

## 論文の内容の要旨

論文題目       $\mu$  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

氏名      奥出   順也

### 【背景】

モルヒネなどのオピオイド系鎮痛薬は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に属する  $\mu$  オピオイド受容体 ( $\mu$ OR) に結合する。モルヒネにより活性化された  $\mu$ OR は、G タンパク質を介したシグナルを活性化し、鎮痛作用を誘起する (Fig.1)。また、 $\mu$ OR は GPCR キナーゼ (GRK) によってリン酸化された上で、アレスチンを介したシグナルが活性化され、呼吸抑制、耐性などの副作用が誘起される (Fig.1)。

$\mu$ OR の類縁体である  $\delta$ オピオイド受容体 ( $\delta$ OR) において、N131<sup>3.35A</sup> 変異体がアレスチンシグナルを選択的に活性化することが知られている。また、 $\mu$ OR に作用するリガンドである TRV130 が G タンパク質シグナルを選択的に活性化すること、およびモルヒネと比べて副作用を誘起しにくいことが知られている。

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、鎮痛薬を開発する上で重要である。近年、アンタゴニストが結合した不活性型の  $\mu$ OR の結晶構造が解かれた。しかし、アゴニスト結合状態の  $\mu$ OR の構造に関する知見は得られていない。そこで本研究では、GPCR の活性が動的構造平衡により制御されていることを明らかにした我々の先行研究を応用して、様々なアゴニストが結合した  $\mu$ OR の動的構造平衡を明らかにして、 $\mu$ 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ことを目的とした。

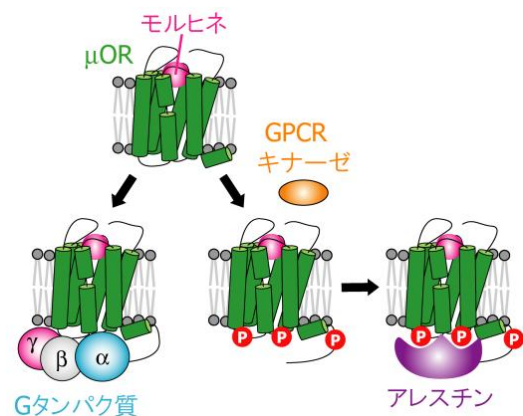


Fig.1  $\mu$ OR による、G タンパク質 (左) および GRK とアレスチン (右) を介したシグナルの活性化

## 【方法】

### 1. $\mu$ OR の調製

C 末端 40 残基を欠失させ、熱安定性変異 F158W を導入した上で、N 末端に FLAG タグ、C 末端に His タグを付加したヒト由来  $\mu$ OR (以降単に  $\mu$ OR とする) を、昆虫細胞発現系にて発現させた。 $\mu$ OR を *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM) により可溶化して、精製および界面活性剤の交換、N 末端の切断を行った。

### 2. $\mu$ OR のシグナル伝達活性の評価

reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) の脂質二重膜中に再構成した  $\mu$ OR を用いて、シグナル伝達活性を測定した。G タンパク質シグナル活性を評価するため、アンタゴニストであるナロキソン、部分アゴニストであるモルヒネ、完全アゴニストである DAMGO、G タンパク質を選択的に活性化する部分アゴニストである TRV130 を添加して、 $[^{35}\text{S}]$ 標識 GTP $\gamma$ S を用いた  $G\alpha$  の GDP-GTP 交換実験を行った。また、アレスチンシグナル活性を評価するため、GRK2 により  $\mu$ OR をリン酸化した後、 $\mu$ OR の C 末端に位置するリン酸化 S377 を認識する抗体を 1 次抗体としてウェスタンブロット解析を行った。

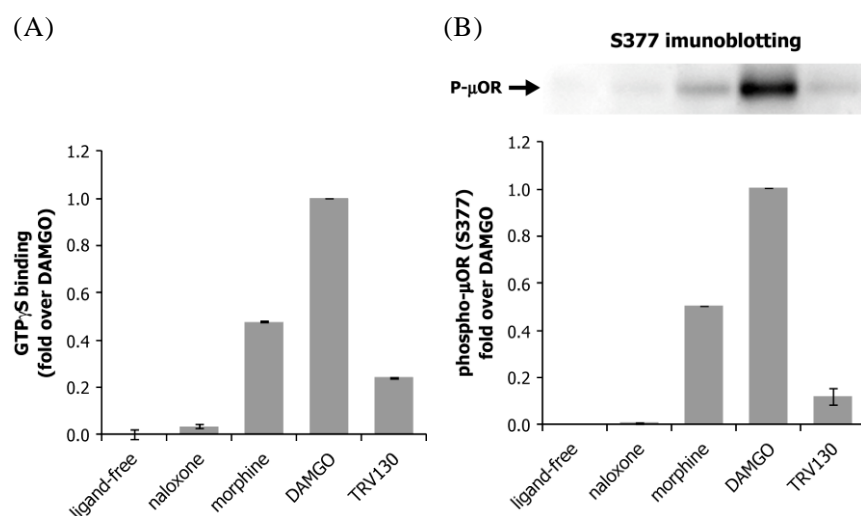
### 3. NMR 解析

$\alpha,\beta$ - $^2\text{H}$ , methyl- $^{13}\text{C}$  標識メチオニン、および各種  $^2\text{H}$  標識アミノ酸を加えた培地を用いて、部分重水素化とメチオニン残基選択標識を両方施した  $\mu$ OR の  $\Delta 6\text{M}$  (M67L/M74T/M132L/M205I/M207L/M266L) 変異体、 $\Delta 7\text{M}$  ( $\Delta 6\text{M}$ +M245V) 変異体、および  $\Delta 6\text{M}$ +N152A 変異体を調製した。99 %以上の受容体がりガンド結合状態となるようリガンドを過剰量添加し、LMNG ミセル中で  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルを測定した。

## 【結果】

### 1. $\mu$ OR のシグナル伝達活性の評価

調製した  $\mu$ OR の G タンパク質活性化能、および GRK2 による S377 のリン酸化反応の進行度は、添加したリガンドの活性の報告値と概ね対応していた (Fig.2)。また、溶媒や脂質二重膜側に露出した 6 個のメチオニン残基を他のアミノ酸に置換した変異体 ( $\Delta 6\text{M}$  変異体) の G タンパク質活性化能は、変異導入前と同程度であった。したがって、 $\Delta 6\text{M}$  変異体がシグナル伝達活性を保持していることが示された。



**Fig.2  $\mu$ OR を介した G タンパク質およびアレスチンシグナル伝達活性の評価** 各リガンド存在下における、 $G\alpha$  への  $[^{35}\text{S}]$  標識 GTP $\gamma$ S の結合量 (A) および GRK2 により S377 がリン酸化された  $\mu$ OR の相対量 (B) のプロット。モルヒネ存在下を 1 と規格化した。

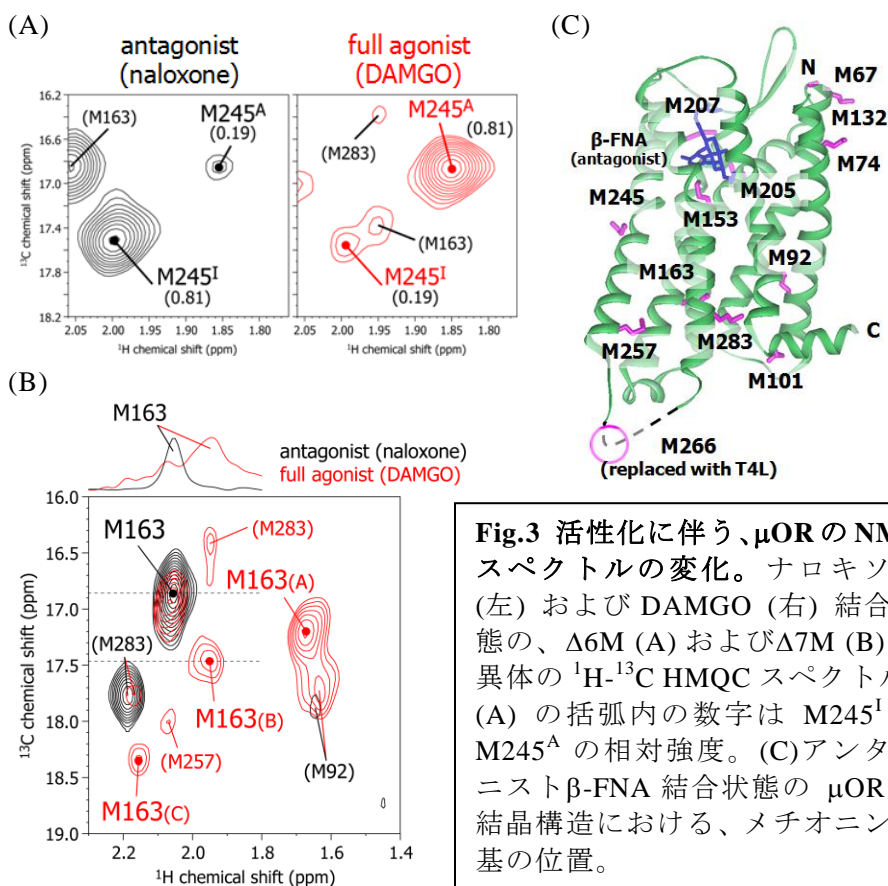
## 2. アンタゴニストおよび完全アゴニスト結合状態における $\mu$ OR の NMR 解析

アンタゴニストであるナロキソン、および完全アゴニストである DAMGO を添加して、部分重水素化およびメチオニン残基選択的標識を施した $\Delta 6M$ 変異体の $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトルを取得した。その結果、概ね  $\mu$ OR のメチオニン残基数 (7 個) に対応するシグナルが観測された。 $\Delta 6M$ 変異体に M245V 変異を導入した $\Delta 7M$ 変異体のスペクトルを取得して、 $\Delta 6M$ 変異体のスペクトルと比較することで、M245 のシグナルを帰属した。その結果、M245 に由来するシグナルが 2 個観測されており、ナロキソン結合状態と DAMGO 結合状態ではそれぞれ M245<sup>I</sup> と M245<sup>A</sup> と名付けたシグナルの強度が大きいことが示された (Fig.3A)。

また、(A)

$\Delta 6M$  変異体と  $\Delta 7M$  変異体では、M245 以外のシグナルの化学シフトはほぼ一致しており、M245V 変異導入による構造への影響は小さいことが示された。

他のメチオニン残基のシグナルも同様に帰属した結果、比較的シグナル強度の小さい、分子内側に位置する M163 および M283 について、両状態で化学シフトが異なるシグナルが観測されていることが示された (Fig.3B)。



**Fig.3** 活性化に伴う、 $\mu$ OR の NMR スペクトルの変化。ナロキソン (左) および DAMGO (右) 結合状態の、 $\Delta 6M$  (A) および  $\Delta 7M$  (B) 変異体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトル。(A) の括弧内の数字は M245<sup>I</sup> と M245<sup>A</sup> の相対強度。(C) アンタゴニスト  $\beta$ -FNA 結合状態の  $\mu$ OR の結晶構造における、メチオニン残基の位置。

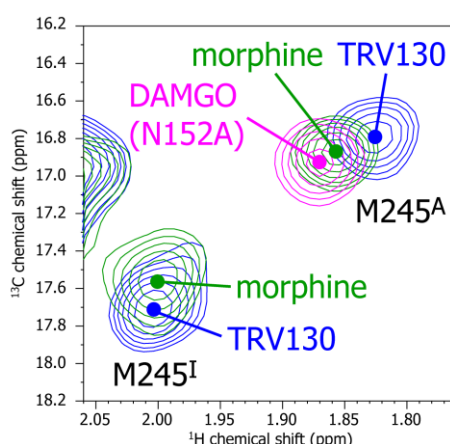
## 3. 部分アゴニスト結合状態における $\mu$ OR の NMR 解析

部分アゴニストであるモルヒネを添加して、 $\Delta 6M$ 変異体の $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトルを取得した。その結果、M245<sup>I</sup> 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両方観測された (Fig.4)。M163 においても、ナロキソン結合状態および DAMGO 結合状態と化学シフトが対応するシグナルが両方観測された。

## 4. G タンパク質またはアレスチンのどちらか一方を選択的に活性化する状態の NMR 解析

G タンパク質シグナル選択的な部分アゴニストである TRV130 を添加して、 $\Delta 6M$ 変異体の $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトルを取得した。その結果、M245<sup>I</sup> に対応するシグナルと、M245<sup>A</sup> より高磁場側にシフトしたシグナルが、同程度の強度で両方観測された (Fig.4)。

また、アレスチンシグナルを選択的に活性化する  $\Delta 6M+N152^{3.35A}$  変異体の DAMGO 結合状態の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトルを取得した。その結果、M245<sup>A</sup>より低磁場側にシフトしたシグナルが観測された (Fig.4)。



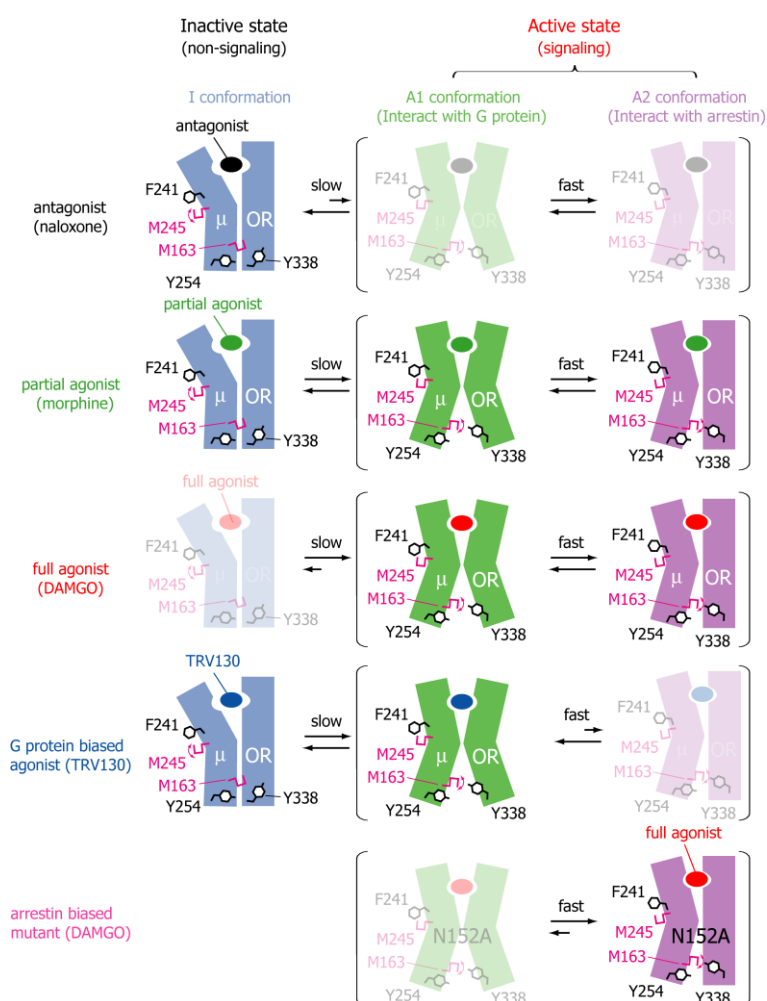
**Fig.4** 部分アゴニスト結合状態における M245 のシグナル。モルヒネ結合状態および TRV130 結合状態の  $\Delta 6M$  変異体と、DAMGO 結合状態の  $\Delta 6M+N152A$  変異体のスペクトルの重ね合わせ。

M163 についても、TRV130 存在下では、ナロキソン結合状態と対応するシグナルと、DAMGO 結合状態と化学シフトが少し異なるシグナルが両方観測された。

### 【考察】

立体構造上離れている M163、M245、M283 の化学シフトがナロキソン存在下と DAMGO 存在下で異なっていたことから、活性化に伴う広範な領域の構造変化が NMR 法で観測されたことが示された。また、リガンドの活性と対応して、M163 および M245 に由来するシグナルの相対強度が変化したことから、 $\mu OR$  が不活性型と活性型の間を化学シフト差より遅い速度で交換しており、活性型の割合が活性の大きさを決定していると考えた (Fig.5)。

さらに、TRV130 存在下の  $\Delta 6M$  変異体および DAMGO 存在下の  $\Delta 6M+N152A$  変異体において、活性型に対応するシグナルの化学シフトが連続的に変化したことから、 $\mu OR$



**Fig.5** 各リガンド結合状態における  $\mu OR$  の動的構造平衡の模式図

が G タンパク質を選択的に活性化する状態とアレスチンを選択的に活性化する状態を化学シフト差より速い速度で交換しており、両状態の比が偏ることにより、一方のシグナルが選択的に活性化されると考えた (Fig.5)。