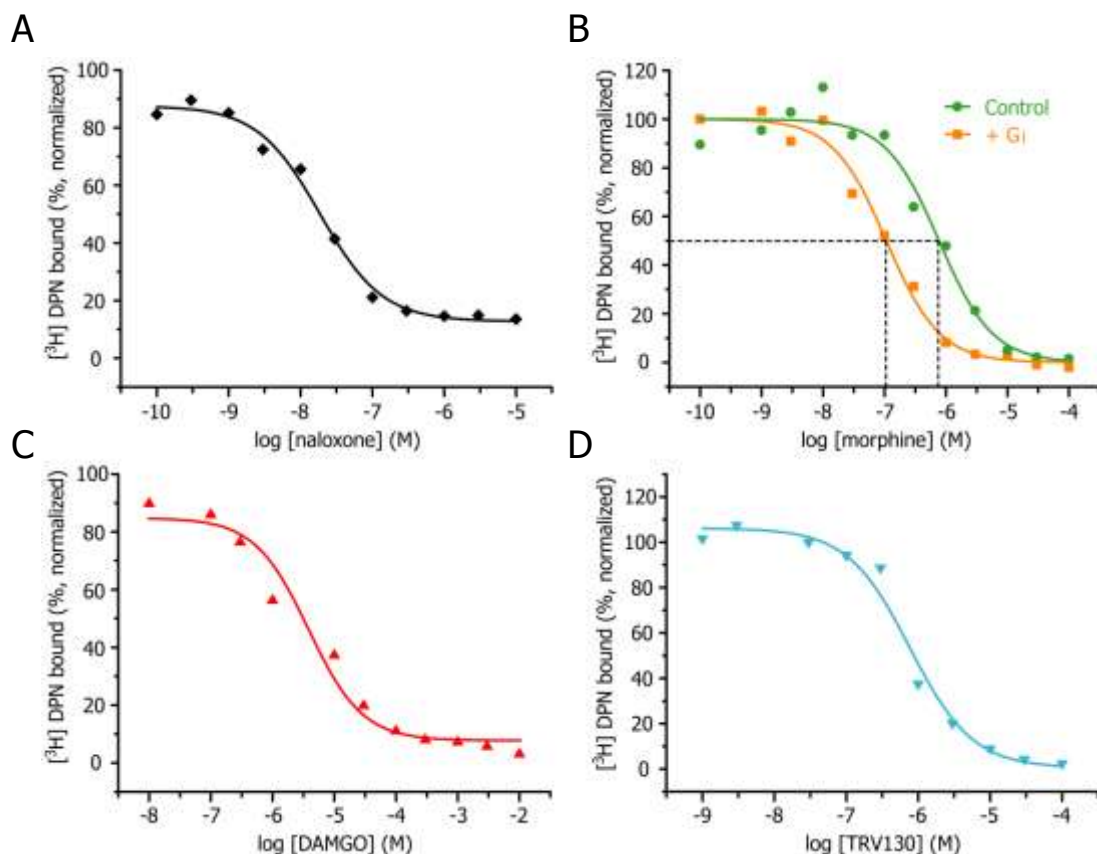


Fig. 3-6  $\mu\text{OR-rHDL}$  を用いた  $[^3\text{H}]$  diprenorphine 結合実験 (competition binding assay) (A) naloxone (antagonist), (B) morphine (partial agonist) : G $\alpha\beta\gamma$  存在下 (緑) ; G $\alpha\beta\gamma$  非存在下 (黄), (C) DAMGO (full agonist), (D) TRV130 (G protein biased agonist) フィッティングは、one site competition binding model の式 ( $y=100/(1+10^{x-IC_{50}})$ ) を用いた。また、 $IC_{50}$  から  $K_i$  を算出するため、Cheng-Prusoff 式 ( $K_i=IC_{50}/(1+[L]/K_d)$ ) を用いた。

Table. 3-1 各リガンドの  $\mu\text{OR-rHDL}$  に対する阻害定数  $K_i$

Ligand	$[^3\text{H}]$ DPN / competition binding $K_i \pm \text{SEM}$ (nM)
naloxone (antagonist)	$5.66 \pm 0.90$
morphine (partial agonist)	$65.7 \pm 12.9$ (High) $592 \pm 119$ (Low)
DAMGO (full agonist)	$1760 \pm 800$
TRV130 (G protein biased agonist)	$473 \pm 115$

### 3.3. rHDL に再構成した $\mu$ OR のシグナル伝達活性の定量的評価

morphine や DAMGO などの balanced agonist または TRV130 などの biased agonist 存在下で NMR 解析を行うにあたり、 $\mu$ OR を単離した系において、各アゴニストの G タンパク質シグナルおよびアレスチンシグナルのシグナル伝達活性を定量的に評価する必要がある。

G タンパク質シグナルのシグナル伝達活性の定量的評価については、 $[^{35}\text{S}]$  GTP $\gamma$ S の G $\alpha$  への結合を指標とした GDP-GTP 交換実験を行うこととした[21]。

また、アゴニストにより活性化された  $\mu$ OR の Ser375 (ヒト由来では Ser377) [22-24] のリン酸化の進行度が、アレスチンシグナルの efficacy と非常によく相関することが知られている (Fig. 3-7) [25, 26]。以上から、各アゴニスト結合状態において、rHDL に再構成した  $\mu$ OR を GRK2 によりリン酸化した後、リン酸化 Ser377 を認識する 1 次抗体を用いたウェスタンブロット解析を行うことで、アレスチンシグナルのシグナル伝達活性を定量的に評価することとした。

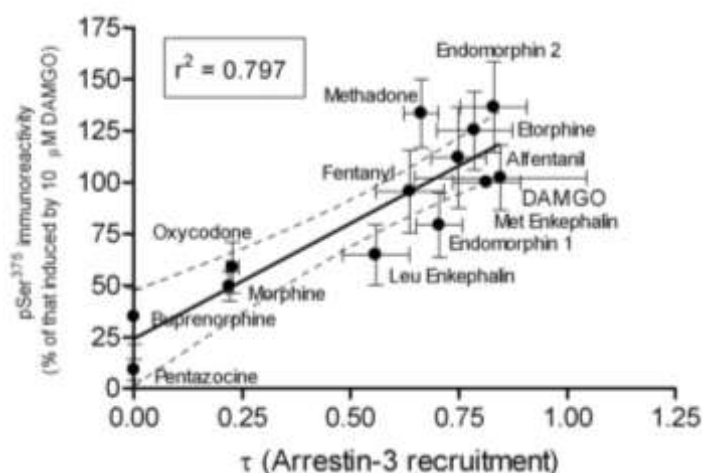


Fig. 3-7 マウス由来  $\mu$ OR の C 末端に位置する Ser375 のリン酸化反応の進行度とアレスチンシグナルの efficacy との相関 (McPherson et al., 2012)

### 3.3.1. [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S を用いた GDP-GTP 交換実験

G タンパク質シグナルの大きさを評価するため、 $\mu\text{OR-rHDL}$  および G タンパク質を含む試料に対し、様々なリガンドを添加し、G タンパク質に結合した [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S の量を測定する実験を行った (Fig. 3-8) [21]。G $\alpha\beta\gamma$  のみを添加した時の G $\alpha\text{i}3$  への [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S の結合量を差し引いた後、DAMGO を添加した時の G $\alpha\text{i}3$  への [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S の結合量を 1 と規格化した時の、各アゴニスト添加時の G $\alpha\text{i}3$  への [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S の結合量の結果を示す (Fig. 3-9, Table. 3-2)。その結果、添加したリガンドの活性の報告値 [25, 26] と概ね対応していた。このことから、 $\mu\text{OR}$  はリガンドの efficacy 依存的に G タンパク質シグナルを誘起することが分かった。

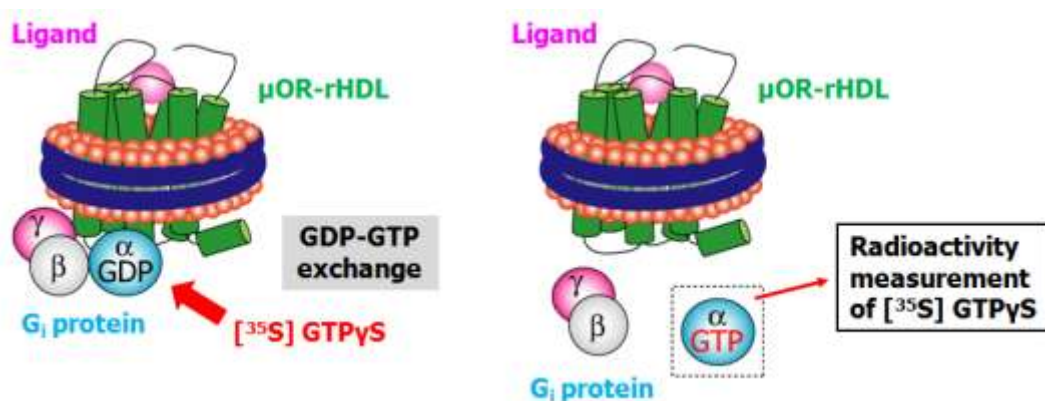


Fig. 3-8 GDP-GTP 交換実験の模式図。 $\mu\text{OR-rHDL}$  に対し、G タンパク質および各種アゴニスト、 [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S を添加し、インキュベーションした後 (左)、G タンパク質に結合した [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S の結合量を測定した (右)。

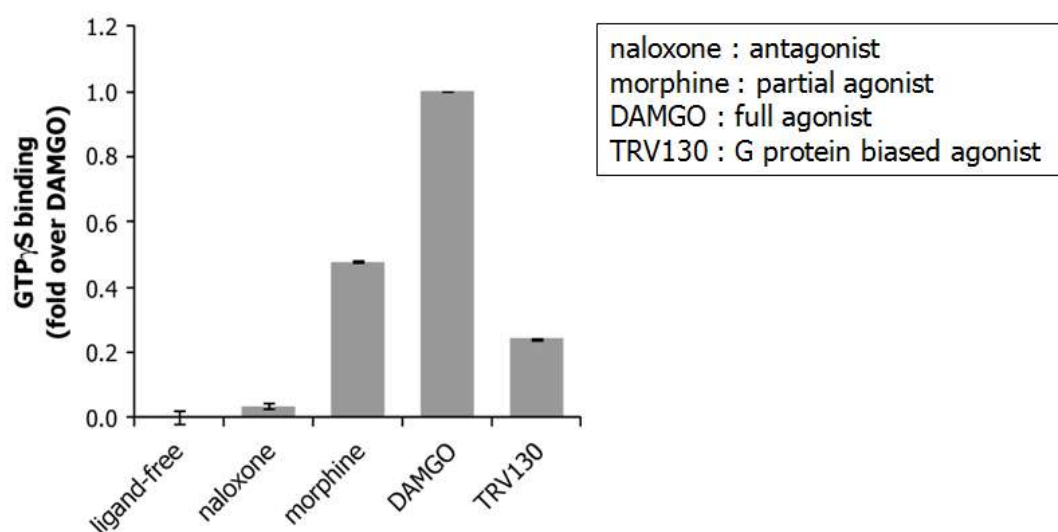


Fig. 3-9  $\mu$ OR に結合するアゴニストが有する G タンパク質シグナルの efficacy  
 $G\alpha\beta\gamma$  のみを添加した時の  $G\alpha i3$  への $[^{35}S]$  GTP $\gamma$ S の結合量を差し引いた後、DAMGO を添加した時の  $G\alpha i3$  への $[^{35}S]$  GTP $\gamma$ S の結合量を 1 と規格化した時の、各アゴニスト添加時の  $G\alpha i3$  への $[^{35}S]$  GTP $\gamma$ S の結合量の結果 (N=3)。

Table. 3-2  $\mu$ OR に結合するアゴニストが有する G タンパク質シグナルの efficacy

Ligand	GTP $\gamma$ S binding (normalized DAMGO)
ligand-free	0.00266 ± 0.0181
naloxone	0.0372 ± 0.00957
morphine	0.478 ± 0.00303
DAMGO	1
TRV130	0.241 ± 0.00552



### 3.3.2. GRK2 による $\mu$ OR のリン酸化

アレスチンシグナルの大きさを評価するため、 $\mu$ OR-rHDL に GRK2 を加え、リン酸化反応を進行させ、リン酸化 Ser377 を認識する抗体を 1 次抗体としたウエスタンブロット解析により、リン酸化  $\mu$ OR の検出（化学発光検出）を行った（Fig. 3-10）。抗リン酸化 Ser377 抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果と、ゾーンデンストメトリー法を使用して、各泳動レーンにおけるリン酸化  $\mu$ OR ( $\mu$ OR-P) に由来するバンドの輝度を計測し、DAMGO 存在下を 1 として規格化した結果を示す（Fig. 3-11, Table. 3-3）。その結果、添加したリガンドの活性の報告値 [25, 26] と概ね対応していた。このことから、 $\mu$ OR はリガンドの efficacy 依存的にアレスチンシグナルを誘起することが分かった。

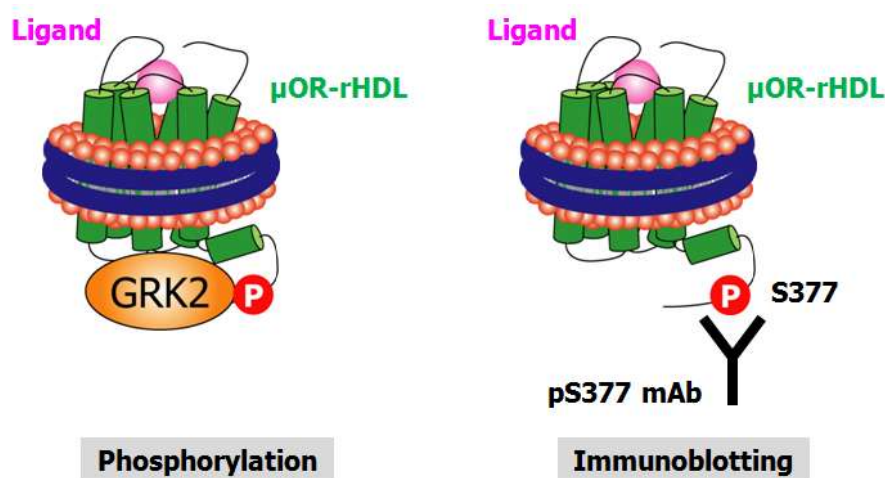


Fig. 3-10 Ser377 のリン酸化実験の模式図

$\mu$ OR-rHDL に対し、各種アゴニストおよび GRK2 を添加し、インキュベーションした。続いて、リン酸化 Ser377 を認識する 1 次抗体を用いたウエスタンブロット解析により、リン酸化  $\mu$ OR の検出を行った。

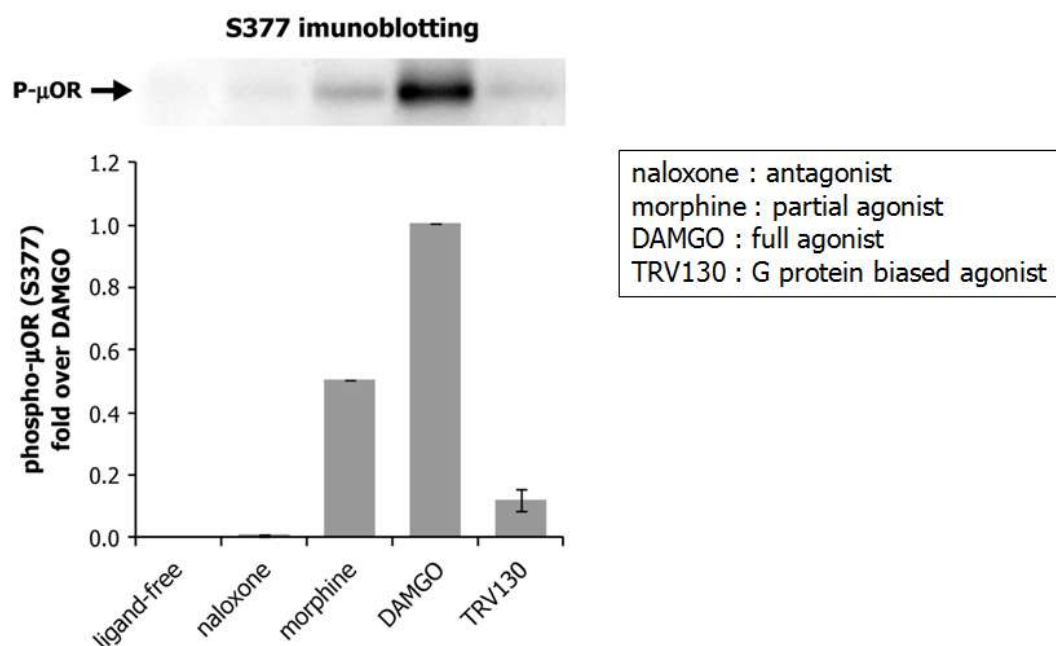


Fig. 3-11 μOR に結合するアゴニストが有するアレスチンシグナルの efficacy  
 (上) μOR-P の量。1 次抗体 : Phospho-μ-Opioid Receptor (Ser375) Antibody, 2 次抗体 : ECL Anti-rabbit IgG, HRP linked whole antibody, sensitivity : high, exposure time : 30 sec, mode : single。  
 (下) DAMGO を添加した時の Ser377 のリン酸化反応の進行度を 1 と規格化した時の、各アゴニスト添加時の Ser377 のリン酸化反応の進行度の結果 (N=3)。

Table. 3-3 μOR に結合するアゴニストが有するアレスチンシグナルの efficacy

Ligand	phospho-μOR (S377) (normalized DAMGO)
ligand-free	0
naloxone	0.00253 ± 0.00358
morphine	0.502 ± 0.000962
DAMGO	1
TRV130	0.115 ± 0.0329

### 3.3.3. N152A 変異体のシグナル伝達活性の評価

次に、アレスチンシグナルを選択的に活性化する  $\delta$ OR の N131<sup>3.35</sup>A 変異体に対応する  $\mu$ OR の N152<sup>3.35</sup>A 変異体の G タンパク質シグナル伝達活性およびアレスチンシグナル伝達活性を測定した。Fig. 3-12 には、野生型および N152A 変異体における、<sup>[35S]</sup> GTP $\gamma$ S の結合量およびリン酸化反応の進行度を、野生型における DAMGO 存在下のデータを 1 として規格化したものを示す。その結果、N152A 変異導入により、いずれのリガンド存在下および非存在下においても、G タンパク質シグナル、アレスチンシグナルの活性は増大した。しかしながら、N152A 変異導入による、DAMGO 存在下での G タンパク質シグナルの活性の増大は 1.6 倍、アレスチンシグナルの活性の増大は 2.0 倍と、アレスチンシグナルの方が G タンパク質シグナルよりもその増大は顕著であった。このことから、N152A 変異体は、DAMGO 存在下においてアレスチンシグナルの活性を選択的に増大させることが示された。

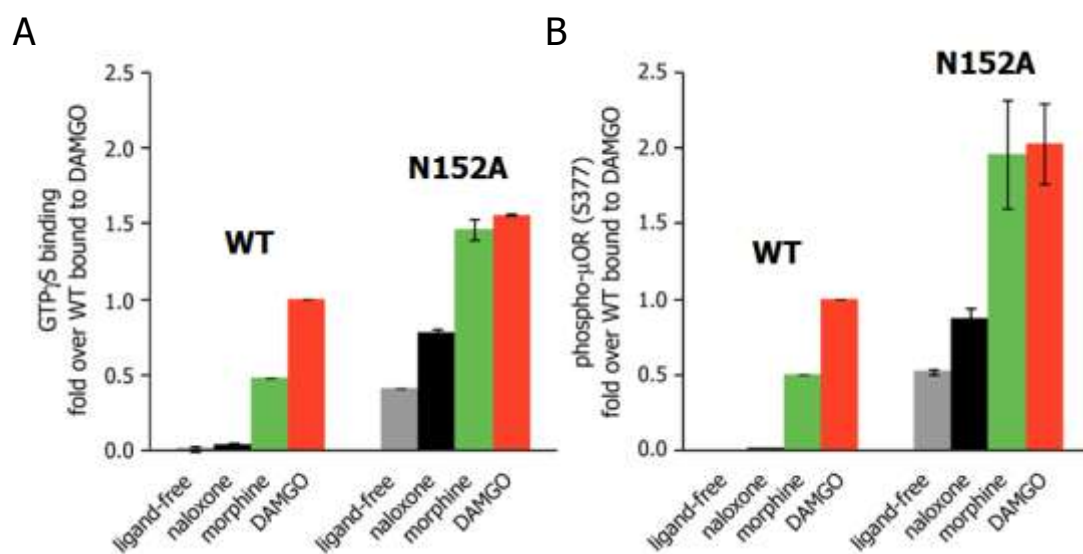


Fig. 3-12 N152A 変異体の G タンパク質シグナル伝達活性とアレスチンシグナル伝達活性  
(A) 各アゴニスト添加時の G $\alpha$ i3 への<sup>[35S]</sup> GTP $\gamma$ S の結合量を、野生型における DAMGO 存在下のデータを 1 として規格化した結果 (N=3)  
(B) 各アゴニスト添加時の Ser377 のリン酸化反応の進行度を、野生型における DAMGO 存在下のデータを 1 として規格化した結果 (N=3)

### 3.3.4. 各状態の bias factor の算出

3.3.1 節および 3.3.2. 節、3.3.3. 節で測定した、各リガンド結合状態における G タンパク質およびアレスチンシグナル伝達活性の結果についてまとめる。各状態における、G タンパク質シグナル伝達活性の大きさを横軸に、アレスチンシグナル伝達活性の大きさを縦軸にプロットしたものを、Fig. 3-13 に示す。

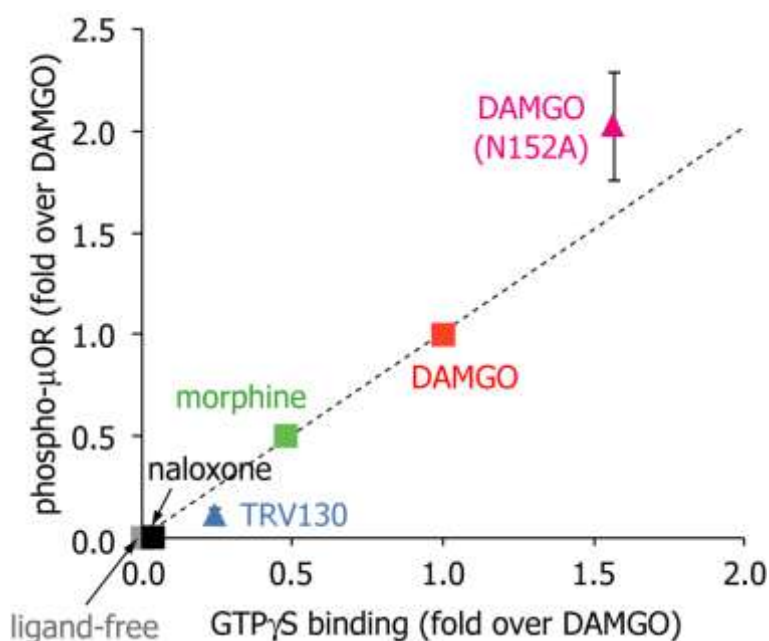


Fig. 3-13 各状態の G タンパク質シグナルとアレスチンシグナル伝達活性の相関

その結果、balanced ligand である naloxone, morphine, DAMGO を添加した時の Gai3 への [ $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S 結合量と Ser377 のリン酸化反応の進行度は、非常に良い相関 ( $r^2 = 0.998$ ) を示した。一方、TRV130 結合状態および N152A 変異体では、その近似曲線から外れていた。そこで、シグナルの選択性を定量的に評価するため、TRV130 結合状態および N152A 変異体におけるプロットの傾き ( $=E_A / E_G$ ,  $E_A$ : アレスチンシグナルの活性の大きさ、 $E_G$ : G タンパク質シグナルの活性の大きさ) を、G タンパク質およびアレスチンシグナル伝達活性の大きさの違いすなわち bias factor として算出した (Table. 3-4)。上式から bias factor の値は、G タンパク質シグ

ナルをより活性化する場合は 1.0 以下に、アレスチンシグナルをより活性化する場合は 1.0 以上となる。このように、TRV130 では bias factor の値が 0.48 となり 1.0 より小さく、G タンパク質をより活性化することが定量的に示された [20]。同様に、N152A 変異体では bias factor の値が 1.30 となり 1.0 より大きく、アレスチンをより活性化することが定量的に示された [5]。

Table. 3-4 各状態から算出された bias factor の値

Ligand	bias factor
morphine (WT)	1.05
DAMGO (WT)	1.00
TRV130 (WT)	0.48
DAMGO (N152A)	1.30

### 3.4. メチオニン側鎖メチル基選択標識した $\mu$ OR の NMR 解析

#### 3.4.1. $\mu$ OR の NMR 解析の概要と戦略

本研究では、 $\mu$ OR のメチオニン残基の側鎖メチル基を選択的に [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] 標識した上で、NMR シグナルを観測することとした。我々は、昆虫細胞発現系において、メチオニン残基の側鎖メチル基を選択標識する手法を確立しており、[methyl- $^{13}\text{C}$ ] 標識メチオニンを用いることで、アミドプロトンなどの他の NMR プローブと比較して、高感度でシグナルを取得することが可能である [11]。加えて、メチオニン残基の側鎖メチル基の  $^1\text{H}$  の化学シフト値は、周囲の芳香環からの環電流効果 [27]、 $^{13}\text{C}$  の

化学シフト値は、メチオニン側鎖の $\chi^3$  二面角 [28, 29] に依存するため、高分解能の構造が報告されていれば、化学シフト値と構造変化を対応付けることが可能である。実際に、我々は、 $\beta_2$ AR の NMR 解析において、活性化状態と不活性化状態の構造と化学シフトが良く対応していることを明らかにした [11]。

$\mu$ OR のメチオニン残基は 13 個存在し、 $\mu$ OR の広い範囲で分布している。特に、活性化に伴い大きく構造変化する TM3 および TM5、TM6 の膜貫通領域に多く存在している (Fig. 3-14)。3.4.3 節で後述するように、メチオニン残基を他のアミノ酸残基に置換した変異体を用いることで、分子中の全ての部位について、残基特異的に構造情報を取得することが可能である。

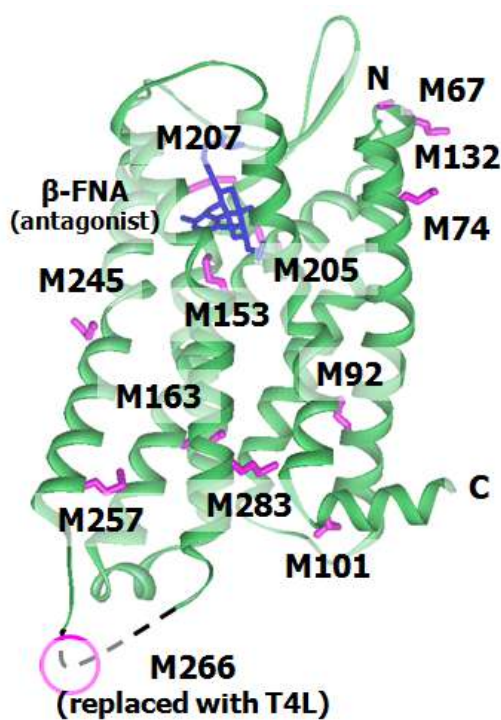


Fig. 3-14  $\mu$ OR のメチオニン残基の分布

13 個のメチオニン残基を  $\mu$ OR の構造上に、スティックにて示した。但し、ICL3 に位置する Met266 に関して、結晶構造では ICL3 が T4L に置換されているため、側鎖の配向は不明である。

### 3.4.2. $\mu$ OR の[methyl- $^{13}\text{C}$ ] 標識体の NMR スペクトル

2.5. 節に記した方法により、メチオニン側鎖を選択的に  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識した  $\mu$ OR を調製し、antagonist である naloxone 結合状態、full agonist である DAMGO 結合状態のそれぞれについて、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルを取得した。antagonist である naloxone 結合状態では、7 個のシグナルが観測された (Fig. 3-15A)。典型的な Met 残基の化学シフト ( $^1\text{H}$  1.9-2.1 ppm,  $^{13}\text{C}$  16.5-17.5 ppm) に線幅が狭く、強度の強いシグナルが 4 個観測された。また、 $^1\text{H}$  に関して高磁場側に観測される 2 個のシグナル ( $^1\text{H}$  1.6-1.7 ppm,  $^{13}\text{C}$  17 ppm) や  $^1\text{H}$  に関して低磁場側に観測されるノイズ以上の広幅なシグナル ( $^1\text{H}$  2.2 ppm,  $^{13}\text{C}$  18 ppm) が観測された。残り 6 残基分のシグナルは、広幅化または縮重しているために観測されていないと考えた。また、full agonist である DAMGO 結合状態では、5 個のシグナルが観測された (Fig. 3-15B)。典型的な Met 残基の化学シフト ( $^1\text{H}$  1.9-2.1 ppm,  $^{13}\text{C}$  16.5-17.5 ppm) に線幅が狭く、強度の強いシグナルが 3 個観測された。また、 $^1\text{H}$  に関して高磁場側に観測される 2 個のシグナル ( $^1\text{H}$  方向 1.6-1.7 ppm,  $^{13}\text{C}$  方向 17 ppm) も観測された。残り 8 残基分のシグナルは、広幅化または縮重しているために観測されていないと考えた。

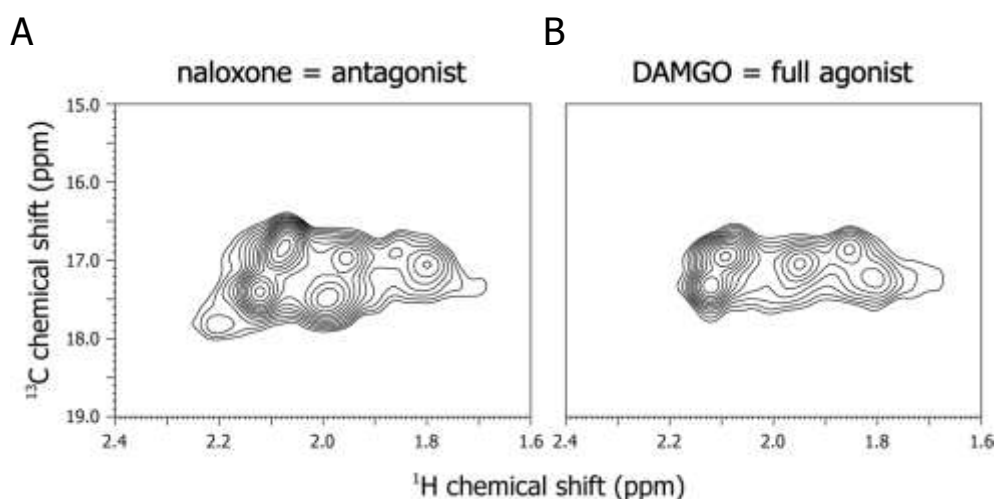


Fig. 3-15 [methyl- $^{13}\text{C}$ ] Met 標識した  $\mu$ OR の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル  
(A) naloxone (antagonist) 結合状態、(B) DAMGO (full agonist) 結合状態

### 3.4.3. NMR スペクトルの簡略化

[methyl- $^{13}\text{C}$ ] Met 標識した  $\mu\text{OR}$  のメチオニンメチルシグナルには、比較的先鋭で強度の強いシグナルと、比較的広幅で強度の弱いシグナルがある (Fig. 3-15)。これらは、それぞれ側鎖が溶媒もしくは脂質二重膜側に露出したメチオニン残基と、側鎖が膜貫通領域に埋没したメチオニン残基に由来するものである。本研究において、有用なプローブとなり得るのは、TM3 や TM5、TM6 の膜貫通領域に位置するメチオニン残基 (M153, M163, M245, M257, M283) である。しかしながら、強度が強く、側鎖が溶媒もしくは脂質二重膜側に露出したメチオニン残基 (M67, M74, M132, M205, M207, M266) のシグナルは、これらシグナルを解析する上で妨げとなることが予想される。そこで、比較的保存性が低く、側鎖が分子内の相互作用に関与しておらず、溶媒もしくは脂質二重膜側に露出したメチオニン残基のシグナルを順に消去していき、NMR スペクトルを簡略化することとした。スペクトルの簡略化には、 $\beta_2\text{AR}$  を用いた解析と同様に変異体を用いることとした [11, 30]。変異の設計は、原則的に  $\delta\text{OR}$  または  $\kappa\text{OR}$ 、NOP の残基に変異し、M132L/M205I/M207L 変異体 (以降、 $\Delta 3\text{M}$  変異体とする)、 $\Delta 3\text{M}/\text{M266L}$  変異体 (以降、 $\Delta 4\text{M}$  変異体とする)、 $\Delta 4\text{M}/\text{M67L}/\text{M74T}$  変異体 (以降、 $\Delta 6\text{M}$  変異体とする) を作製した (Table. 3-5)。



Table. 3-5 ヒト由来  $\mu$ OR の Met 残基に対応するヒト由来  $\delta$ OR,  $\kappa$ OR, NOP のアミノ酸残基

$\mu$ OR	M67	M74	M132	M205	M207	M266
Ballesteros-Weinstein Numbering	1.29	1.36	2.66	4.61	ECL2	ICL3
$\delta$ OR	L	T	M	M	M	L
$\kappa$ OR	P	T	M	I	L	L
NOP	L	V	L	A	M	L
Mutation introduced	L	T	L	I	L	L

まず、 $\Delta$ 3M 変異体の NMR スペクトルを取得した。その結果、naloxone 結合状態において、 $\mu$ OR と比較して $\Delta$ 3M 変異体では、①  $^1\text{H}$  1.95 ppm,  $^{13}\text{C}$  17.0 ppm 付近のシグナルおよび、②  $^1\text{H}$  1.80 ppm,  $^{13}\text{C}$  17.1 ppm 付近のシグナル、③  $^1\text{H}$  1.86 ppm,  $^{13}\text{C}$  17.0 ppm 付近のシグナルが消失した (Fig. 3-16A)。このことから、それぞれ M132、M205 (または M207)、M207 (または M205) 由来のシグナルと帰属した。同様に DAMGO 結合状態においても、 $\mu$ OR と比較して $\Delta$ 3M 変異体では、①  $^1\text{H}$  1.95 ppm,  $^{13}\text{C}$  17.1 ppm 付近のシグナルおよび、②  $^1\text{H}$  1.81 ppm,  $^{13}\text{C}$  17.3 ppm 付近のシグナル、③  $^1\text{H}$  1.85 ppm,  $^{13}\text{C}$  16.9 ppm 付近のシグナルが消失した (Fig. 3-16A)。このことから、それぞれ M132、M205 (または M207)、M207 (または M205) 由来のシグナルと帰属した。

次に、 $\Delta$ 4M 変異体の NMR スペクトルを取得した。naloxone 結合状態において、 $\Delta$ 3M 変異体と比較して $\Delta$ 4M 変異体では、 $^1\text{H}$  2.07 ppm,  $^{13}\text{C}$  16.8 ppm 付近のシグナルが消失した (Fig. 3-16B)。このことから、このシグナルを M266 由来のシ

グナルと帰属した。同様に DAMGO 結合状態においても、 $\Delta 3M$  変異体と比較して  $\Delta 4M$  変異体では、 $^1H$  2.10 ppm,  $^{13}C$  16.9 ppm 付近のシグナルが消失した (Fig. 3-16B)。このことから、このシグナルを M266 由来のシグナルと帰属した。

さらに、 $\Delta 6M$  変異体の NMR スペクトルを取得した。naloxone 結合状態において、 $\Delta 4M$  変異体と比較して  $\Delta 6M$  変異体では、 $^1H$  2.12 ppm,  $^{13}C$  17.4 ppm 付近のシグナルが消失した (Fig. 3-16C)。このことから、このシグナルを M67 (または M74) 由来のシグナルと帰属した。同様に DAMGO 結合状態においても、 $\Delta 3M$  変異体と比較して  $\Delta 6M$  変異体では、①  $^1H$  2.12 ppm,  $^{13}C$  17.3 ppm 付近のシグナルおよび、②  $^1H$  1.95 ppm,  $^{13}C$  16.9 ppm 付近のシグナルが消失した (Fig. 3-16C)。このことから、それぞれ M67 (または M74)、M74 (または M67) 由来のシグナルと帰属した。

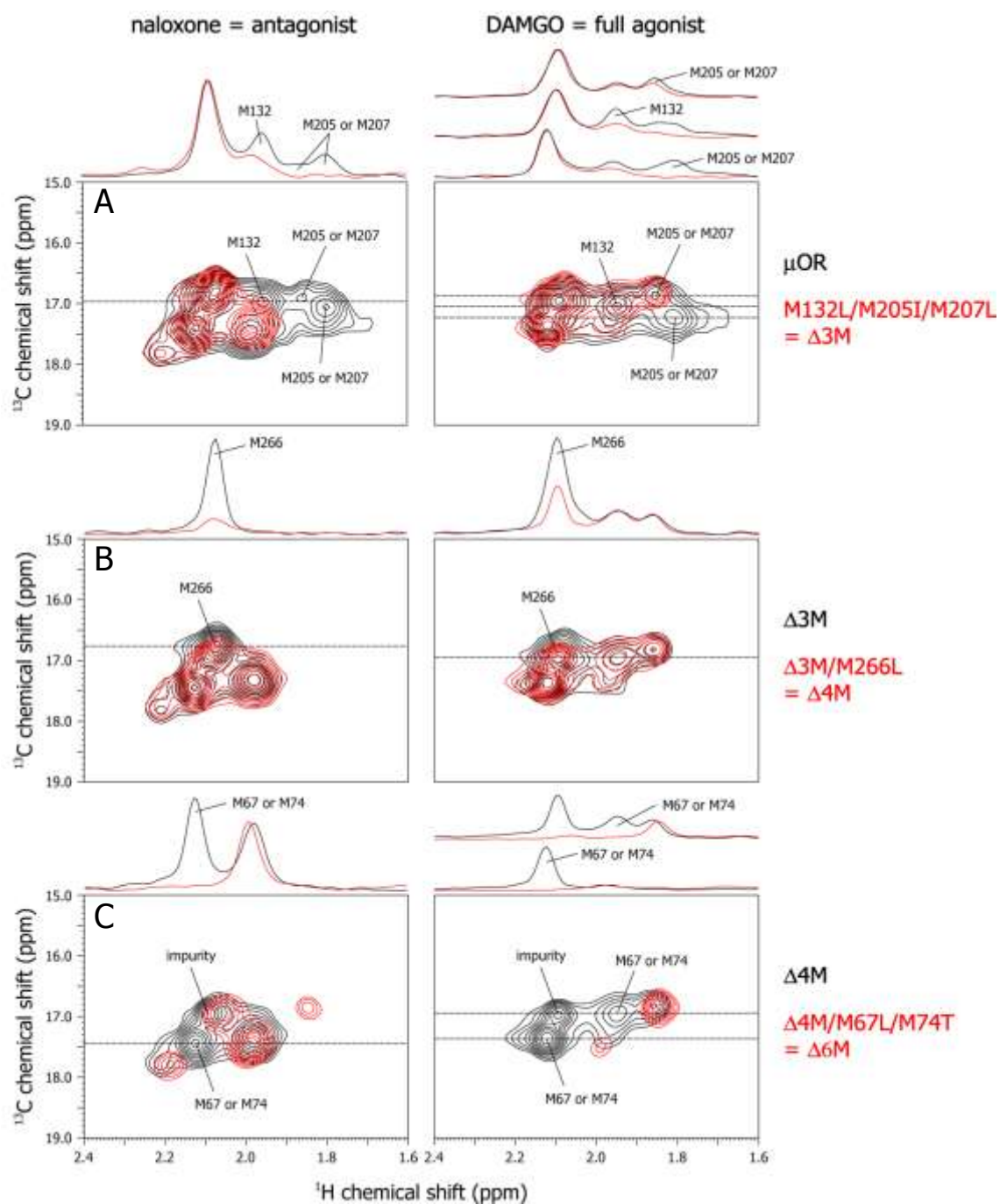


Fig. 3-16 各メチオニン残基のシグナルの帰属とスペクトルの簡略化  
 (A) M132L/M205I/M207L ( $=\Delta 3\text{M}$ ) 変異体の NMR スペクトル。M132L/M205I/M207L 由来のシグナルの帰属。  
 (B)  $\Delta 3\text{M}/\text{M266L}$  ( $=\Delta 4\text{M}$ ) 変異体の NMR スペクトル。M266L 由来のシグナルの帰属。  
 (C)  $\Delta 4\text{M}/\text{M67L}/\text{M74T}$  ( $=\Delta 6\text{M}$ ) 変異体の NMR スペクトル。M67/M74 由来のシグナルの帰属。

以上の結果、naloxone 結合状態および DAMGO 結合状態いずれにおいても、強度が強く、側鎖が溶媒もしくは脂質二重膜側に露出したメチオニン残基 (M67, M74, M132, M205, M207, M266) のシグナル全てを帰属することに成功した (Fig. 3-17)。

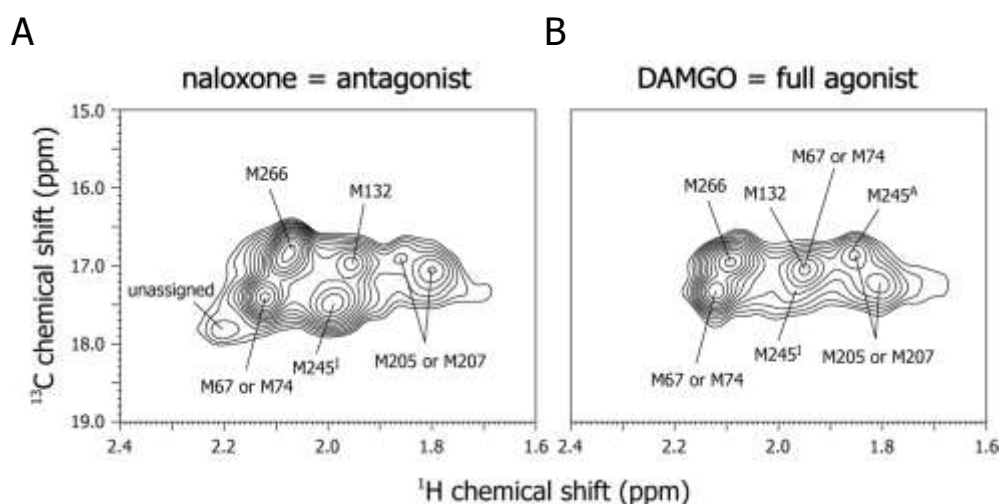


Fig. 3-17 [methyl- $^{13}\text{C}$ ] Met 標識した  $\mu\text{OR}$  の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル (帰属を含む)  
(A) naloxone (antagonist) 結合状態、(B) DAMGO (full agonist) 結合状態

### 3.5. $\mu\text{OR}$ の $^2\text{H}$ 標識体の調製

#### 3.5.1. $^2\text{H}$ 標識の概要と戦略

前項までのメチオニンのメチル基をプローブとした  $\mu\text{OR}$  の NMR 解析では、メチオニンの  $\alpha$  位および  $\beta$  位のみを重水素化した  $\mu\text{OR}$  を用いていた。antagonist である naloxone 結合状態の  $\Delta 6\text{M}$  変異体 では、活性化に伴い大きく構造変化する、TM3、5、6 に位置するメチオニン残基に由来するシグナルは観測されていない。リガンド依存的な  $\mu\text{OR}$  の細胞内領域および膜貫通領域の構造変化を NMR 解析により明らかにするためには、これら残基の感度向上が必要である。そこで、重水素化に

より、シグナルの先鋭化を試みることにした。

NMR シグナルの感度は、観測するメチオニン残基の側鎖メチル基の水素核と、周囲の水素核との距離  $r$  の $-6$ 乗の総和（以降、水素核近接度と表記する）が大きくなるほど、双極子-双極子相互作用により横緩和速度が大きくなるため、低下する [31-33]。したがって、観測するメチオニン側鎖メチル基の水素核の周囲の水素核を重水素に置換することにより、水素核の近接度を下げ、NMR シグナルの感度を向上させることが可能である。

通常の NMR 解析に用いられる大腸菌や酵母発現系では、重水中にて培養を行うことで、高度に重水素化することが可能である [32, 34]。しかし、昆虫細胞においては、重水を用いた生育、およびタンパク質の  $^2\text{H}$  標識はできない。そこで、我々はアミノ酸を除いた培地に対し、重水素標識アミノ酸を個別に添加することで、一部の代謝されるアミノ酸を除き、60-90 % の標識率にて、重水素標識を行う方法を開発し、 $\mu\text{OR}$  を重水素標識した [14]。

### 3.5.2. $^2\text{H}$ 標識アミノ酸の選定

昆虫細胞発現系における重水素化は、重水素標識アミノ酸を個別に添加する方法によって行われる。そのため、重水素化標識するアミノ酸を適切に選択し、非標識のアミノ酸を過剰量添加して栄養源を豊富にすることで、十分な発現量を得ることができ、またコストに関しても極力抑えることができる。まず、重水素化標識するアミノ酸を選定するため、 $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA; antagonist) が結合した不活性化状態の  $\mu\text{OR}$  の結晶構造 (PDB: 4DKL) をもとに、 $\Delta 6\text{M}$  変異体に存在する 7 個のメチオニン残基の側鎖メチル基の水素核と、分子中の水素核との近接度を、アミノ酸ごとに算出した。

その結果、現在のところ重水素化標識が可能な、チロシン、スレオニン、フ

エニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、リジン、アルギニン残基の 8 種類のアミノ酸の水素核を重水素化標識することで、現状の培養条件における標識率を考慮すると、理論上 3-5 倍感度が向上することが示唆された (Fig. 3-18)。

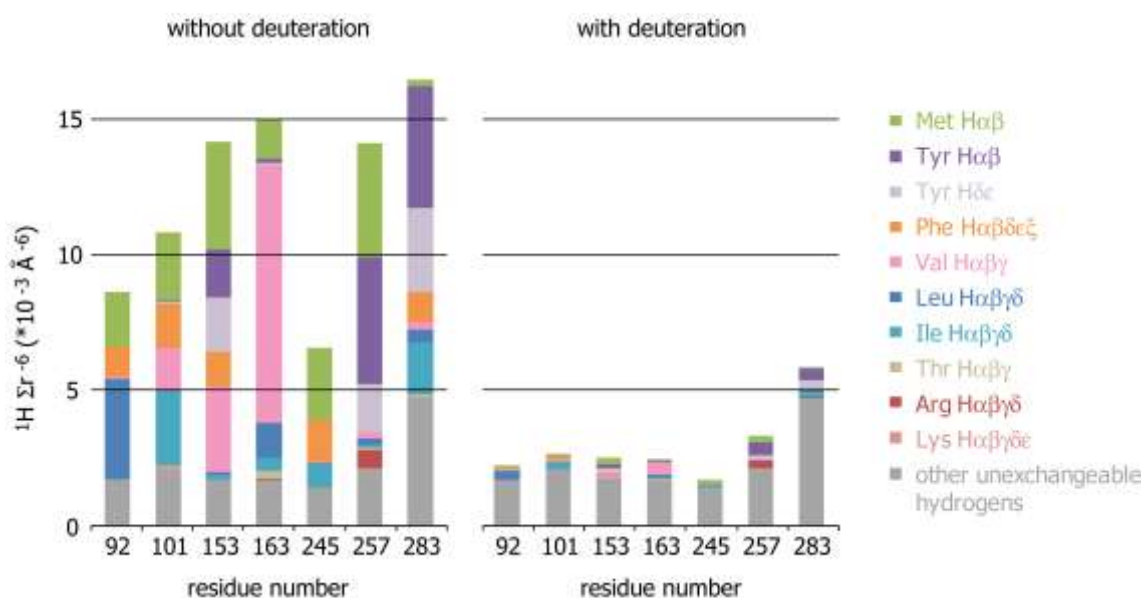


Fig. 3-18 Δ6M 変異体の各メチオニン残基の周囲のプロトンの近接度

β-FNA 結合状態の結晶構造を用いて、各メチオニン残基の周囲の水素核近接度を、周囲のアミノ酸別にそれぞれ算出した。左側が重水素標識をしない時の水素核近接度、右側が本文中に記載したアミノ酸を重水素標識した時の水素核近接度を表す。各アミノ酸の標識率は、以下のデータを用いた。

(重水素標識した各アミノ酸の標識率)

α, β-<sup>2</sup>H-, methyl-<sup>13</sup>C Met ~95 %

<sup>2</sup>H-Ile/Leu/Val/Thr ~90 %

<sup>2</sup>H-Phe ~85 %

<sup>2</sup>H-Tyr ~90 %

<sup>2</sup>H-Lys/Arg ~60 %

### 3.5.3. 均一重水素化 tyrosine ([<sup>2</sup>H<sub>7</sub>] D,L-Tyr, <sup>2</sup>H-Tyr) の合成

TM5 に位置する M257 や TM6 に位置する M283 のメチル基の <sup>1</sup>H は、チ

ロシンの  $\alpha$  位や  $\beta$  位の  $^1\text{H}$  と近接している。そのため、これらメチオニン残基のメチルシグナルに関して、市販されている  $[\delta, \epsilon\text{-}^2\text{H}]$  Tyr の代わりに、均一重水素化 tyrosine ( $[\text{}^2\text{H}_7]$  D,L-Tyr,  $^2\text{H}$ -Tyr) を培養に用いることで感度の向上が期待される。そこで、DCl 存在下での加熱および白金、パラジウム触媒下での加熱により、非標識 Tyr から  $^2\text{H}$ -Tyr を合成した (Fig. 3-19)。

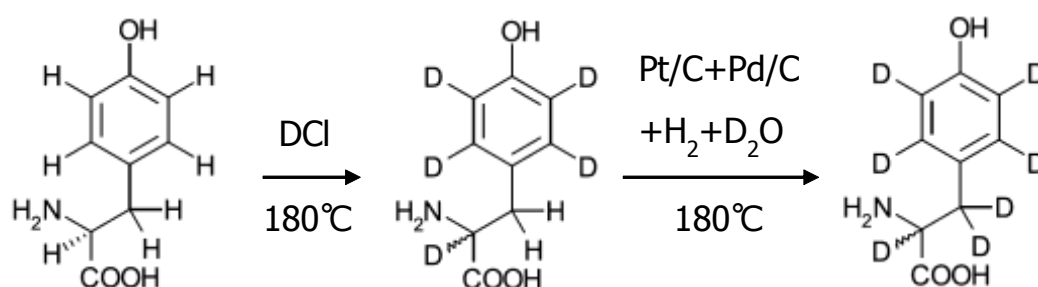


Fig. 3-19  $^2\text{H}$ -Tyr の合成スキーム

合成した  $^2\text{H}$ -Tyr の  $^1\text{H}$ -1D スペクトルを取得した結果、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  位のいずれのシグナルも singlet として観測され、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  の J-カップリングによるシグナルの分裂が観測されなかった (Fig. 3-20)。また、合成した  $^2\text{H}$ -Tyr の  $^{13}\text{C}$ -1D スペクトルを取得した結果、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  位のいずれのシグナルも、 $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  の J-カップリングの大きさに対応して、分裂していた ( $\beta$  位は quintet, 残りは triplet) (Fig. 3-21)。一方、 $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  の大きな J-カップリングによる分裂は観測されなかった。以上の結果から、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  位いずれも、95 % 以上が重水素化されていると判断した。また、1 g の非標識 L-Tyr から約 0.5 g の  $[\alpha, \beta, \delta, \epsilon\text{-}^2\text{H}]$  DL-Tyr (ラセミ体) を得たことから、収率を約 25 % と見積もった。

合成した  $[\alpha, \beta, \delta, \epsilon\text{-}^2\text{H}]$  DL-Tyr を 1 L 培養あたり 100 mg (L 体換算で 50 mg/L culture) 添加して重水素化培養を行い、発現量をウエスタンブロットにより比較した。その結果、 $[\delta, \epsilon\text{-}^2\text{H}]$  L-Tyr を 1 L 培養あたり 50 mg 添加して重水素化培養

を行った時と同等の発現量が得られることが分かった (data not shown)。以上の結果から、 $[\alpha, \beta, \delta, \epsilon\text{-}^2\text{H}]$  D,L-Tyr を昆虫細胞に添加しても問題ない程度の純度で調製できたと判断した。

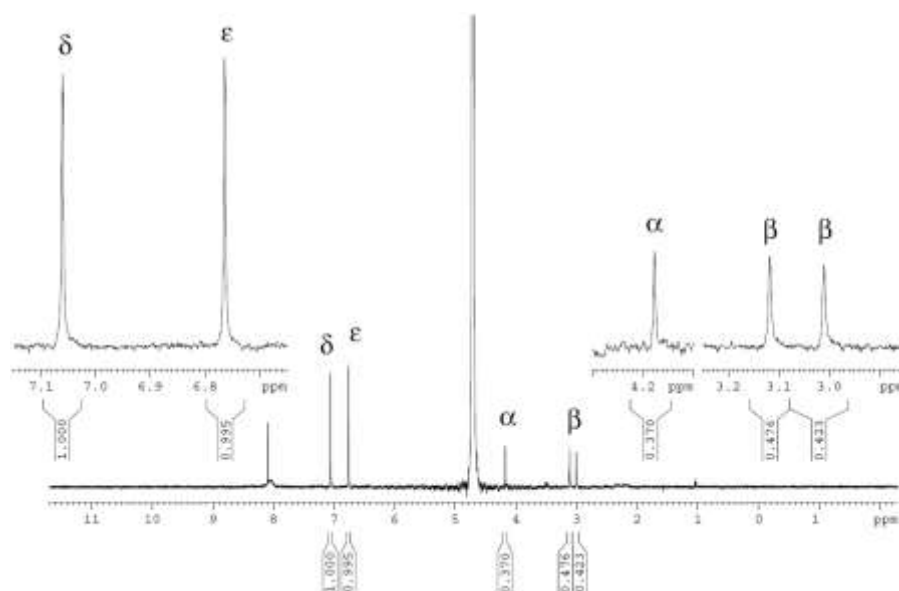


Fig. 3-20  $^2\text{H}$ -Tyr の  $^1\text{H}$ -1D スペクトル

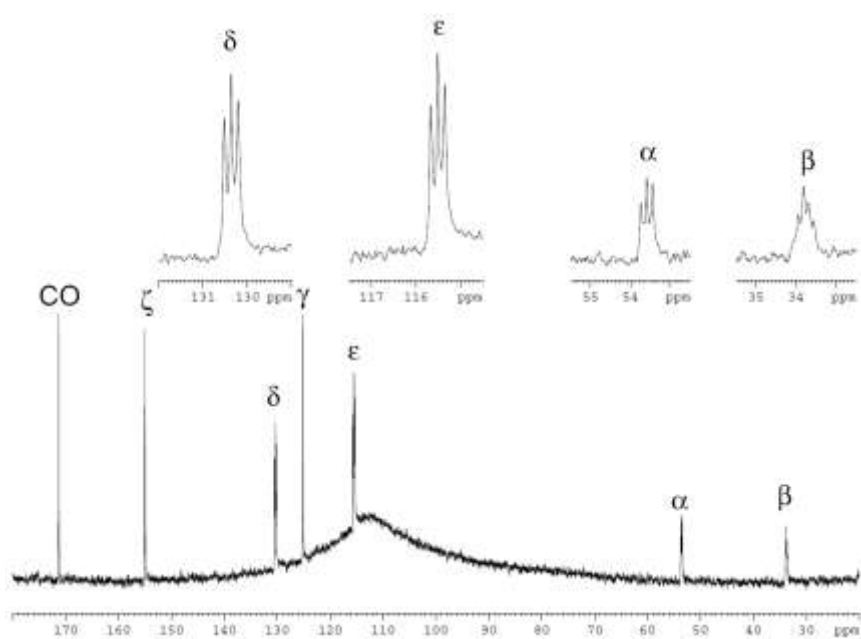


Fig. 3-21  $^2\text{H}$ -Tyr の  $^{13}\text{C}$ -1D スペクトル



#### 3.5.4. [ $^2\text{H}$ -8AA, methyl- $^{13}\text{C}$ Met] $\Delta 6\text{M}$ 変異体の NMR スペクトル

次に、2.4.5 節に記した方法に従って、3.5.2. 節に記した 8 種類のアミノ酸の重水素化、およびメチオニン残基の側鎖メチル基を選択的に [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] 標識した上で、MNG ミセル中の [ $^2\text{H}$ -8AA, methyl- $^{13}\text{C}$  Met]  $\Delta 6\text{M}$  変異体の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルを取得した。

antagonist である naloxone 結合状態の  $\Delta 6\text{M}$  変異体の NMR スペクトルでは、重水素化していない  $\Delta 6\text{M}$  変異体のスペクトルと比較して、線幅の縮小と感度の向上が観測された (Fig. 3-22)。重水素化により、1 L 培養あたりの収量が 7 割程度であるにもかかわらず、重水素化しない場合と比較して未帰属のメチオニン残基に由来するシグナルのシグナル強度が 2~3 倍以上 (濃度を同一にした場合、3~4 倍以上) 向上した。

同様に full agonist である DAMGO 結合状態の  $\Delta 6\text{M}$  変異体の NMR スペクトルでは、naloxone 結合状態と同じように、重水素化していない  $\Delta 6\text{M}$  変異体のスペクトルと比較して、線幅の縮小と感度の向上が観測され、新たなシグナルが最低 3 個観測された (Fig. 3-22)。重水素化により、1 L 培養あたりの収量が 7 割程度であるにもかかわらず、重水素化しない場合と比較して、今回新たに観測されたシグナルにおいては少なくとも 2 倍以上 (濃度を同一にした場合、3 倍以上) 感度が向上した。

また、ほぼ全てのシグナルの化学シフトが、naloxone 結合状態と full agonist 結合状態とで異なっていた。

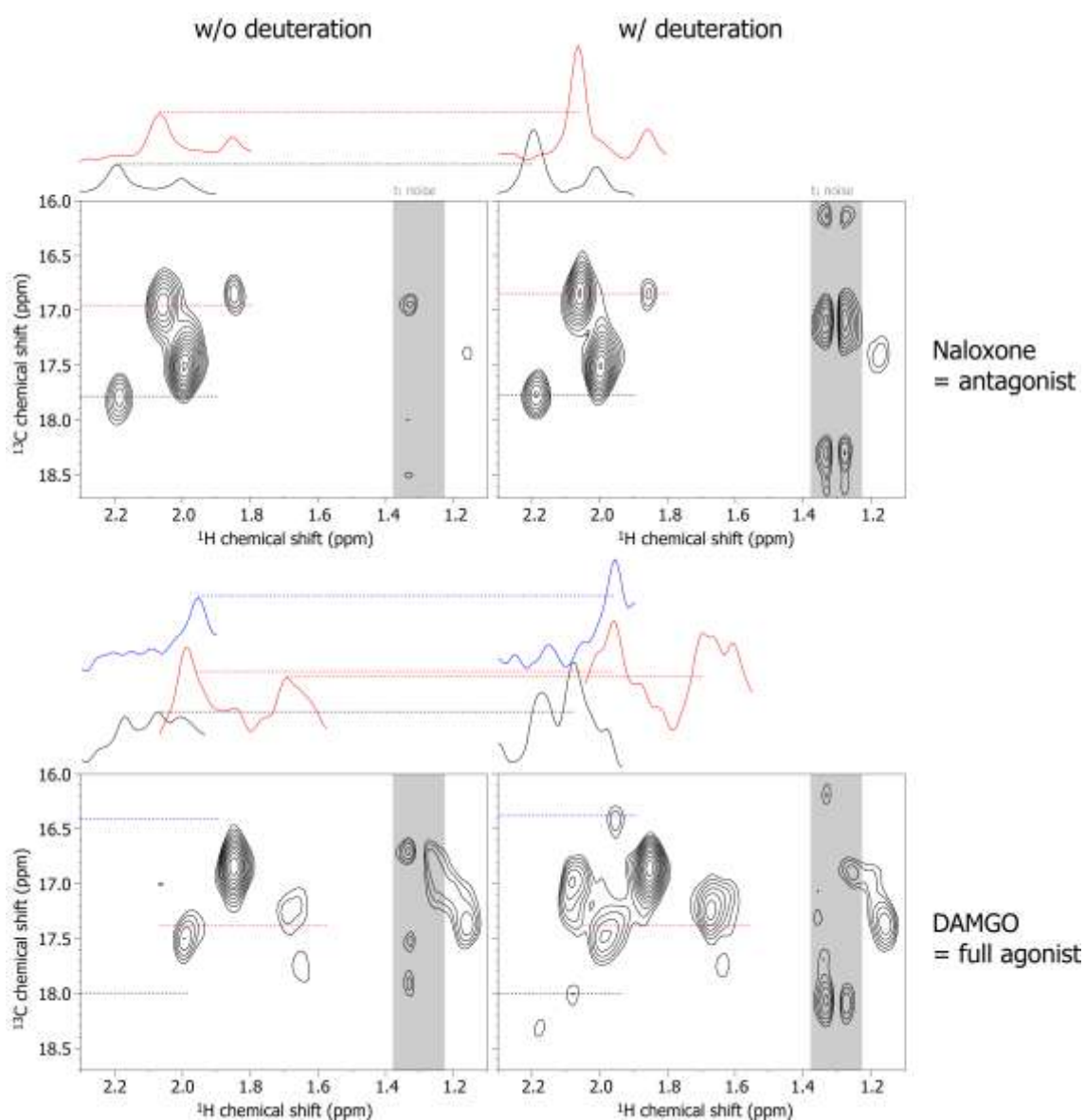


Fig. 3-22 antagonist および full agonist 結合状態の  $\mu\text{OR}$  において重水素化していない場合 (左) と重水素化した場合 (右) の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルの比較。2 次元スペクトルの上には、各シグナルの切り出しを示す。灰色で、LMNG に由来する  $t_1$  ノイズが観測される領域を示す。

### 3.6. メチオニンシグナルの帰属

antagonist 結合状態、full agonist 結合状態のそれぞれについて、各メチオニン残基を 1 個ずつ他のアミノ酸残基に置換した変異体のスペクトルを取得し、変異導入前のスペクトルと比較することで、シグナルの帰属を行った。

変異体は他の GPCR とのアライメント (Table. 3-6) をもとに複数作成し、フローサイトメトリー (flow cytometry ; FCM) 解析および、蛍光標識リガンドを用いた蛍光ゲルろ過 (fluorescence size-exclusion chromatography ; FSEC) 法により、各変異体の昆虫細胞膜表面での発現量および界面活性剤で可溶化した状態の性状を評価し、発現量および性状が最も良い変異体を NMR 解析に用いることとした。

FCM 解析および FSEC 解析により変異体の選定を行った結果、M92<sup>1.54</sup> については M92<sup>1.54</sup>C, または M92<sup>1.54</sup>A を、M101<sup>ICL1</sup> については M101<sup>ICL1</sup>T, または M101<sup>ICL1</sup>L を、M153<sup>3.36</sup> については M153<sup>3.36</sup>V を、M163<sup>3.46</sup> については M163<sup>3.46</sup>I を、M245<sup>5.49</sup> については M245<sup>5.49</sup>V を、M257<sup>5.61</sup> については M257<sup>5.61</sup>I を、M283<sup>6.36</sup> については M283<sup>6.36</sup>L を解析することとした (data not shown)。

Table. 3-6 クラス A に属する GPCR のアミノ酸残基の出現頻度

	<b>1.54</b> <b>(M92)</b>	<b>3.36</b> <b>(M153)</b>	<b>3.46</b> <b>(M163)</b>	<b>5.61</b> <b>(M257)</b>	<b>6.36</b> <b>(M283)</b>
<b>A</b>	4 (5)	3 (3)	1 (1)	0 (0)	3 (2)
<b>C</b>	6 (7)	11 (2)	1 (0)	1 (0)	0 (0)
<b>D</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>E</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (1)
<b>F</b>	1 (1)	9 (14)	1 (0)	1 (2)	2 (2)
<b>G</b>	1 (0)	6 (1)	0 (0)	1 (0)	1 (1)
<b>H</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
<b>I</b>	27 (30)	4 (3)	55 (43)	56 (55)	5 (7)
<b>K</b>	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (2)
<b>L</b>	34 (30)	13 (16)	16 (23)	10 (9)	12 (20)
<b>M</b>	8 (9)	18 (30)	13 (23)	7 (11)	18 (28)
<b>N</b>	0 (0)	1 (1)	0 (1)	0 (0)	2 (0)
<b>P</b>	0 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
<b>Q</b>	1 (1)	2 (4)	0 (0)	1 (0)	2 (0)
<b>R</b>	1 (1)	3 (1)	0 (0)	1 (1)	6 (3)
<b>S</b>	1 (0)	9 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2)
<b>T</b>	1 (0)	5 (3)	1 (1)	6 (9)	24 (13)
<b>V</b>	12 (15)	11 (19)	10 (7)	13 (11)	13 (20)
<b>W</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Y</b>	1 (0)	3 (3)	0 (0)	0 (0)	1 (1)

クラス A に属する GPCR の 1.54, 3.36, 3.46, 5.61, 6.36 (Ballesteros-Weinstein numbering system) に位置するアミノ酸残基の出現頻度を% で示した。また、括弧内において、ペプチドをリガンドとする GPCR のアミノ酸残基の出現頻度を示した。メチオニン残基の出現頻度を赤字で示した。また、各メチオニン残基を他のアミノ酸残基に変異する際、検討を試みたアミノ酸残基を灰色で塗りつぶした。

### 3.6.1. M245<sup>5,49</sup> のメチルシグナルの帰属

TM5 の膜貫通領域中腹に存在する M245<sup>5,49</sup> のメチルシグナルの帰属を行うこととした。MNG ミセル中の [<sup>2</sup>H-8AA, methyl-<sup>13</sup>C Met] Δ6M+M245V 変異体（以降、Δ7M 変異体とする）の <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC スペクトルを取得した。

その結果、antagonist である naloxone 結合状態の Δ7M 変異体の NMR スペクトルにおいて、高磁場側のシグナル (<sup>1</sup>H 1.85 ppm, <sup>13</sup>C 16.9 ppm) と低磁場側のシグナル (<sup>1</sup>H 2.00 ppm, <sup>13</sup>C 17.5 ppm) の 2 個が消失した (Fig. 3-23)。また、full agonist である DAMGO 結合状態の Δ7M 変異体の NMR スペクトルにおいても、高磁場側のシグナル (<sup>1</sup>H 1.85 ppm, <sup>13</sup>C 16.9 ppm) と低磁場側のシグナル (<sup>1</sup>H 2.00 ppm, <sup>13</sup>C 17.5 ppm) の 2 個が消失した (Fig. 3-23)。

また、Δ6M 変異体と Δ7M 変異体とで Δ7M 変異体に存在するメチオニン残基の化学シフト値が大きく異なっていなかったこと、また、G タンパク質シグナル伝達活性が大きく変化しなかったこと (data not shown) から、antagonist 結合状態および full agonist 結合状態の構造は、いずれも M245V 変異導入により大きく変化していないと判断した。

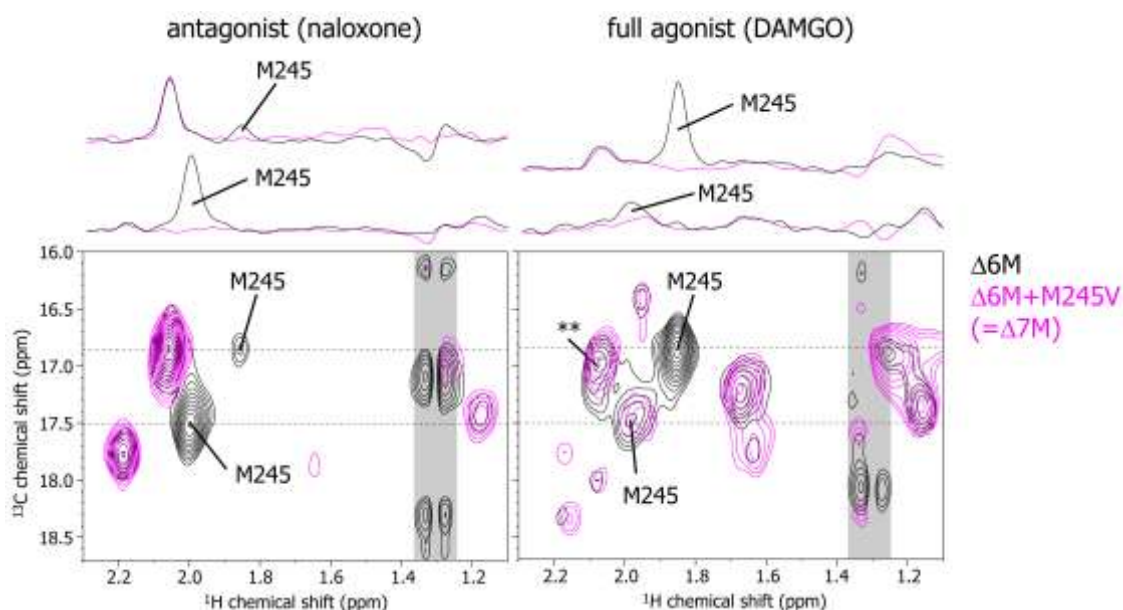


Fig. 3-23 M245 のメチオニンメチルシグナルの帰属  
(左) antagonist (naloxone) 結合状態、(右) full agonist (DAMGO) 結合状態  
Δ6M 変異体 (黒) および Δ7M 変異体 (マゼンタ) の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル

### 3.6.2. M163<sup>3,46</sup> のメチルシグナルの帰属

3.6.1. 節の結果から、Δ7M 変異体を用いて、細胞内領域に位置し、かつ非常にシグナル強度が弱いメチオニン残基、特に TM3 に位置する M163<sup>3,46</sup> や TM5 に位置する M257<sup>5,61</sup>、TM6 に位置する M283<sup>6,36</sup> の側鎖メチル基のシグナルの帰属を行うことができると考えた。そこで、TM3 の細胞内領域に位置する M163<sup>3,46</sup> のメチルシグナルの帰属を Δ7M + M163I 変異体を用いて行うこととした。まず、細胞内領域に変異を導入することで、受容体の活性へ影響することが懸念されることから、Δ7M + M163I 変異体のリガンド結合活性 (膜画分) と G タンパク質シグナル伝達活性 (rHDL) を評価した。

[ $^3\text{H}$ ] diprenorphine 結合実験の結果、調製した Δ7M + M163I 変異体に対し、

添加した $^3\text{H}$  diprenorphine の濃度依存的に、 $\Delta 7\text{M} + \text{M163I}$  変異体に結合した $^3\text{H}$  diprenorphine 量が増大し、その結合が飽和したことから、 $\Delta 7\text{M} + \text{M163I}$  変異体と $^3\text{H}$  diprenorphine との特異的な結合を検出できたと判断した (Fig. 3-24)。one site binding model の式を用いた、非線形フィッティングの結果、 $\Delta 7\text{M} + \text{M163I}$  変異体に対する $^3\text{H}$  diprenorphine の解離定数  $K_d$  を  $2.65 \pm 1.13 \text{ nM}$  と算出した。 $K_d$  値が野生型と同等であったことから、 $\text{M163I}$  変異体はリガンド結合活性を保持していると判断した。

一方、GDP-GTP 交換実験の結果、リガンド刺激非存在下 (ligand-free) においても、full agonist である DAMGO 結合状態と同程度の G タンパク質シグナル伝達活性を有していた (data not shown)。このことから、 $\text{M163I}$  変異体は constitutively active mutant (CAM) であることが示唆された。他の GPCR で同様の変異を導入することで CAM になるという報告はないが、Met163 を Ile に置換することで、TM7 に位置する Tyr338<sup>7.53</sup> の受容体コアへの移動、およびそれに続く TM5 に位置する Y254<sup>5.58</sup> の側鎖との水素結合、TM6 の受容体外側への移動が起りやすくなったために、constitutively active になったのではないかと考えた [35-38]。

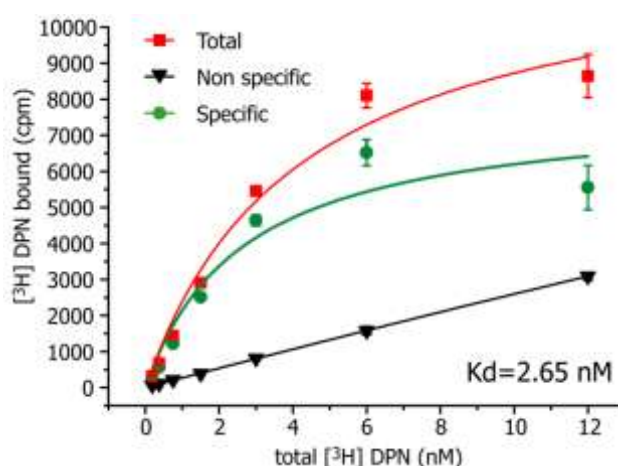


Fig. 3-24  $\text{M163I}$  変異体のリガンド結合活性の評価

$\text{M163I}$  変異体 (膜画分) を用いた $^3\text{H}$  diprenorphine 結合実験 (saturation binding assay)。フィッティングは、one site binding model の式 ( $y=B_{\max} \cdot x/(K_d+x)$ ) を用いた。

full agonist である DAMGO 結合状態、antagonist である naloxone 結合状態の順で、 $\Delta 7M + M163I$  変異体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトルを取得した。naloxone 結合状態では、 $\Delta 7M$  変異体のスペクトルと比較して、 $^1H$  2.06 ppm,  $^{13}C$  16.8 ppm 付近のシグナルが消失した。DAMGO 結合状態では、 $\Delta 7M$  変異体のスペクトルと比較して、3 個のシグナル (①  $^1H$  2.17 ppm,  $^{13}C$  18.4 ppm 付近のシグナル、②  $^1H$  1.95 ppm,  $^{13}C$  17.4 ppm 付近のシグナル、③  $^1H$  1.67 ppm,  $^{13}C$  17.2 ppm 付近のシグナル) が消失した (Fig. 3-25)。このことから、これらシグナルが M163 に由来するシグナルであると判断した。

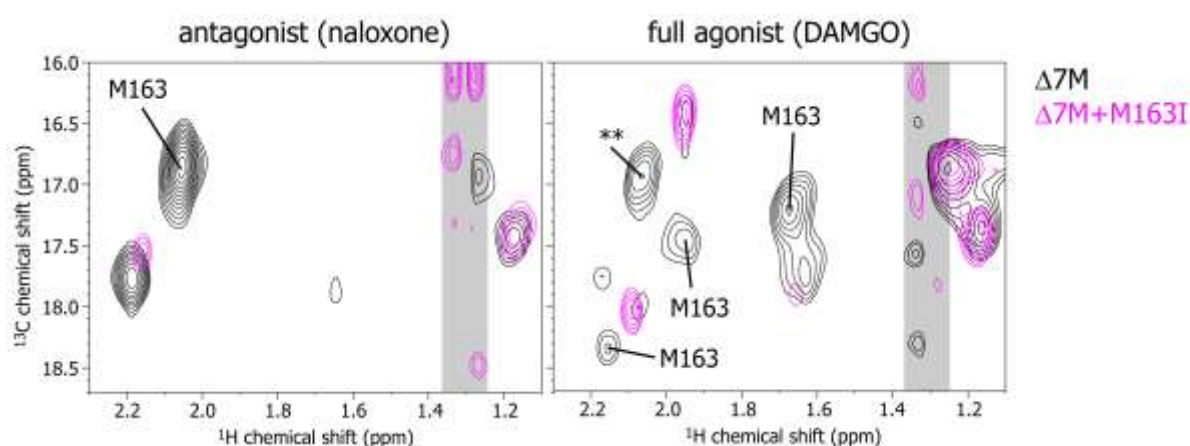


Fig. 3-25 M163 のメチオニンメチルシグナルの帰属

(左) antagonist (naloxone) 結合状態、(右) full agonist (DAMGO) 結合状態

$\Delta 7M$  変異体 (黒) および  $\Delta 7M + M163I$  変異体 (マゼンタ) の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトル

### 3.6.3. $M257^{5,61}$ のメチルシグナルの帰属

TM5 の細胞内領域に位置する  $M257^{5,61}$  のメチルシグナルの帰属を行うこととした。 $M163I$  変異体と同様に細胞内領域に変異を導入することで、受容体の活性へ影響することが懸念されることから、 $M257I$  変異体のリガンド結合活性 (膜画分)



と G タンパク質シグナル伝達活性 (rHDL) を評価した。

[<sup>3</sup>H] diprenorphine 結合実験の結果、調製したΔ7M + M257I 変異体に対し、添加した[<sup>3</sup>H] diprenorphine の濃度依存的に、Δ7M + M257I 変異体に結合した[<sup>3</sup>H] diprenorphine 量が増大し、その結合が飽和したことから、Δ7M + M257I 変異体と[<sup>3</sup>H] diprenorphine との特異的な結合を検出できたと判断した (Fig. 3-26)。one site binding model の式を用いた、非線形フィッティングの結果、Δ7M + M257I 変異体に対する[<sup>3</sup>H] diprenorphine の解離定数 K<sub>d</sub> を  $13.6 \pm 3.5$  nM と算出した。5 倍程度親和性が弱くなっているが問題はないと考え、Δ7M + M257I 変異体はリガンド結合活性を保持していると判断した。

また、GDP-GTP 交換実験の結果、M163I 変異体と同様、Δ7M + M163I/M257I 変異体では、リガンド刺激非存在下 (ligand-free) においても、full agonist である DAMGO 結合状態と同程度の G タンパク質シグナル伝達活性を有していた (data not shown)。このことから、M163I/M257I 変異体も constitutively active mutant (CAM) であることが示唆された。

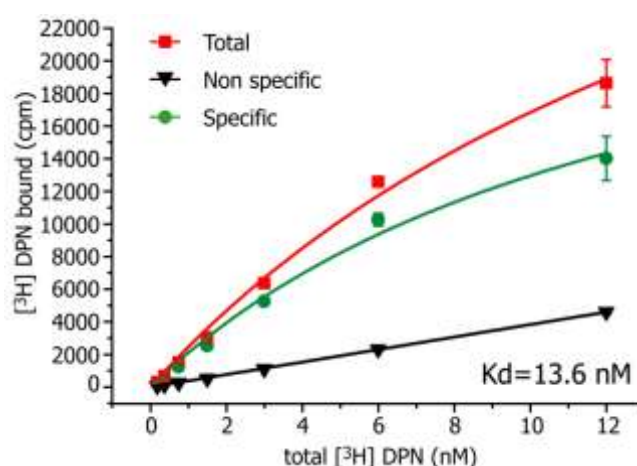


Fig. 3-26 M257I 変異体のリガンド結合活性の評価

M257I 変異体 (膜画分) を用いた[<sup>3</sup>H] diprenorphine 結合実験 (saturation binding assay)。フィッティングは、one site binding model の式 ( $y=B_{\max} \cdot x/(K_d+x)$ ) を用いた。

次に、full agonist である DAMGO 結合状態、antagonist である naloxone 結合状態の順で、 $\Delta 7M+M163I/M257I$  変異体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトルを取得した。naloxone 結合状態では、 $\Delta 7M+M163I$  変異体のスペクトルと比較して、消失したシグナルは存在しなかった (Fig. 3-27)。このことから、現状の測定条件では naloxone 結合状態の M257 のシグナルは観測されていないと判断した。一方、DAMGO 結合状態では、 $\Delta 7M+M163I$  変異体のスペクトルと比較して、 $^1H$  2.09 ppm,  $^{13}C$  18.1 ppm 付近のシグナルが消失した (Fig. 3-27)。このことから、このシグナルが M257 に由来するシグナルであると判断した。

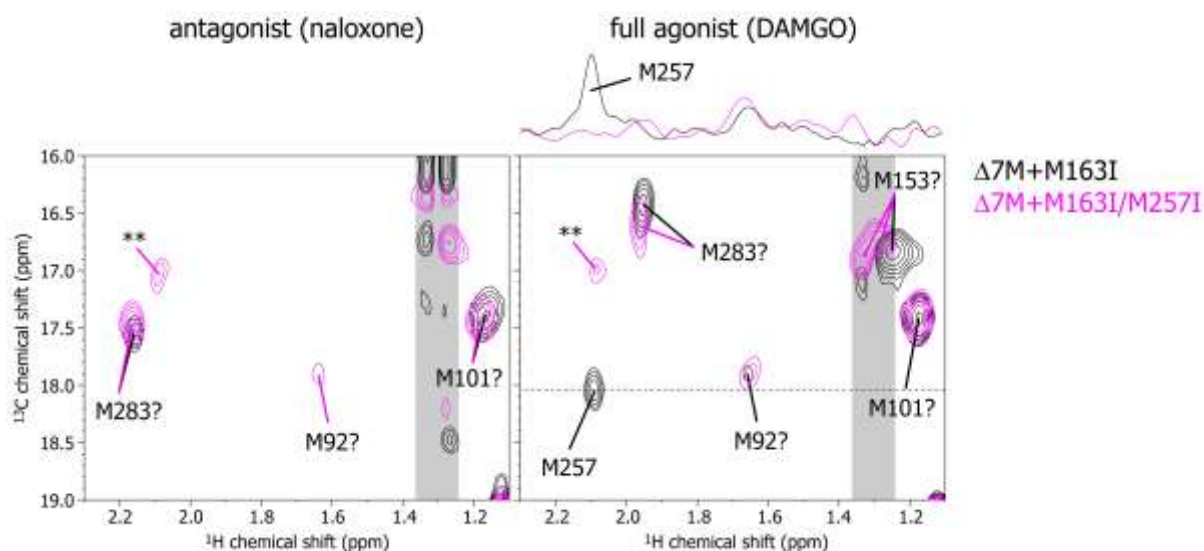


Fig. 3-27 M257 のメチオニンメチルシグナルの帰属

(左) antagonist (naloxone) 結合状態、(右) full agonist (DAMGO) 結合状態

$\Delta 7M+M163I$  変異体 (黒) および  $\Delta 7M+M163I/M257I$  変異体 (マゼンタ) の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトル

### 3.6.4. 他のメチオニン残基の帰属に関して

前節までの実験で、 $\Delta 6M$  変異体に存在する 7 個のメチオニン残基のうち、M163、M245、M257 のシグナルの帰属まで完了した。残る M92、M101、M153、M283 のシグナルの帰属についても、予備的な実験から暫定的にシグナルの帰属を行った (Fig. 3-28)。また、各メチオニン残基における、antagonist 結合状態と full agonist 結合状態との化学シフト差を算出した (Fig. 3-29)。その結果、立体構造上離れている M163 や M245、M283 において、その化学シフトが 0.2 ppm 以上異なっていることから、活性化に伴い、広範な領域において構造変化が生じていることが分かった。

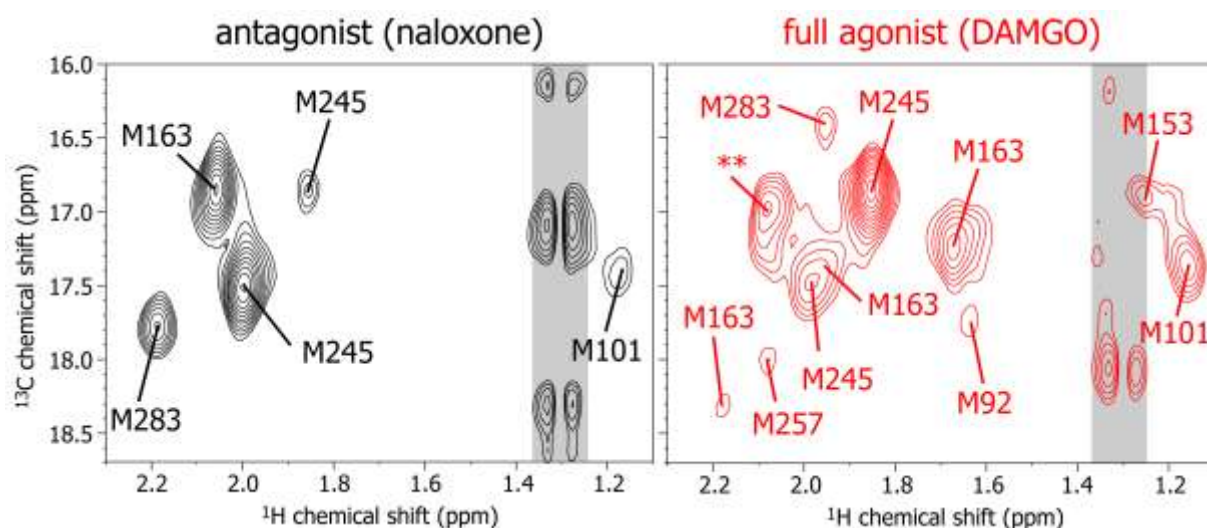


Fig. 3-28 [ $^2H$ -8AA, methyl- $^{13}C$  Met]  $\Delta 6M$  の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトル (帰属を含む)  
(右) naloxone (antagonist) 結合状態、(左) DAMGO (full agonist) 結合状態

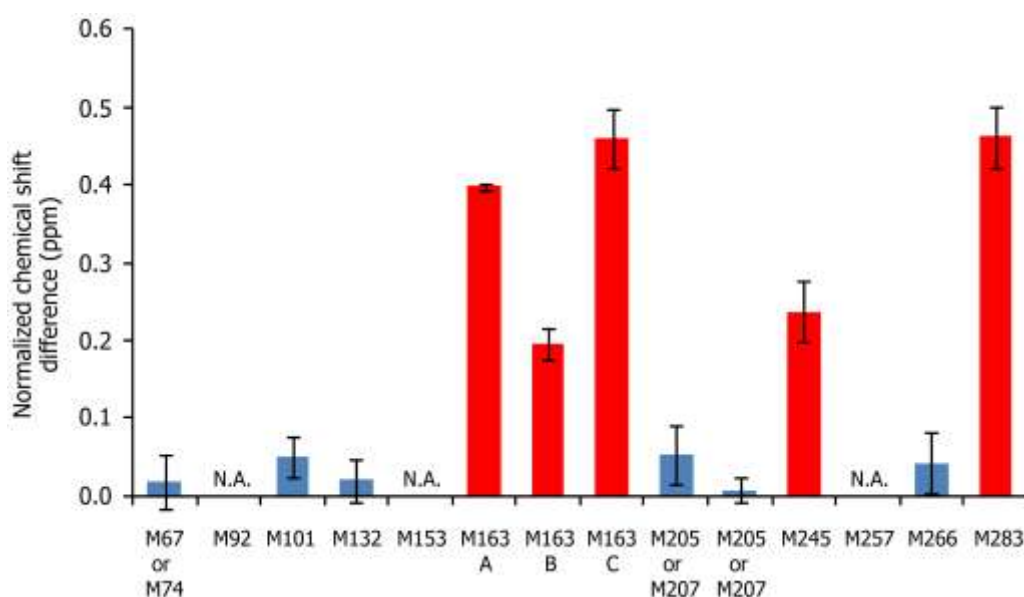


Fig. 3-29 antagonist 結合状態と full agonist 結合状態との間の化学シフト差解析  
 化学シフト差 $\Delta\delta$  は、 $\Delta\delta=[(\Delta\delta_{1H})^2+(\Delta\delta_{13C}/3.5)^2]^{0.5}$  の式を用いて計算した。また、エ  
 ラーバーについては、 $[\Delta\delta_{1H}R_{1H}+\Delta\delta_{13C}R_{13C}/(3.5)^2]/\Delta\delta$  の式を用いて計算した。 $R_{1H}$  お  
 よび  $R_{13C}$  は、それぞれ  $^1H$  方向および  $^{13}C$  方向のデジタル分解能 (ppm) である。

### 3.7. TM5 の膜貫通領域中腹に位置する M245<sup>5.49</sup> の構造変化

#### 3.7.1. antagonist および full agonist 結合状態の NMR 解析

まず、TM5 の膜貫通領域中腹に位置する M245<sup>5.49</sup> の側鎖メチル基のシグナルの、リガンド依存的な変化に関して解析した。

M245<sup>5.49</sup> の次のアミノ酸残基は P246<sup>5.50</sup> で、この残基は、 $\beta_2AR$  では P211<sup>5.50</sup> に対応している。序論で述べたように、活性化状態の構造が明らかになっている  $\beta_2AR$  では、P211 および GPCR 間での保存性が高い残基 (P<sup>5.50</sup>, I<sup>3.40</sup>, F<sup>6.44</sup>, P/I/F モチーフ) が、活性化に伴う細胞内領域の構造変化の引き金となると考えられている (Fig. 3-30A) [39]。この一連の残基は、 $\mu OR$  でも良く保存されているため、M245<sup>5.49</sup> はリガンド依存的な構造変化を反映し得る残基であることが示唆された (Fig. 3-30B)。

また、不活性化状態の  $\mu$ OR の結晶構造における M245 近傍の構造から、活性化に伴い、M245 と F241 の側鎖の配向が変化し、 $^1\text{H}$  の化学シフトが変化することが示唆された (Fig. 3-31)。

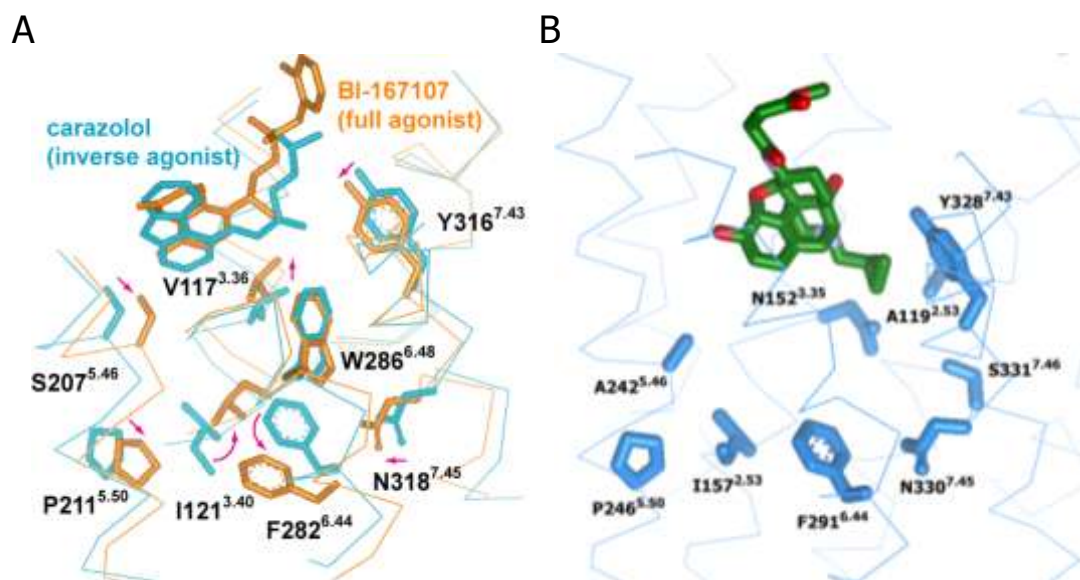


Fig. 3-30 リガンド結合部位周辺の各アミノ酸残基の側鎖配向

(A)  $\beta_2\text{AR}$ 。inverse agonist である carazolol が結合した不活性化状態の構造をシアンで、full agonist である BI-167107 が結合した活性化状態の構造をオレンジで示す。  
(B)  $\mu\text{OR}$ 。antagonist である  $\beta\text{-FNA}$  が結合した不活性化状態の構造を青で示す。

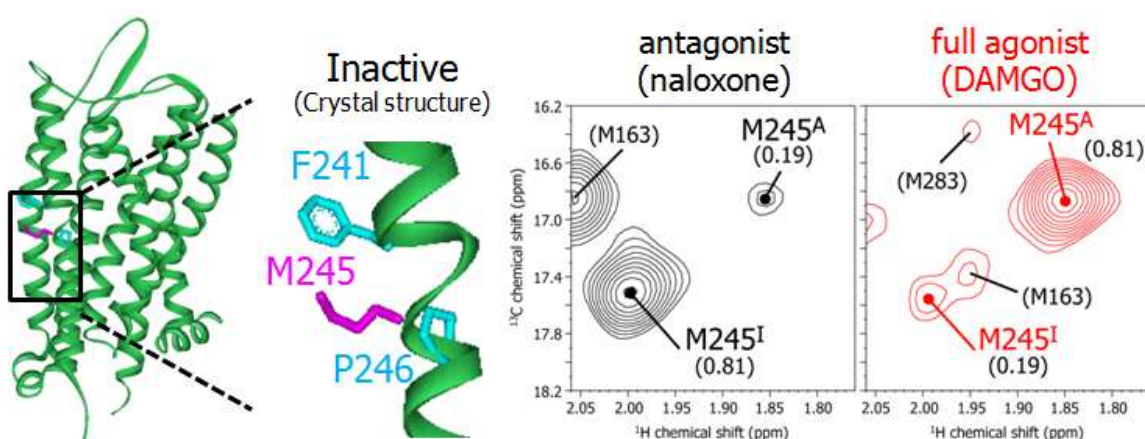


Fig. 3-31 不活性化状態の  $\mu\text{OR}$  の構造における、TM5 の膜貫通領域に位置する F241 および M245、P246 の側鎖配向 (左) と antagonist (黒) および full agonist (赤) 結合状態の  $\Delta 6\text{M}$  変異体の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル (M245 のシグナル近傍を拡大) (右)



実際に観測された antagonist、full agonist 結合状態の M245 に由来するシグナルに関して、いずれのリガンド結合状態においても、M245 に由来するシグナルが 2 個観測され、それぞれ低磁場側と高磁場側のシグナルの強度が大きいことが分った (Fig. 3-31)。以上の結果から、antagonist 結合状態および full agonist 結合状態で主に観測された低磁場側および高磁場側のシグナルは、 $\beta_2$ AR の結晶構造で示されたように細胞内領域が閉じた不活性化状態と細胞内領域が開いた活性化状態の構造に対応すると考えた。以降、これらシグナルをそれぞれ M245<sup>I</sup>、M245<sup>A</sup> と呼ぶこととした。

### 3.7.2. partial agonist 結合状態の NMR 解析

partial agonist である morphine を添加して、 $\Delta 6$ M 変異体の NMR スペクトルを取得した。partial agonist 結合状態では、M245<sup>I</sup> に対応する化学シフトのシグナルと M245<sup>A</sup> に対応する化学シフトのシグナルが同程度の強度で観測された (Fig. 3-32)。

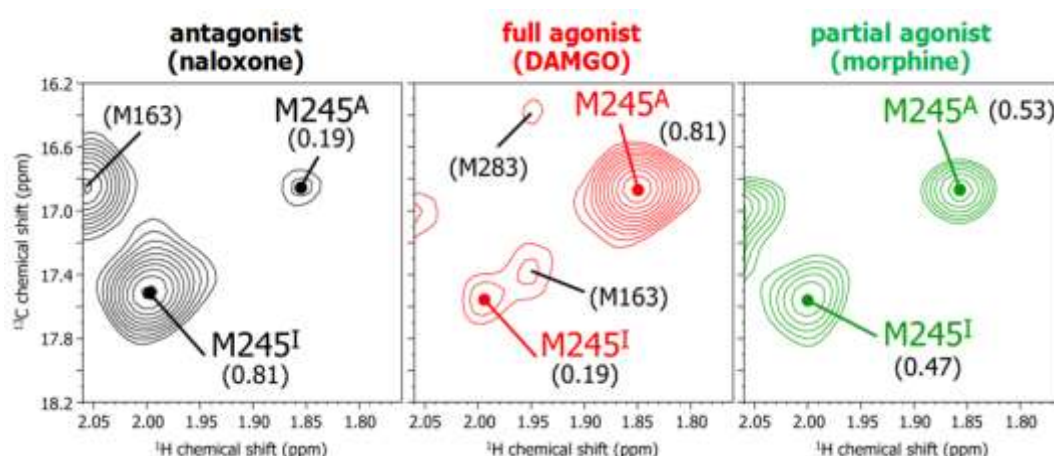


Fig. 3-32 antagonist (黒) および full agonist (赤) 結合状態、partial agonist (緑) 結合状態の  $\Delta 6$ M 変異体の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル (M245 のシグナル近傍を拡大)

### 3.7.3. G protein biased partial agonist 結合状態の NMR 解析

G タンパク質シグナルを選択的に活性化する partial agonist である TRV130 を添加して、 $\Delta 6M$  変異体の NMR スペクトルを取得した。G タンパク質を選択的に活性化する partial agonist 結合状態では、partial agonist 結合状態と同様に、2 個のシグナルが同程度の強度で観測された (Fig. 3-33)。しかしながら、いずれのシグナルにおいても、partial agonist である morphine 結合状態と G タンパク質を選択的に活性化する partial agonist である TRV130 結合状態とで化学シフトが異なっていた。以降、それぞれのシグナルを M245<sup>I</sup> および M245<sup>A1</sup> と呼ぶこととした。

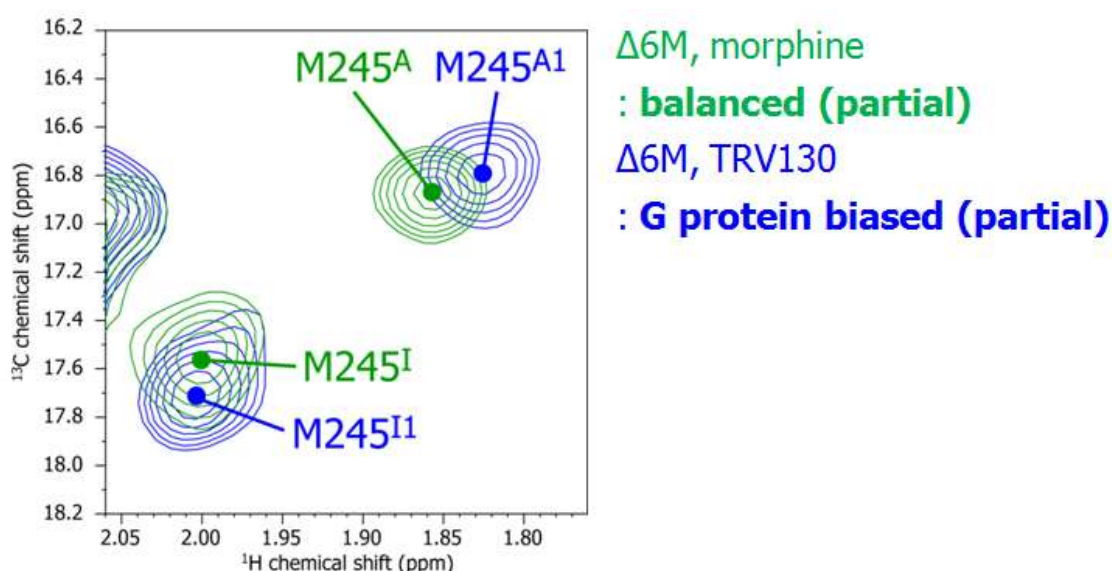


Fig. 3-33 partial agonist (緑) 結合状態および G タンパク質を選択的に活性化する partial agonist (青) 結合状態の  $\Delta 6M$  変異体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトル (M245 のシグナル近傍を拡大)

### 3.7.4. アレスチンをより活性化する N152A 変異体の NMR 解析

アレスチンシグナルをより活性化する N152A 変異体に full agonist である DAMGO を添加して、NMR スペクトルを取得した。その結果、full agonist 結

合状態に対応する高磁場側のシグナルのみが観測された (Fig. 3-34)。また、そのシグナルの化学シフトは、G タンパク質を選択的に活性化する **partial agonist** 結合状態で観測された M245<sup>A1</sup> および **partial agonist** 結合状態で観測された M245<sup>A</sup> と連続していた。以降、このシグナルを M245<sup>A2</sup> と呼ぶこととした。

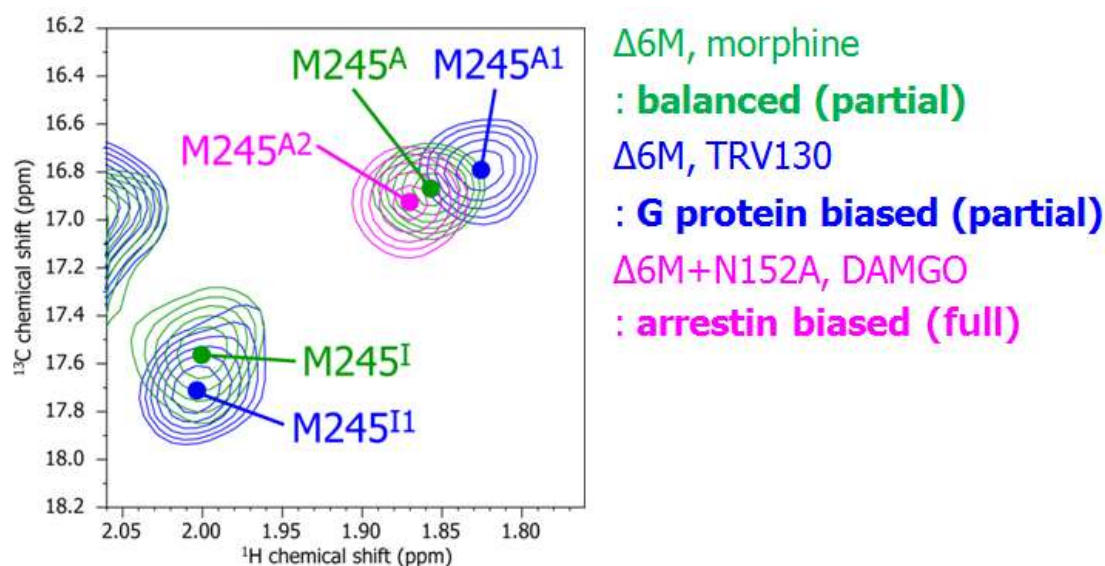


Fig. 3-34 partial agonist (緑) 結合状態および G タンパク質を選択的に活性化する partial agonist (青) 結合状態の Δ6M 変異体と full agonist である DAMGO が結合した N152A 変異体の <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC スペクトル (M245 のシグナル近傍を拡大)

### 3.8. TM3 の膜貫通領域中腹に位置する M163<sup>3,46</sup> の構造変化

#### 3.8.1. antagonist および full agonist 結合状態の NMR 解析

TM3 の細胞内領域に位置する M163<sup>3,46</sup> の側鎖メチル基のシグナルの、リガンド依存的なシグナル変化に関して考察する。

不活性化状態の μOR の結晶構造における M163 近傍の構造から、M163 は、GPCR 間によく保存され、活性化に伴い構造変化することが知られている NPxxY モ



チーフの Y338 やそれと水素結合する TM5 の Y254 の側鎖の配向の変化により、化学シフトが変化することが示唆された (Fig. 3-35)。このことから、M245<sup>5,49</sup> と同様に、M163<sup>3,46</sup> はリガンド依存的な構造変化を反映し得る残基であると考えた。

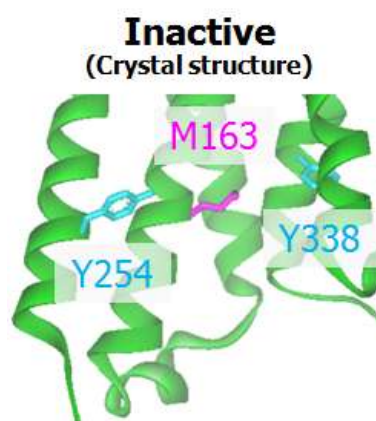


Fig. 3-35 不活性化状態の  $\mu$ OR の構造における、TM5 の膜貫通領域に位置する Y254 および TM3 に位置する M163、TM7 の NPxxY モチーフに位置する Y338 の側鎖配向

full agonist である DAMGO 結合状態では、M163 の二面角が *gauche* 型から *gauche/trans* 型に変化し、主に Y338<sup>7,53</sup> からの環電流効果を受け、プロトンの化学シフトが高磁場側に観測される 2 個のシグナル（高磁場側のシグナルから、M163(A)、M163(B) とする）と M163 の二面角が *gauche* 型から *trans* 型に変化し、主に Y338<sup>7,53</sup> からの環電流効果を受け、プロトンの化学シフトが低磁場側に観測される 1 個のシグナル（M163(C) とする）の計 3 個のシグナルが観測された (Fig. 3-36)。

以上の結果から、antagonist 結合状態および full agonist 結合状態で観測されたシグナルは、 $\beta_2$ AR の結晶構造で示されたように細胞内領域が閉じた不活性化状態と細胞内領域が開いた活性化状態の構造に対応すると考えた。

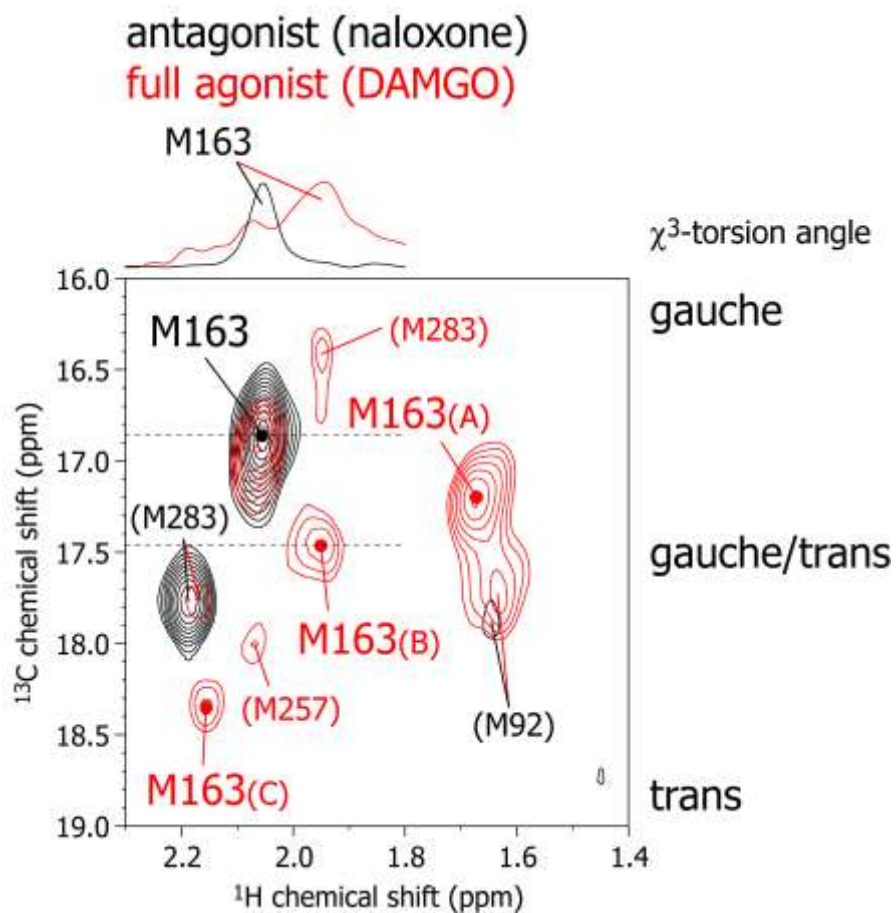


Fig. 3-36 antagonist (黒) および full agonist (赤) 結合状態の  $\Delta 7\text{M}$  変異体の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル

### 3.8.2. partial agonist 結合状態の NMR 解析

partial agonist である morphine を添加して、 $\Delta 7\text{M}$  変異体の NMR スペクトルを取得した。partial agonist 結合状態では、不活性化状態に対応する化学シフトのシグナル 1 個と活性化状態に対応する化学シフトのシグナル 4 個、計 5 個のシグナルが観測された (Fig. 3-37)。

### 3.8.3. G protein biased partial agonist 結合状態の NMR 解析

G タンパク質シグナルを選択的に活性化する partial agonist である TRV130 を添加して、 $\Delta 7M$  変異体の NMR スペクトルを取得した。G タンパク質を選択的に活性化する partial agonist 結合状態では、partial agonist 結合状態と同様に、5 個のシグナルが観測された (Fig. 3-37)。また、活性化状態に対応する化学シフトのシグナル (M163(A), M163(B), M163(C))、いずれにおいても、partial agonist である morphine 結合状態と G タンパク質を選択的に活性化する partial agonist である TRV130 結合状態とで化学シフトが異なっていた。さらに、活性化状態に対応する M163(B) のシグナルが、G タンパク質を選択的に活性化する partial agonist である TRV130 結合状態では先鋭化していた。

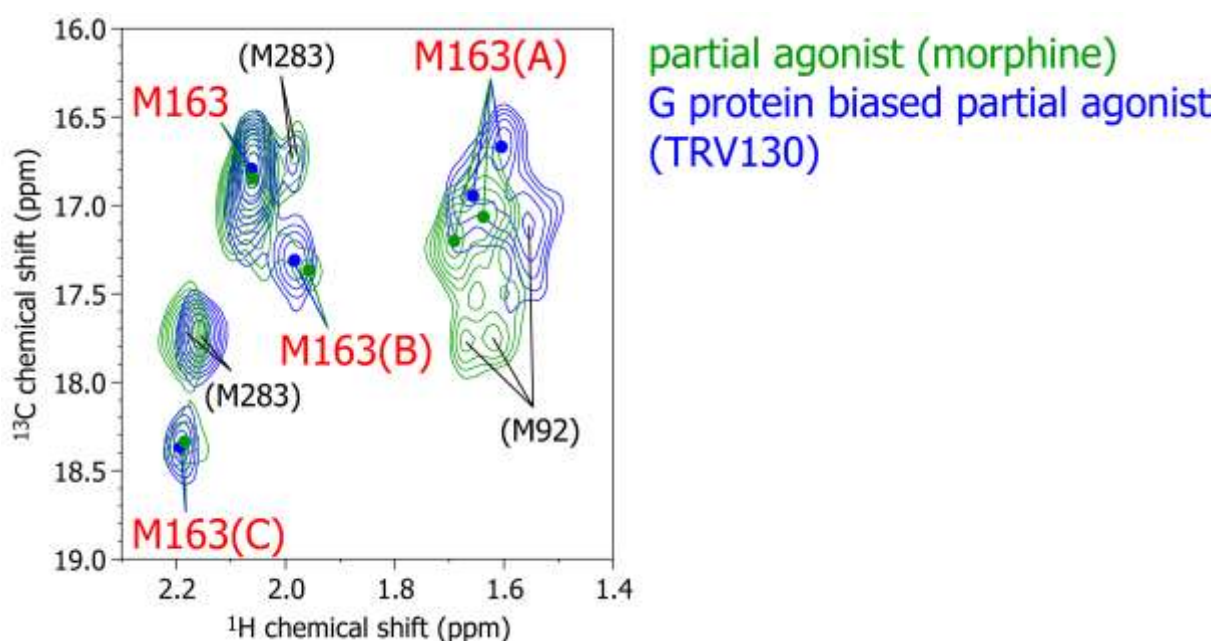


Fig. 3-37 partial agonist (緑) および G protein biased partial agonist (青) 結合状態の  $\Delta 7M$  変異体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトル

### 3.8.4. アレスチンをより活性化する N152A 変異体の NMR 解析

アレスチンシグナルをより活性化する N152A 変異体に full agonist である DAMGO を添加して、NMR スペクトルを取得した。その結果、活性化状態に対応するシグナル 3 個が観測された (Fig. 3-38)。但し、M163(B) に対応するシグナルは、観測されなかった。観測された 3 個のシグナルの化学シフトは、G タンパク質を選択的に活性化する partial agonist 結合状態で観測されたシグナルおよび partial agonist 結合状態で観測されたシグナルと連続していた。

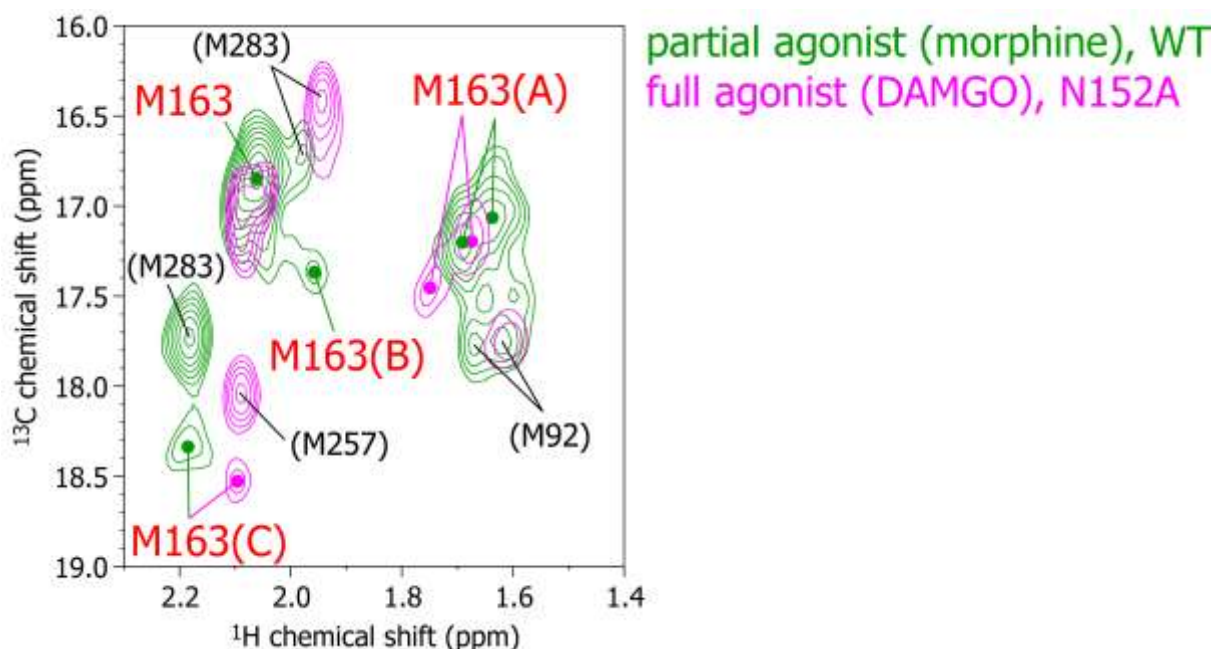


Fig. 3-38 partial agonist 結合状態の  $\Delta 7\text{M}$  変異体 (緑) と full agonist 結合状態の D7M+N152A 変異体 (マゼンタ) の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル

## 第 4 章 考察

本研究では、rHDL の再構成脂質二重膜中に再構成した  $\mu$ OR を用いて、各リガンド結合状態の G タンパク質シグナル伝達およびアレスチンシグナル伝達の efficacy および bias factor を定量的に評価した。また、8 種類のアミノ酸の重水素化、およびメチオニン残基の側鎖メチル基を選択的に [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] 標識した  $\mu$ OR の NMR 解析を行い、 $\mu$ OR の M163 および M245 のリガンド依存的なシグナルの変化を観測することに成功した。本研究の NMR 解析で用いた  $\mu$ OR は、3.1. 節および 3.2. 節、3.3 節で述べたように、rHDL に再構成した野生型  $\mu$ OR と同等のリガンド親和性および G タンパク質シグナル伝達活性を有しており、また、25 °C、24 時間の NMR 条件でも安定性を保持している。

### 4.1. 不活性化状態および活性化状態における $\mu$ OR の動的構造

antagonist である naloxone 結合状態および full agonist である DAMGO 結合状態の  $\mu$ OR の NMR 解析の結果、TM3 の細胞内領域に位置する M163 や TM5 の膜貫通領域中腹に位置する M245、TM6 の細胞内領域に位置する M283 において、antagonist 結合状態と full agonist 結合状態とで化学シフトが異なっていた (Fig. 3-28)。

TM5 の膜貫通領域中腹に位置する M245<sup>5,49</sup> の側鎖メチル基のシグナルに着目すると、いずれのリガンド結合状態においても、M245 に由来するシグナルが 2 個観測されており、antagonist 結合状態と full agonist 結合状態ではそれぞれ低磁場側と高磁場側のシグナルの強度が大きかった。

序論でも述べたように、不活性化状態と活性化状態の  $\beta_2\text{AR}$  の結晶構造の比

較および我々が行った NMR 解析から、活性化に伴い、TM5、6 の細胞内領域が受容体外側に大きく開き、DRY モチーフや P/I/F モチーフ、NPxxY モチーフに存在する各アミノ酸残基の側鎖配向が大きく変化することが明らかとなっている [6, 7, 11]。これらモチーフは  $\mu$ OR を含む GPCR で広く保存されていることから、 $\mu$ OR においても、活性化に伴い、 $\beta_2$ AR と同様の構造変化が生じていると考えられる。実際に、3.3. 節で述べたように、antagonist 結合状態では、ほとんどシグナル伝達が活性化されないのに対し、full agonist 結合状態では、他のリガンドよりも強くシグナル伝達が活性化されており、活性化に伴い細胞内領域が大きく開いていることを示唆している。また、 $\mu$ OR の M163<sup>3.46</sup> は、NPxxY モチーフ近傍に、M245<sup>5.49</sup> は P/I/F モチーフ近傍に位置していることから、これら残基は活性化に伴い構造変化すると考えられる残基である。

このことから、antagonist 結合状態で主に観測された M245 に由来する低磁場側のシグナルは、細胞内領域が閉じた不活性化状態を、full agonist 結合状態で主に観測された M245 に由来する高磁場側のシグナルは、細胞内領域が開いた活性化状態を反映していると考えた。

また、TM3 の細胞内領域に位置する M163<sup>3.46</sup> の側鎖メチル基のシグナルに着目すると、full agonist 結合状態において、M163 に由来するシグナルが 3 個と複数個観測され、そのうちの 1 個はシグナルの広幅化が観測された (Fig. 3-36)。このことは、我々が行った  $\beta_2$ AR の NMR 解析において、TM5 の細胞内領域に位置する M215 や TM6 の細胞内領域に位置する M279 に由来するシグナルが、full agonist 結合状態で広幅化することと対応していた (Fig. 1-12)。以上の結果から、活性化状態の  $\mu$ OR において、複数のコンフォメーション間の動的構造平衡にあることが示唆された。

## 4.2. partial agonist 結合状態における $\mu$ OR の動的構造

partial agonist である morphine 結合状態の  $\mu$ OR の NMR 解析の結果、M245 に由来するシグナルに関して、不活性化状態と活性化状態に対応する化学シフトのシグナルが同程度の強度で観測された。また、M163 に由来するシグナルに関しても、不活性化状態に対応するシグナル (1 個) と活性化状態に対応するシグナル (4 個) が観測された。また、不活性化状態と活性化状態に対応するシグナルの化学シフト差は、M245 に由来するシグナルでは、0.24 ppm (190 Hz) 程度、M163 に由来するシグナルでは、0.40 ppm (320 Hz) 程度 (A)、0.19 ppm (150 Hz) 程度 (B)、0.46 ppm (370 Hz) 程度 (C)、M283 に由来するシグナルでは、0.46 ppm (370 Hz) 程度であった (Fig. 3-36)。以上の結果から、 $\mu$ OR が不活性化状態と活性化状態の 2 状態の間を化学シフト差 (周波数差、200~350 Hz) よりも遅い速度で交換しており、リガンドごとに各状態の量比が異なっていることが示唆された。

また、Fig. 4-2 には、各アゴニストを添加した時の  $G\alpha i3$  への [ $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S 結合量を横軸に、不活性化状態 (M245<sup>I</sup>) のシグナル強度と活性化状態 (M245<sup>A</sup>) のシグナル強度の和に対する活性化状態 (M245<sup>A</sup>) のシグナル強度の割合 ( $=100 \times I_A / (I_A + I_I)$ ) を縦軸にプロットしたものを示す。このように、リガンドの G タンパク質活性が増大するにつれて、活性化状態の量比が増大した。

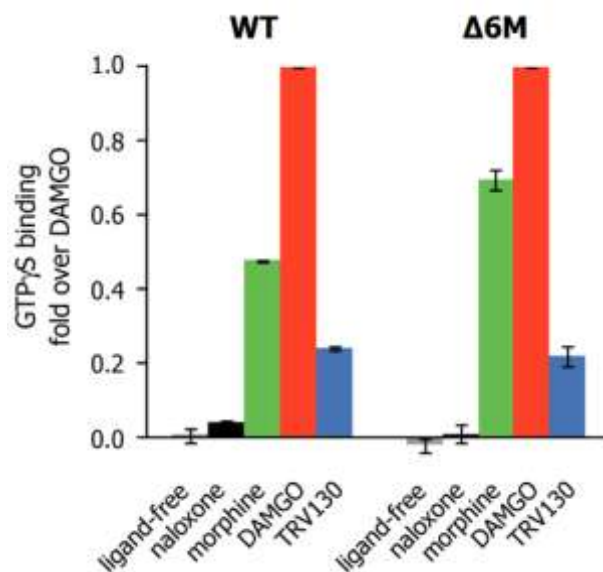


Fig. 4-1  $\Delta$ 6M 変異体の G タンパク質シグナル伝達活性  
(左) 野生型、(右)  $\Delta$ 6M 変異体。各アゴニスト添加時の G $\alpha$ i3 への $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S の結合量を、DAMGO 存在下のデータを 1 として規格化した結果 (N=3)

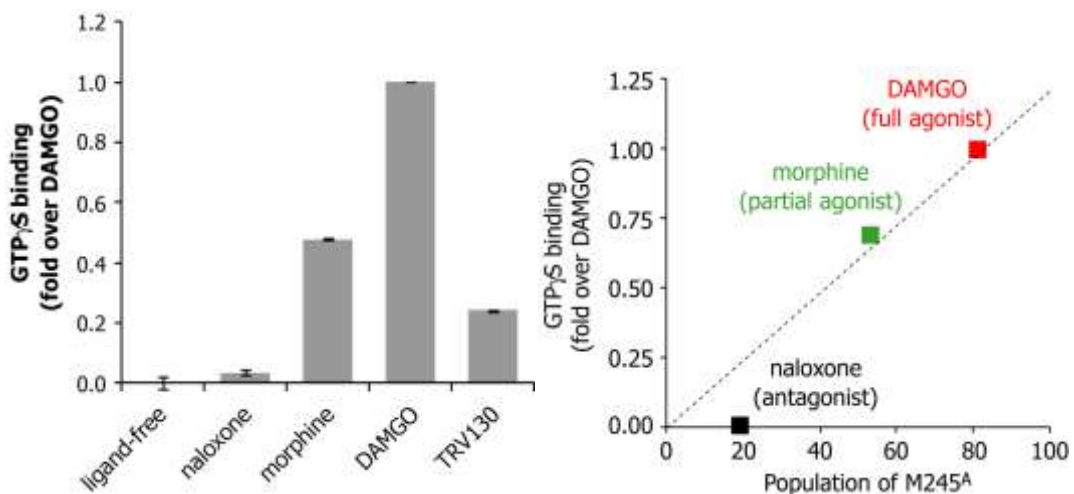


Fig. 4-2 M245<sup>A</sup> の存在割合とシグナル伝達活性との対応  
(左) GDP-GTP 交換実験 (再掲)。G $\alpha\beta\gamma$  のみを添加した時の G $\alpha$ i3 への $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S の結合量を差し引いた後、DAMGO を添加した時の G $\alpha$ i3 への $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S の結合量を 1 と規格化した時の、各アゴニスト添加時の G $\alpha$ i3 への $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S の結合量の結果 (N=3)。  
(右) 各アゴニストを添加した時の G $\alpha$ i3 への  $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S 結合量と、不活性化状態 (M245<sup>I</sup>) のシグナル強度と活性化状態 (M245<sup>A</sup>) のシグナル強度の和に対する活性化状態 (M245<sup>A</sup>) のシグナル強度の割合との相関。



以上の結果をあわせ、balanced ligand 結合状態における  $\mu$ OR の動的構造についてまとめる。morphine や DAMGO などのアゴニストが結合すると、活性化状態の  $\beta_2$ AR の結晶構造で見られているように、細胞内領域が大きく開く構造変化が誘起され、G タンパク質やアレスチンなどの細胞内エフェクター分子との相互作用が可能となる。また、細胞内領域が閉じた不活性化状態と細胞内領域が開いた活性化状態との平衡状態にあり、リガンド毎に活性化状態の存在割合が異なっている (Fig. 4-3)。この活性化状態の存在割合が、各リガンドのシグナル伝達の efficacy を決定しているという機構を提唱する。このような、細胞内領域が閉じた状態と開いた状態を、数ミリ秒よりも遅い速度で交換しており、アゴニストの結合に伴い GPCR がミリ秒程度のタイムスケールで活性化することと概ね対応している [40, 41] が、今後は、rHDL などのより生理的環境に近い条件で、交換速度を解析する必要があると考えた [14, 42]。

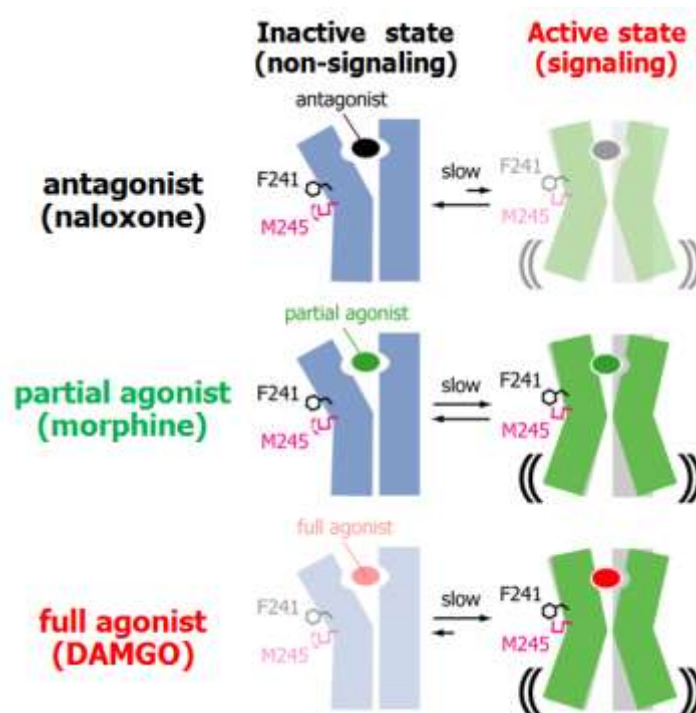


Fig. 4-3 balanced ligand 結合状態の  $\mu$ OR の動的構造平衡の模式図

いずれのリガンド結合状態においても、シグナルを流さない不活性化状態とシグナルを流す活性化状態との構造平衡にある。リガンドごとに、活性化状態の存在割合が異なっている。また、活性化状態は、複数のコンフォメーション間の動的平衡にある。

### 4.3. biased ligand 結合状態における $\mu$ OR の動的構造

TM5 の膜貫通領域中腹に位置する M245<sup>5,49</sup> の側鎖メチル基のシグナルに着目すると、G protein biased partial agonist である TRV130 結合状態の  $\mu$ OR では、partial agonist 結合状態と同様、2 個のシグナルが同程度の強度で観測された。しかしながら、いずれのシグナルにおいても、partial agonist 結合状態とは化学シフトが異なっていた。full agonist である DAMGO 結合状態の N152A 変異体では、活性化状態に対応する高磁場側のシグナルのみが観測された。このことは、N152A 変異導入によりシグナル伝達活性が増大することと対応していた (Fig. 3-12)。また、そのシグナルの化学シフトは、TRV130 結合状態で観測された M245<sup>A1</sup> および morphine 結合状態で観測された M245<sup>A</sup> と連続していた。A1 状態と A2 状態に対応するシグナルの化学シフト差は、0.06 ppm (50 Hz) 程度であり、データポイント数から見積もられる分解能よりも大きかった。以上の結果から、 $\mu$ OR が A1 状態と A2 状態の 2 状態の間を、化学シフト差 (周波数差、~100 Hz) よりも速い速度、すなわちミリ秒程度の速度で交換していることが示唆された。

Fig. 4-4 に、3.3.4 節で算出した bias factor を縦軸に、M245 (Fig. 4-4 左) に由来する化学シフトから算出した活性化状態 (A1 状態および A2 状態) に対する A2 状態の存在割合を横軸にプロットしたものを示す。両者はよく相関していた。このことから、A1 状態は G タンパク質をより活性化する状態、A2 状態はアレスチンをより活性化する状態であることが示唆された。より詳細に考察すると、活性化状態 (A1 状態および A2 状態) の存在割合が G タンパク質シグナル活性に、A2 状態の存在割合がアレスチンシグナル活性に対応していることから、A1 状態および A2 状態が G タンパク質を活性化し、A2 状態がアレスチンを活性化することが示唆された。

TM3 の細胞内領域に位置する M163<sup>3,46</sup> の側鎖メチル基のシグナルに着目すると、G protein biased partial agonist である TRV130 結合状態の  $\mu$ OR では、不

活性化状態と活性化状態に対応するシグナルがそれぞれ 1 個と 4 個観測され、full agonist である DAMGO 結合状態の N152A 変異体では、活性化状態に対応するシグナルが 3 個観測された。以降、TRV130 が結合した  $\mu$ OR および N152A 変異体の活性化状態をそれぞれ A1 状態と A2 状態とする。A1 状態、A2 状態いずれの状態においても、balanced agonist である DAMGO や morphine が結合した  $\mu$ OR の活性化状態（以降、A 状態とする）のシグナルとは、化学シフトが異なっており、かつ A1 状態、A 状態、A2 状態のシグナルの化学シフトは連続していた (Fig. 3-32, 3-37, 3-38)。また、 $^1\text{H}$  1.95 ppm,  $^{13}\text{C}$  17.5 ppm の M163 に由来するシグナルが、A1 状態では先鋭化し、A2 状態では観測されなくなった (Fig. 3-37, 3-38)。

これら複数存在する M163 に由来するシグナルのうち、TRV130 結合状態と N152A 変異体とで化学シフトが大きく異なっていた M163 (A) ( $\Delta\delta=0.19$  ppm) (Fig. 3-38) に由来する化学シフトから算出した活性化状態 (A1 状態および A2 状態) に対する A2 状態の存在割合と 3.3.4 節で算出した bias factor も良い相関を示した (Fig. 4-4 右)。

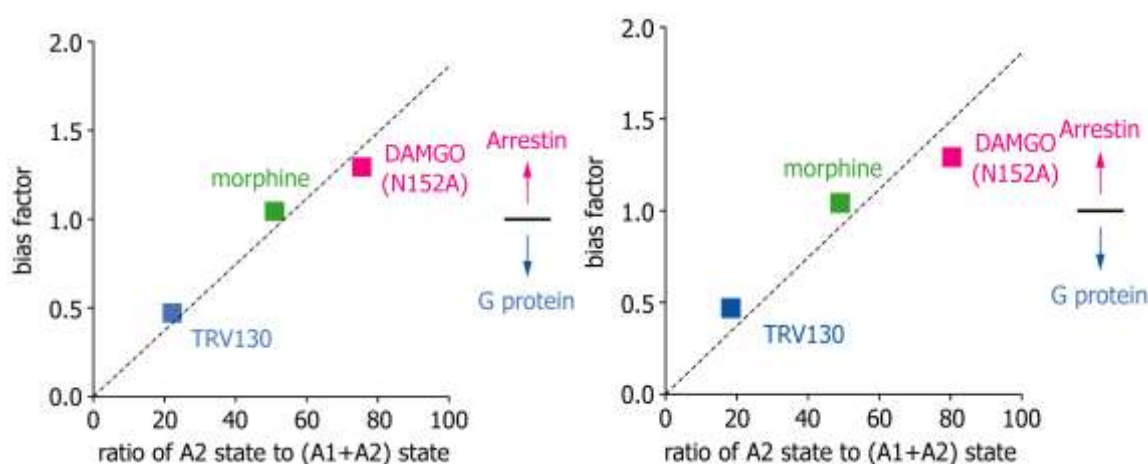


Fig. 4-4 M245 (左) および M163 (右) における A2 状態の存在割合と bias factor との対応

各状態における bias factor と、化学シフトから算出した活性化状態 (A1 状態および A2 状態) に対する A2 状態の存在割合との相関。

Fig. 4-5 には、M163 および M245 に由来するシグナルにおける、不活性化状態と A1 状態、不活性化状態と A2 状態の化学シフト差のプロットを示す。先ほどと同様 M163 (A) と M245 に由来するシグナルに着目すると、A2 状態では A1 状態と比べて不活性化状態との化学シフト差が小さいことから、A1 状態と比べて A2 状態では、TM3 および TM5、TM7 の細胞内領域はわずかに閉じていることが示唆された。G タンパク質が結合した  $\beta_2$ AR の結晶構造 (PDB code : 3SN6) では、細胞内領域が大きく開き (TM6 の細胞内領域が受容体コアから 14 Å 程度外側にシフトし)、アレスチンのフィンガーloop領域のペプチドが結合したオプシンの構造 (PDB code : 4PXF) では、細胞内領域が中程度開いている (TM6 の細胞内領域が受容体コアから 6-7 Å 外側にシフトしている) [6, 8]。以上の結果から、A1 状態は G タンパク質を活性化するのに有利な構造をとり、A2 状態はアレスチンを活性化するのに有利な構造をとっていることが示唆された (Fig. 4-6)。A2 状態に対応する上述のオプシンの結晶構造において、GRK のドッキングサイトと相互作用する部位の近傍に位置する Thr251<sup>6,36</sup> の主鎖カルボニル炭素と、リン酸化部位に近い Helix8 に位置する Leu321 の主鎖カルボニル炭素との距離は約 29 Å である。この距離は、受容体の TM5 および TM6 を繋ぐ ICL3 と相互作用する GRK のドッキングサイト (N 末端ヘリックス ( $\alpha$ N) の C 末端に位置する Ser30 の主鎖カルボニル炭素) と、リン酸化反応を触媒する Small Lobe と Large Lobe を繋ぐ GRK のヒンジ領域 (Ile481 の主鎖カルボニル炭素) との距離が 26 Å と概ね対応していた。したがって、A2 状態がリン酸化反応を進行する上でも有利な構造であると考えた [43]。また、 $\beta_2$ AR を用いた分子動力学計算において、活性化状態の  $\beta_2$ AR が、今回想定した全体構造 (Fig. 4-5) の間を交換していることを示唆するデータが報告されている [44]。

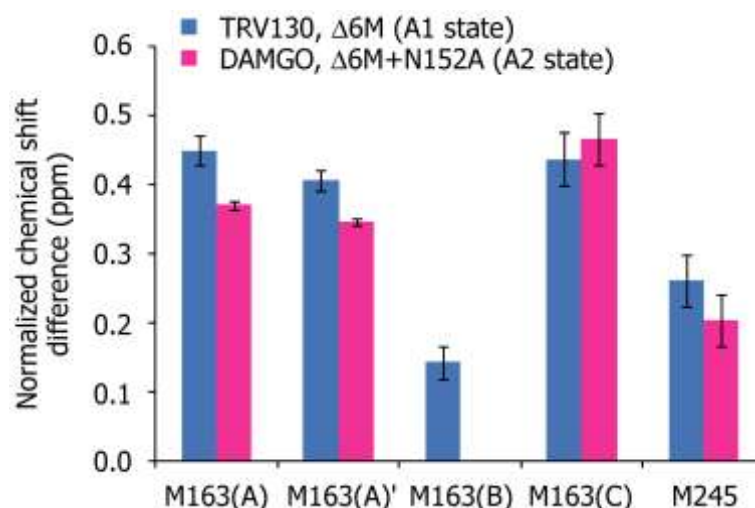


Fig. 4-5 不活性化状態と A1 状態および不活性化状態と A2 状態との間の化学シフト差解析  
 化学シフト差 $\Delta\delta$  は、 $\Delta\delta=[(\Delta\delta_{1H})^2+(\Delta\delta_{13C}/3.5)^2]^{0.5}$  の式を用いて計算した。また、エラーバーについては、 $[\Delta\delta_{1H}R_{1H}+\Delta\delta_{13C}R_{13C}/(3.5)^2]/\Delta\delta$  の式を用いて計算した。 $R_{1H}$  および  $R_{13C}$  は、それぞれ  $^1H$  方向および  $^{13}C$  方向のデジタル分解能 (ppm) である。

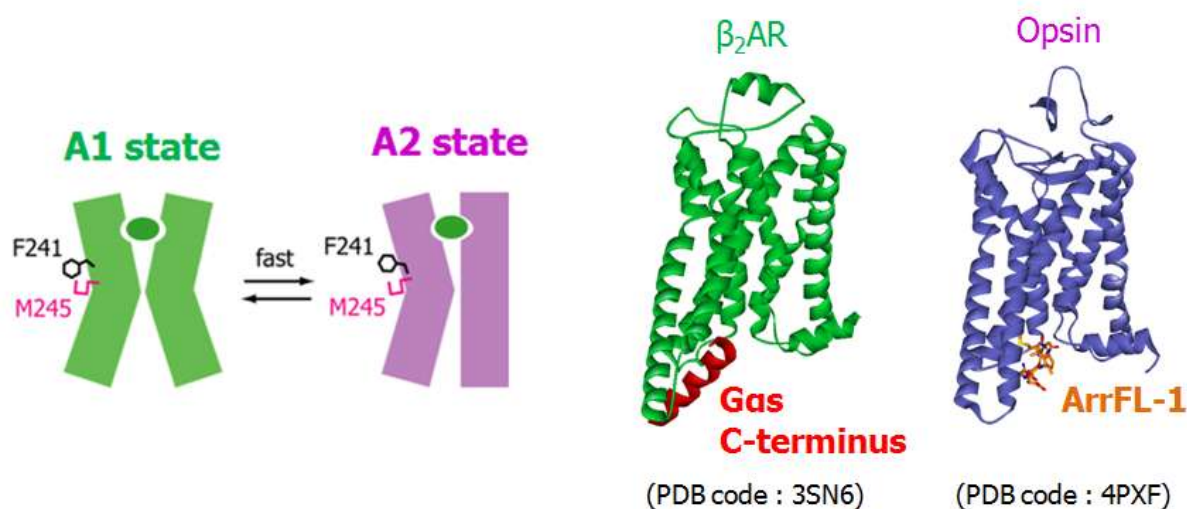


Fig. 4-6 A1 状態および A2 状態の模式図と各状態において想定される全体構造

以上の結果をあわせ、biased ligand 結合状態における  $\mu$ OR の動的構造についてまとめる。活性化状態の  $\mu$ OR において、細胞内領域が大きく開き、G タンパク質をより活性化する A1 状態と、細胞内領域が中程度開き、アレスチンをより活性

化する A2 状態の 2 状態の間を、速いタイムスケールで交換している (Fig. 4-7)。  
 TRV130 などの biased agonist は、この動的構造平衡に変調を与え、A1 状態と A2 状態の量比を変化させることで、シグナルの選択性を発揮しているという機構を提唱する。

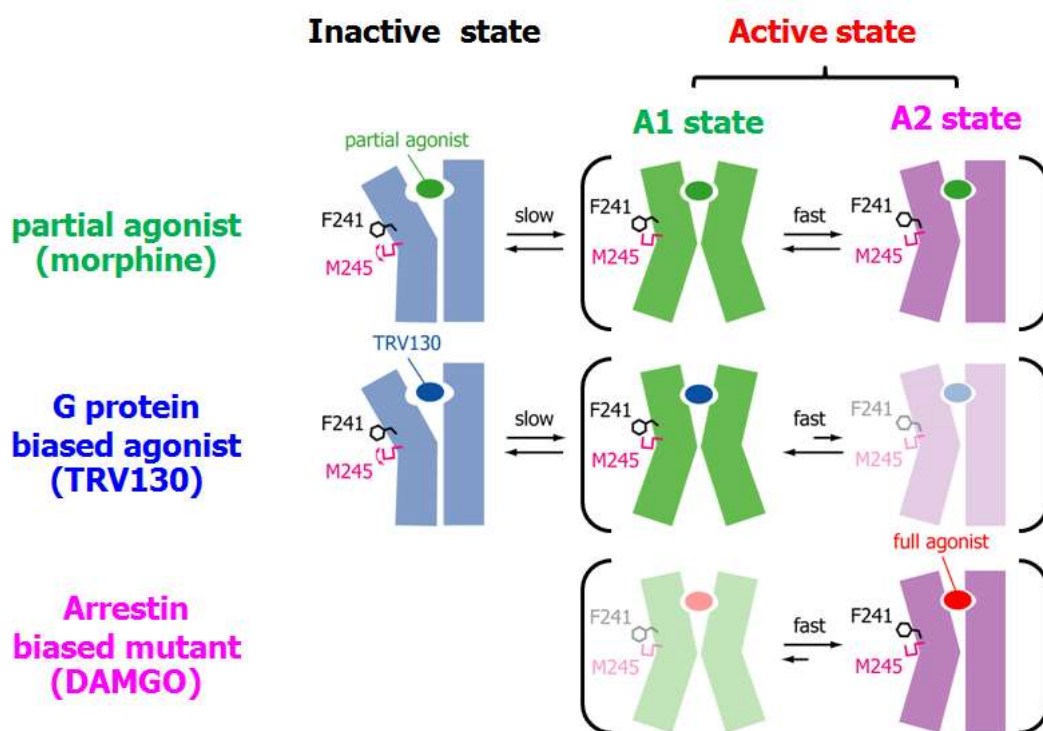


Fig. 4-6 活性化状態の  $\mu$ OR に存在する動的構造平衡の模式図

細胞内領域が大きく開き、G タンパク質をより活性化する A1 状態と、細胞内領域が中程度開き、アレスチンをより活性化する A2 状態の 2 状態の間を、速いタイムスケールで交換している。

## 4.4. signaling bias 機構に関してこれまでに提唱されている機構と本研究で提唱する機構との比較

1.3.3. 節で述べたように、signaling bias 機構の構造生物学的解析において、ERG が結合した 5-HT<sub>2B</sub> 受容体の結晶構造解析および  $\beta_2$ AR の <sup>19</sup>F-NMR 解析から、G タンパク質をより活性化する状態では、TM5 および TM6 の構造が不活性化状態とは大きく異なっているのに対し、アレスチンをより活性化する状態では、TM3 および TM7 の構造が不活性化状態とは大きく異なっているということが提唱されている [9, 10]。

一方、3.7 節および 3.8. 節で述べた P<sup>5.50</sup>/I<sup>3.40</sup>/F<sup>6.44</sup> モチーフ近傍に位置する M<sup>245</sup> および TM7 の NPxxY モチーフ近傍に位置する M<sup>163</sup> に由来するシグナルの解析で、不活性化状態、および G タンパク質をより活性化する状態すなわち A1 状態、アレスチンをより活性化する状態すなわち A2 状態、いずれの状態においても化学シフトが異なっていた。このことから、G タンパク質をより活性化する状態およびアレスチンをより活性化する状態いずれの状態においても、TM3、5、6、7 の構造は細胞内領域が閉じた不活性化状態とは異なっており、さらに G タンパク質をより活性化する状態とアレスチンをより活性化する状態とを比較しても、TM3、5、6、7 の構造が異なっているということを提唱する。また、本研究で溶液 NMR 法を適用することにより、biased agonist が、G タンパク質をより活性化する状態とアレスチンをより活性化する状態の間の動的構造平衡に変調を与え、両状態の量比を変化させることで、シグナルの選択性を発揮しているという機構をはじめて提唱する。

GPCR 一般的な signaling bias 機構を解明するには、今後、生理的な条件で様々な GPCR の動的構造を解析する必要がある。また、 $\mu$ OR の signaling bias 機構に関してより詳細に明らかにする上では、A1 状態と A2 状態のより詳細な構造情報を取得する必要がある。当研究室において、メチオニン残基の選択標識だけでなく、

アラニン残基やバリン残基などを昆虫細胞発現系で選択標識することが可能である。アラニン残基やバリン残基は、 $\mu$ OR に複数（それぞれ 30 残基程度）存在し、膜貫通領域や細胞内領域に広く分布していることから、これらアミノ酸残基の構造情報を取得することは有用である。また、得られた構造情報と分子動力学計算を組み合わせれば、A1 状態と A2 状態のより詳細な構造情報が得られることが期待される。

#### 4.5. 本研究の創薬への応用に関して

本研究において、 $\mu$ OR のメチオニン選択標識体を用いたNMR 解析を行い、膜貫通領域および細胞内領域の構造平衡を調べることができることを初めて示した。さらに、我々が開発した昆虫細胞発現系における重水素標識法を用いてシグナルの感度を向上させることが、 $\mu$ OR のNMR 解析を行う上で非常に有用であることを示した。そこで、メチオニンを選択標識した  $\mu$ OR を含む試料に医薬品候補化合物を添加し、NMR スペクトルを取得して、M245 およびM163 のシグナルの挙動を解析することで、細胞や動物を用いずに、候補化合物の薬効を効率良く予測することができるようになることが期待される。

また、現状では、 $\mu$ OR に作用するリガンドにおいて、今回算出したbias factor と副作用との関連性については明らかとなっていないが、今後、TRV130とは異なるbiased agonist の開発が進み、そのリガンドの薬理作用とNMR データとの関連性が明らかとなれば、今回私が行ったNMR 解析を適用することで、リガンドの副作用も予測することができるようになることが期待される。



## 参考文献

1. Trescot, A.M., et al., *Opioid pharmacology*. Pain Physician, 2008. **11**(2 Suppl): p. S133-53.
2. Reiter, E., et al., *Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. **52**: p. 179-97.
3. Bohn, L.M., et al., *Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2*. Science, 1999. **286**(5449): p. 2495-8.
4. Raehal, K.M., J.K. Walker, and L.M. Bohn, *Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(3): p. 1195-201.
5. Fenalti, G., et al., *Molecular control of delta-opioid receptor signalling*. Nature. **506**(7487): p. 191-6.
6. Rasmussen, S.G., et al., *Crystal structure of the beta(2) adrenergic receptor-Gs protein complex*. Nature.
7. Rosenbaum, D.M., et al., *GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function*. Science, 2007. **318**(5854): p. 1266-73.
8. Szczepek, M., et al., *Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin*. Nat Commun. **5**: p. 4801.
9. Wacker, D., et al., *Structural features for functional selectivity at serotonin receptors*. Science. **340**(6132): p. 615-9.
10. Liu, J.J., et al., *Biased signaling pathways in beta2-adrenergic receptor characterized by 19F-NMR*. Science. **335**(6072): p. 1106-10.
11. Kofuku, Y., et al., *Efficacy of the beta(2)-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region*. Nat Commun. **3**: p. 1045.
12. Manglik, A., et al., *Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist*. Nature. **485**(7398): p. 321-6.
13. Heckman, K.L. and L.R. Pease, *Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension*. Nat Protoc, 2007. **2**(4): p. 924-32.
14. Kofuku, Y., et al., *Functional Dynamics of Deuterated beta2-Adrenergic Receptor in Lipid Bilayers Revealed by NMR Spectroscopy*. Angew Chem Int Ed Engl. **53**(49): p. 13376-9.
15. Mase, Y., et al., *Structural basis for modulation of gating property of G protein-gated inwardly rectifying potassium ion channel (GIRK) by i/o-family G protein alpha subunit (Galphai/o)*. J Biol Chem. **287**(23): p. 19537-49.
16. Yokogawa, M., et al., *NMR analyses of the Gbetagamma binding and conformational rearrangements of the cytoplasmic pore of G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1)*. J Biol Chem. **286**(3): p. 2215-23.
17. Schanda, P., E. Kupce, and B. Brutscher, *SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds*. J Biomol NMR, 2005. **33**(4): p. 199-211.

18. Whorton, M.R., et al., *A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7682-7.
19. Kuszak, A.J., et al., *Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2*. J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26732-41.
20. Dewire, S.M., et al., *A G Protein-Biased Ligand at the mu-Opioid Receptor Is Potently Analgesic with Reduced Gastrointestinal and Respiratory Dysfunction Compared with Morphine*. J Pharmacol Exp Ther. **344**(3): p. 708-17.
21. Rahmeh, R., et al., *Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A. **109**(17): p. 6733-8.
22. Doll, C., et al., *Agonist-selective patterns of micro-opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies*. Br J Pharmacol. **164**(2): p. 298-307.
23. Doll, C., et al., *Deciphering micro-opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells*. Br J Pharmacol. **167**(6): p. 1259-70.
24. Just, S., et al., *Differentiation of opioid drug effects by hierarchical multi-site phosphorylation*. Mol Pharmacol. **83**(3): p. 633-9.
25. McPherson, J., et al., *mu-opioid receptors: correlation of agonist efficacy for signalling with ability to activate internalization*. Mol Pharmacol. **78**(4): p. 756-66.
26. Rivero, G., et al., *Endomorphin-2: a biased agonist at the mu-opioid receptor*. Mol Pharmacol. **82**(2): p. 178-88.
27. Perkins, S.J. and K. Wuthrich, *Ring current effects in the conformation dependent NMR chemical shifts of aliphatic protons in the basic pancreatic trypsin inhibitor*. Biochim Biophys Acta, 1979. **576**(2): p. 409-23.
28. London, R.E., B.D. Wingad, and G.A. Mueller, *Dependence of amino acid side chain  $^{13}\text{C}$  shifts on dihedral angle: application to conformational analysis*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(33): p. 11097-105.
29. Butterfoss, G.L., et al., *Conformational dependence of  $^{13}\text{C}$  shielding and coupling constants for methionine methyl groups*. J Biomol NMR. **48**(1): p. 31-47.
30. Nygaard, R., et al., *The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation*. Cell. **152**(3): p. 532-42.
31. Kay, L.E. and K.H. Gardner, *Solution NMR spectroscopy beyond 25 kDa*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(5): p. 722-31.
32. LeMaster, D.M., *Deuterium labelling in NMR structural analysis of larger proteins*. Q Rev Biophys, 1990. **23**(2): p. 133-74.
33. Ollerenshaw, J.E., D.A. Lidar, and L.E. Kay, *Magnetic resonance realization of decoherence-free quantum computation*. Phys Rev Lett, 2003. **91**(21): p. 217904.
34. Takahashi, H. and I. Shimada, *Production of isotopically labeled heterologous proteins in*

- non-E. coli prokaryotic and eukaryotic cells*. J Biomol NMR. **46**(1): p. 3-10.
35. Ring, A.M., et al., *Adrenaline-activated structure of beta2-adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody*. Nature. **502**(7472): p. 575-9.
  36. Deupi, X., et al., *Stabilized G protein binding site in the structure of constitutively active metarhodopsin-II*. Proc Natl Acad Sci U S A. **109**(1): p. 119-24.
  37. Elgeti, M., et al., *Conserved Tyr223(5.58) plays different roles in the activation and G-protein interaction of rhodopsin*. J Am Chem Soc. **133**(18): p. 7159-65.
  38. Goncalves, J.A., et al., *Highly conserved tyrosine stabilizes the active state of rhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(46): p. 19861-6.
  39. Rasmussen, S.G., et al., *Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor*. Nature. **469**(7329): p. 175-80.
  40. Hein, P., et al., *Gs activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33345-51.
  41. Lohse, M.J., et al., *Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(3): p. 159-65.
  42. Yoshiura, C., et al., *NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers*. J Am Chem Soc. **132**(19): p. 6768-77.
  43. Singh, P., et al., *Structures of rhodopsin kinase in different ligand states reveal key elements involved in G protein-coupled receptor kinase activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(20): p. 14053-62.
  44. Rose, A.S., et al., *Position of transmembrane helix 6 determines receptor G protein coupling specificity*. J Am Chem Soc. **136**(32): p. 11244-7.

## 謝辞

本研究は多くの方々の御支援がなければなし得なかったものである。

研究を行う機会と素晴らしい研究環境を与えてくださり、また研究の方向性、研究者としての心構えに関する多くの熱心な御指導を賜っただけでなく、身に余るほどの期待をして下さいました、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 嶋田一夫教授に衷心より感謝し、厚く御礼を申し上げます。

研究室への配属以来、日々の研究に関して、研究の方向性や研究者としての態度、実験の方法について直接のご指導をいただきました、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 上田卓見助教、吉浦知絵博士に心より感謝と御礼を申し上げます。

昆虫細胞発現系を用いた受容体のメチオニン選択標識および重水素化標識を御教授頂き、また実験手法を懇切丁寧に御指導頂きました、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 幸福裕特任助教に感謝申し上げます。

モルヒネ誘導体の合成を行う上で実験環境を与えてくださり、また熱心に御指導をして頂いた、本学薬学系研究科の福山透教授、君嶋敦博士に深く感謝申し上げます。

全重水素化チロシンの合成を行う上で実験環境を与えてくださり、また熱心に御指導をして頂いた、本学薬学系研究科の井上将行教授、倉永健史助教に深く感謝申し上げます。

TRV130 を御恵与いただき、有意義なディスカッションをして頂いた、塩野義製薬株式会社 辻下英樹博士、山口寛人博士、前田正洋博士に深く感謝申し上げます。

日々の研究生活において、研究に関する貴重なご助言と、私のことを気にかけて温かい励ましをいただきました、東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室 大澤匡範講師、西田紀貴助教に心からの感謝を申し上げます。

日々の研究生活全般にわたり、様々な形でご助力いただきました東京大学大学院 薬学系研究科 生命物理化学教室のすべてのメンバーに深く感謝いたします。特に、研究に関して熱

心な議論を交わすだけでなく、日々の生活において様々な相談にのって下さった湊雄一博士と、同じオピオイド受容体の研究に携わり、熱心に研究に取り組んで頂いた佐藤元彦学士、GRK2 の発現コンストラクトを下さった白石勇太郎修士、GDP-GTP 交換アッセイの方法を御教授頂いた水村拓也修士、同じ研究グループのメンバーとして日々の研究において協力していただいた大西健人学士、夏目芽依さんに感謝いたします。

最後に、研究生生活を経済的、精神的に支えていただいた、母、妹と、研究生生活を送る私を多方面で支えてくださった身近な方々に感謝いたします。