

博士論文

論文題目    アロステリックモジュレーターによる  
                 アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体の活性制御機構の解明

氏      名    近藤   啓太

# 目次

目次	i
略語	iv
要約	vi
第1章 序論	1
1-1    アデノシンとアデノシン A <sub>2A</sub> 受容体	1
1-2    A <sub>2A</sub> 受容体によるシグナル伝達	2
1-3    A <sub>2A</sub> 受容体の分子の特徴	3
1-4    A <sub>2A</sub> 受容体のアロステリックモジュレーター	5
1-5    アロステリックモジュレーターの利点と課題	6
1-6    本研究の目的	7
第2章 材料と方法	8
2-1    バッファー組成	8
2-1-1    A <sub>2A</sub> 受容体の精製関連	8
2-1-2 <i>Escherichia coli</i> cystathionine $\gamma$ -synthase 関連	9
2-1-3    各種解析関連	10
2-2    培地組成	12
2-3 <i>Pichia pastoris</i> を用いた A <sub>2A</sub> 受容体の発現と精製	15
2-3-1 <i>P. pastoris</i> 用の A <sub>2A</sub> 受容体発現コンストラクト	15
2-3-2 <i>P. pastoris</i> の形質転換	15
2-3-3    小スケールでの A <sub>2A</sub> 受容体の発現と活性確認	15
2-3-4    大スケールでの A <sub>2A</sub> 受容体の発現	16

2-3-5	リガンドアフィニティー精製用レジン XAC-agarose の調製	17
2-3-6	A <sub>2A</sub> 受容体の精製	18
2-4	リガンド結合アッセイ	20
2-5	A <sub>2A</sub> 受容体の経時的安定性の検討	21
2-6	A <sub>2A</sub> 受容体の生化学的解析	22
2-6-1	HEK293T 細胞用の発現コンストラクトの構築	22
2-6-2	細胞継代とトランスフェクション	22
2-6-3	発現の確認	22
2-6-4	リガンド解離アッセイの定式化	23
2-6-5	膜画分を用いたリガンド解離アッセイ	27
2-6-6	cAMP 産生アッセイ	27
2-7	ドッキング解析	28
2-8	[ $\alpha$ , $\beta$ , $\beta$ - <sup>2</sup> H <sub>3</sub> , methyl- <sup>13</sup> C] methionine の調製	28
2-8-1	<i>E. coli</i> cystathionine $\gamma$ -synthase の調製	28
2-8-2	eCGS によるメチオニンの <sup>2</sup> H 標識	29
2-9	A <sub>2A</sub> 受容体の NMR 測定	30
2-10	部分アゴニスト 2-(1-hexynyl)adenosine の合成	31
第3章 結果		33
3-1	試料調製	33
3-1-1	<i>P. pastoris</i> を用いた A <sub>2A</sub> 受容体の発現と精製	33
3-1-2	A <sub>2A</sub> 受容体の活性の確認	35
3-1-3	部分アゴニスト 2-(1-hexynyl)adenosine の合成	38
3-1-4	A <sub>2A</sub> 受容体を発現させた HEK293T 細胞の調製	40
3-2	アミロライドと A <sub>2A</sub> 受容体の結合の検出	45
3-2-1	NMR 法の利点	45

3-2-2	A <sub>2A</sub> 受容体の NMR シグナルの帰属	47
3-2-3	アミロライドと A <sub>2A</sub> 受容体の結合の検出	54
3-3	A <sub>2A</sub> 受容体のアミロライド結合部位の同定	56
3-3-1	アミロライド結合状態 A <sub>2A</sub> 受容体の NMR による観測	56
3-3-2	変異体解析による結合部位の同定	58
3-3-3	A <sub>2A</sub> 受容体とアミロライドのドッキング解析	64
3-4	アミロライドによる A <sub>2A</sub> 受容体の活性変化	65
3-4-1	シグナル伝達活性に対する作用	65
3-4-2	リガンド解離速度に対する作用	66
3-5	アミロライドによる A <sub>2A</sub> 受容体の構造変化	68
3-5-1	細胞内側領域の構造変化	68
3-5-2	オルソステリック部位の構造変化	74
第4章	考察	77
4-1	アミロライドによる A <sub>2A</sub> 受容体の細胞内側の構造変化とシグナル伝達活性の関係	77
4-2	アミロライドによるオルソステリック部位周辺の構造変化とリガンド結合活性の関係	79
4-3	アミロライドがオルソステリック部位と細胞内側の構造平衡を同時に制御する機構	81
第5章	結論	83
第6章	参考文献	85
謝辞		90

## 略語

本文中の略語は以下に示す一覧表に従って用いた。

A <sub>2A</sub> AR	adenosine A <sub>2A</sub> receptor
AC	adenylate cyclase
AEBSF	4-(2-aminomethyl)benzenesulfonyl fluoride
ATP	adenosine-5'-triphosphate
B/F	bound/free
BMG	buffered minimal glycerol medium
BMGY	buffered complex glycerol medium
cAMP	3'-5'-cyclic adenosine monophosphate
CBB	coomassie brilliant blue
CHS	cholesteryl hemisuccinate
CRINEPT	cross-correlated relaxation-enhanced polarization transfer
DDM	<i>n</i> -dodecyl-β-D-maltopyranoside
DMSO	dimethyl sulfoxide
DO	dissolved oxygen
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
eCGS	<i>E. coli</i> cystathionine γ-synthase
ECL	extracellular loop
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GDP	guanosine-5'-diphosphate
GPCR	G-protein coupled receptor
GTP	guanosine-5'-triphosphate
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
ICL	intracellular loop
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
MNG	maltose-neopentyl glycol
MS	mass spectrometry
MWCO	molecular weight cut-off
NECA	5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PVDF	polyvinylidene fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS	tris buffered solution
TBST	tris buffered solution with Tween 20
TFA	trifluoroacetic acid
TM	transmembrane
TOF	time-of-flight
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TROSY	transverse relaxation-optimized spectroscopy
XAC	xanthine amine congener

## 要約

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の一種であるアデノシン  $A_{2A}$  受容体は、神経伝達や炎症反応を制御する膜蛋白質である。 $A_{2A}$  受容体に作用する化合物はパーキンソン病などの治療薬になると期待されている。中でも近年、 $A_{2A}$  受容体の生理的リガンド結合部位以外の領域に結合するリガンドであるアロステリックモジュレーターが、新しいクラスの薬剤として注目されている。しかしその作用機構は不明であり、開発も進んでいない。そこで本研究では、アロステリックモジュレーターが  $A_{2A}$  受容体の活性を制御する機構を解明することを目的とした。まず、核磁気共鳴 (NMR) 法や変異体解析、ドッキング解析を組み合わせることで、アロステリックモジュレーター的一种であるアミロライドの結合部位を同定した。また、NMR 法を用いて  $A_{2A}$  受容体の構造変化を解析したところ、 $A_{2A}$  受容体の細胞外側領域と細胞内側領域はそれぞれ活性化コンフォメーションと不活性コンフォメーションの間を交換する平衡状態にあることが明らかになった。アミロライドは、細胞外側の平衡を活性化状態側に、細胞内側の平衡を不活性状態側にシフトさせることで、アゴニスト解離の減速とシグナル伝達の抑制を起こすというメカニズムを提唱した。これらの結果は、動的構造の変化による GPCR の活性制御という新しい分子機構を提示するものであり、効果的なアロステリックモジュレーターを理論的に設計することに役立つと期待される。

# 第1章 序論

## 1-1 アデノシンとアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体

アデノシンは ATP の分解によって生合成されるプリンヌクレオチドの一種であり、ほとんどすべての種類の細胞が産生する基本的な生理活性物質である（図 1）。低酸素状態などのストレスに曝されたときや急激なエネルギー消費時などにアデノシンは細胞外へ放出される[1]。放出されたアデノシンは、細胞膜に埋め込まれた受容体に結合することで細胞内にシグナルを伝達し、適切な生理応答を引き起こさせる[2]。

アデノシン受容体は、G 蛋白質共役型受容体（G-protein coupled receptor, GPCR）のロドプシンファミリーに属する膜蛋白質である。アデノシン受容体には 4 つのサブタイプ（A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>）が存在する。中でも A<sub>2A</sub> 受容体は線条体や血小板などに分布しており[3]、炎症反応[4]や神経伝達[5]、睡眠[6]などの調節において重要な役割を果たす。A<sub>2A</sub> 受容体に選択的に作用する逆アゴニスト（不活性化リガンド）はパーキンソン病やハンチントン病などの神経変性疾患に対する治療薬に、アゴニスト（活性化リガンド）は炎症や喘息に対する治療薬になると期待されている[2, 3]。そのような化合物を理論的に創出する上で、A<sub>2A</sub> 受容体の活性制御機構を解明することは重要である。

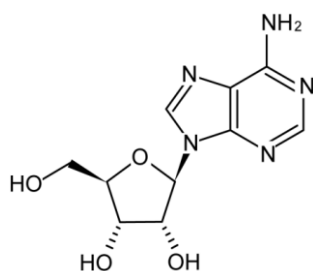


図 1 アデノシンの化学構造。



## 1 - 2 $A_{2A}$ 受容体によるシグナル伝達

$A_{2A}$  受容体は外部環境の変化を細胞内に伝える役割を持ち、その作用の流れは以下になる（図 2）。まず、細胞外のアデノシンが結合することで  $A_{2A}$  受容体は活性化する。活性化した  $A_{2A}$  受容体は細胞内の Gs 蛋白質と相互作用して、Gs 蛋白質が持つ  $G\alpha s$  サブユニットの GDP/GTP 交換反応を触媒する[3]。GTP 結合型になった  $G\alpha s$  サブユニットは、 $G\beta$  サブユニットと  $G\gamma$  サブユニットの複合体から解離する。遊離した  $G\alpha s$  サブユニットはアデニル酸シクラーゼを活性化させて cAMP を産生させる[7]。cAMP はセカンドメッセンジャーとして働き、それによってプロテインキナーゼ A が活性化される。活性化されたプロテインキナーゼ A は細胞内のさまざまな蛋白質をリン酸化することで、それらの活性を変化させる。このように、アデノシンと  $A_{2A}$  受容体の結合を起点として細胞外側から細胞内側に刺激が次々と伝達されていくことで、適切な細胞応答が引き起こされる。

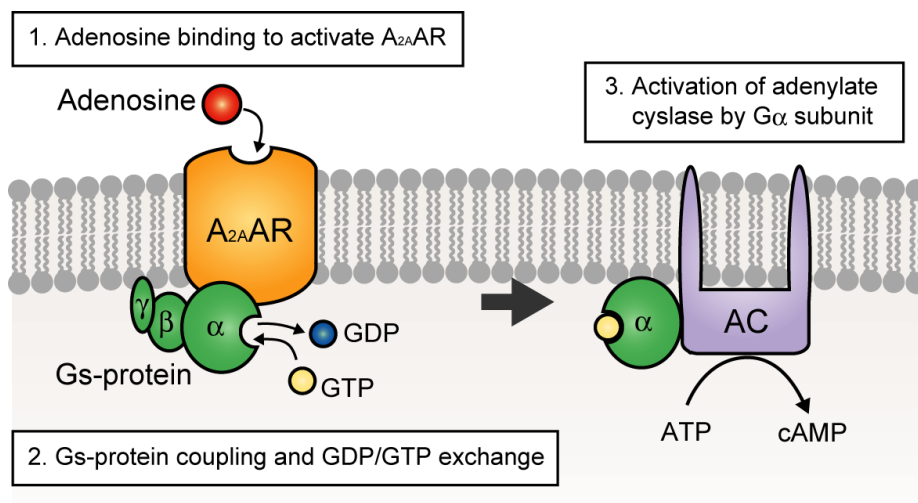


図 2  $A_{2A}$  受容体を介したシグナル伝達の模式図。

生理的アゴニストのアデノシンが結合すると  $A_{2A}$  受容体は活性化し、細胞内の Gs 蛋白質の GDP/GTP 交換反応を触媒する。GTP 型になった G 蛋白質から  $G\alpha$  サブユニットが遊離し、アデニル酸シクラーゼ (AC) に作用して cAMP 産生を亢進させる。

### 1-3 A<sub>2A</sub> 受容体の分子の特徴

ヒトの A<sub>2A</sub> 受容体は 412 残基から構成される七回膜貫通型の蛋白質である。これまでに逆アゴニストまたはアゴニストが結合したヒト A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造が報告されており[8-14]、分子の立体構造が明らかになっている。A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造は、GPCR ファミリーに共通する 7 つの膜貫通ヘリックス (TM1-7) を持ち、それらが細胞内外の計 6 本のループ (ICL1-3, ECL1-3) によって繋がれた構造をしていた (図 3)。TM7 の C 末端側には、細胞膜を貫通しない短いヘリックス (Helix8) がつながっていた。また、N 末端を細胞外側に、C 末端を細胞内側に向けたトポロジーをしていた。分子の細胞外側には生理的リガンド結合部位に相当する疎水性ポケットが存在し、アゴニストと逆アゴニストのいずれもそこに同じポーズで結合していた。

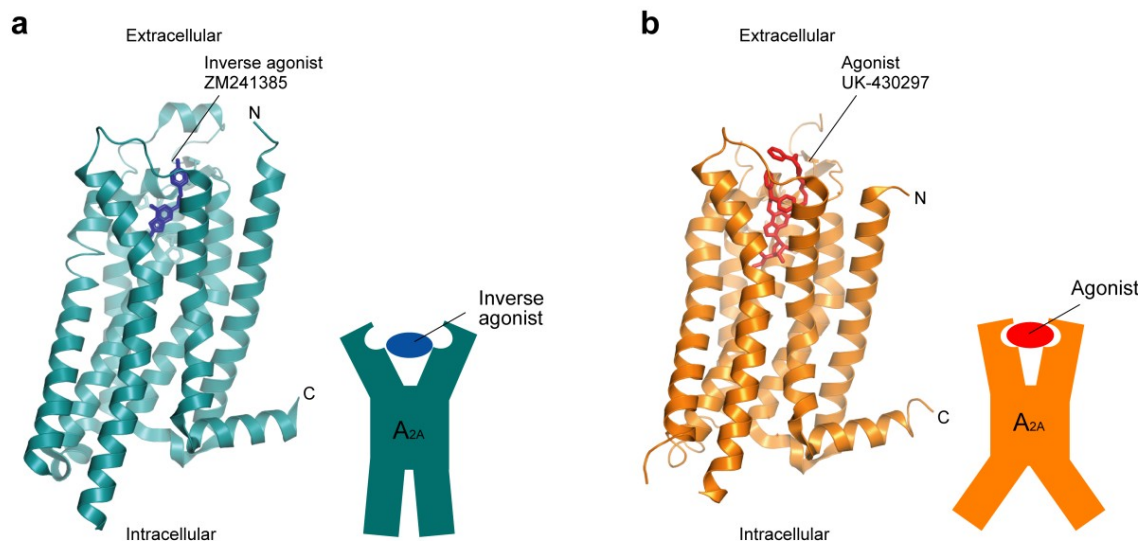


図 3 ヒト A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造。

逆アゴニスト ZM241385 結合状態 (a) とアゴニスト UK-432097 結合状態 (b) の A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造を示した (PDB ID: 4EIIY, 3QAK)。また、それぞれの構造の模式図を横に示した。両者の構造の比較から、活性化に伴ってリガンド結合ポケットは閉じ、細胞内側に疎水性ポケットが開くと考えられている。

また、 $A_{2A}$  受容体と同じロドプシンファミリーに属する $\beta_2$  アドレナリン受容体と Gs 蛋白質の複合体の結晶構造が報告されており、活性化による GPCR の構造変化に関する知見が得られている[15]。その結晶構造では、TM5, 6, 7 などが構造変化することで受容体の細胞内側に疎水性ポケットが開き、そこに  $G\alpha_s$  のヘリックスが入り込むことで複合体を形成していた。この結晶構造における $\beta_2$  アドレナリン受容体は、完全に活性化した状態であると考えられている。

アゴニスト結合状態の  $A_{2A}$  受容体の結晶構造においても、変化の程度は小さかったものの、 $\beta_2$  アドレナリン受容体と同様に TM5 の細胞内側などが構造変化するのが観測された（図 4）[16]。それによって細胞外側のリガンド結合ポケットは閉じ、細胞内側には疎水性ポケットが形成されていた（図 3）。このような構造変化は  $G\alpha$  ペプチド結合状態のオプシン[17]や、アゴニスト結合状態のニューロテンシン受容体[18]およびムスカリン性アセチルコリン M2 受容体[19]、アゴニストとナノ抗体結合状態の $\beta_2$  アドレナリン受容体[20]の結晶構造においても観測されていた。よって、活性化に伴う膜貫通ヘリックスの構造変化様式は GPCR ファミリー内で比較的保存されていると考えられている。

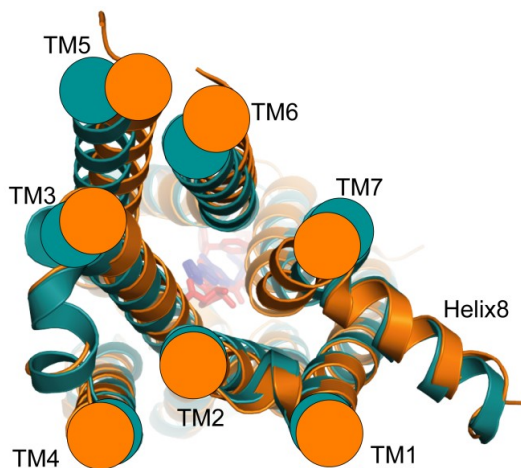


図 4 活性化に伴う  $A_{2A}$  受容体の細胞内側の構造変化。

逆アゴニスト ZM241385 結合状態（青）とアゴニスト UK-432097 結合状態（橙）の  $A_{2A}$  受容体の結晶構造の重ね合わせを細胞内側から見た。アゴニストの結合によって TM5 や TM7 の細胞内側がスライドし、TM3 がヘリックスの軸方向の細胞外側に動くのが観測された。

## 1-4 A<sub>2A</sub>受容体のアロステリックモジュレーター

アミロライドやその誘導体 HMA も A<sub>2A</sub> 受容体のリガンドであるが、これらは通常のリガンドにはない性質を持つことが知られている (図 5)。それは、アミロライド存在下では A<sub>2A</sub> 受容体から逆アゴニスト [<sup>3</sup>H]ZM241385 が解離する速度が速くなるという性質である[21]。このことからアミロライドは、A<sub>2A</sub> 受容体と逆アゴニストの複合体に直接作用しており、逆アゴニストとは異なる結合部位に結合すると考えられている。

このように生理的なリガンド結合部位以外の領域に結合して受容体の活性を変調させるリガンドは、アロステリックモジュレーターと呼ばれる[22, 23]。すなわちアミロライドや HMA は A<sub>2A</sub> 受容体のアロステリックモジュレーターである。一方、ZM241385 のように生理的なリガンド結合部位 (オルソステリック部位) に結合する通常のリガンドは、オルソステリックリガンドと呼ばれる。

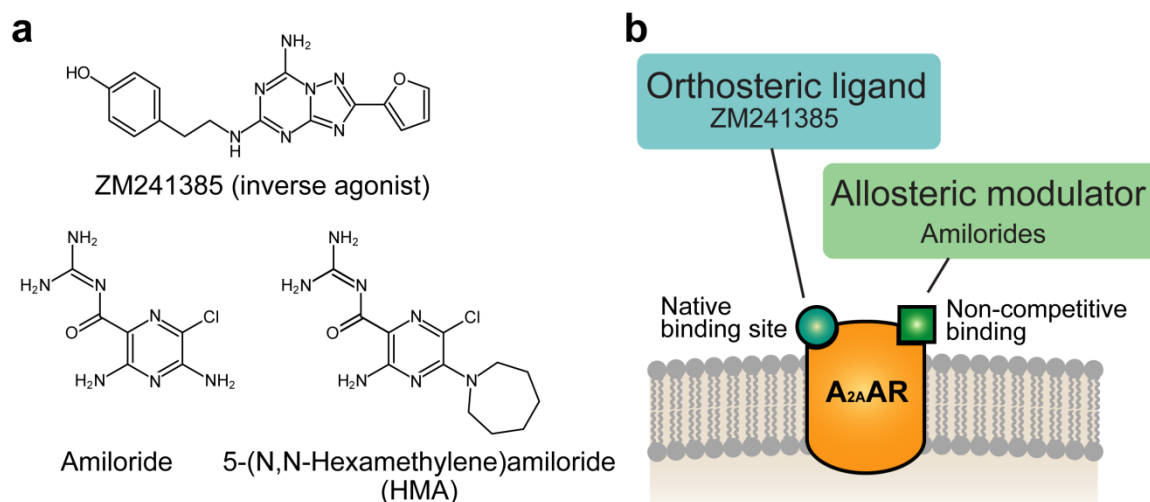


図 5 A<sub>2A</sub>受容体のアロステリックモジュレーター。

a. 逆アゴニスト ZM241385、アミロライド、HMA の化学構造。

b. アロステリック結合の模式図。アミロライドや HMA は生理的なリガンド結合部位 (オルソステリック部位) とは異なる領域に結合する。そのため、オルソステリック部位に結合する ZM241385 とは非競合的である。

## 1-5 アロステリックモジュレーターの特長と課題

創薬という観点において、アロステリックモジュレーターにはいくつかの特長がある。例えば、一般にオルソステリック部位と比較してアロステリック部位の保存性は低いため、アロステリックモジュレーターはサブタイプ選択性の向上や化学構造の多様化に有利であると期待されている[23]。また、アロステリックモジュレーターはオルソステリックリガンドの efficacy（最大効力）や potency（用量効力）を変調させるため、両者を組み合わせて使用することで投与設計の幅を広げることができる[22, 24]。

GPCR はを標的とする既存の医薬品全体としても、そのほとんどはオルソステリックリガンドというのが現状である。これまでにいくつかのアロステリックな GPCR 標的薬が上市されているものの[25, 26]、 $A_{2A}$  受容体に対するアロステリックな薬の開発は進んでいない。 $A_{2A}$  受容体のアロステリックモジュレーターを効率良く開発するためには、アミロライドが  $A_{2A}$  受容体の活性を変調させる機構を解明することが重要である。しかしながら、アミロライドの結合部位や、結合によって  $A_{2A}$  受容体の立体構造が変化する機構についての詳細は不明であった。

## 1 - 6 本研究の目的

A<sub>2A</sub> 受容体は神経伝達や炎症反応を制御する GPCR であり、パーキンソン病や関節リウマチなどの薬物標的として注目されている。また、A<sub>2A</sub> 受容体のアロステリックモジュレーターは新しいクラスの薬剤になると期待されているが、その作用機序は不明であり、開発は進んでいない。そこで本研究では、アロステリックモジュレーター的一种であるアミロライドによって A<sub>2A</sub> 受容体の機能が制御される機構を明らかにすることを目的とした。

具体的には、アミロライドの結合部位の同定、アミロライドによる A<sub>2A</sub> 受容体の活性変化の定量、および A<sub>2A</sub> 受容体の構造変化の解析を行った。それらの結果をもとに、アミロライドが A<sub>2A</sub> 受容体の活性をアロステリックに制御する機構について考察した。

## 第2章 材料と方法

### 2-1 バッファー組成

本実験では以下の組成のバッファーを用いた。特に断らない限り、試薬はすべて和光純薬工業またはナカライテスクより購入した。

#### 2-1-1 A<sub>2A</sub> 受容体の精製関連

##### Assay buffer

500 mM NaCl, 100 mM sucrose, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4

##### Protease inhibitor mixture

0.6 μM aprotinin, 30 μM pepstatin A, 20 μM leupeptin hemisulfate, 28 μM E-64,  
200 μM AEBSF (すべてペプチド研究所より購入)

##### Cell suspension buffer

5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, protease inhibitor mixture

##### Membrane suspension buffer

200 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0

##### Solubilization buffer D

200 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 % (w/v) DDM  
(同仁化学研究所), 0.4 % (w/v) CHS (Sigma-Aldrich), protease inhibitor

mixture (2 倍量)

#### Purification buffer D

200 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05 % (w/v)  
DDM, 0.01 % (w/v) CHS, protease inhibitor mixture

#### Solubilization buffer M

200 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 % (w/v)  
MNG-3 (Affymetrix), 0.2 % (w/v) CHS, protease inhibitor mixture

#### Purification buffer M

200 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.02 % (w/v)  
MNG-3, 0.004 % (w/v) CHS, protease inhibitor mixture

### 2 – 1 – 2 *Escherichia coli* cystathionine $\gamma$ -synthase 関連

#### eCGS buffer

100 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10  $\mu$ M pyridoxal-5-phosphate, protease inhibitor  
cocktail (EDTA-free)

#### Deuteration buffer

33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 0.2 mM  
pyridoxal-5-phosphate, 99.8 % (v/v) <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (Cambridge Isotope Laboratories)



## 2 – 1 – 3 各種解析関連

### SDS sample buffer

124 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 % glycerol, 4 % (w/v) SDS, 0.001 % (w/v) bromophenol blue

### Towbin buffer

25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 10 % (v/v) methanol

### Blocking buffer

3 % (w/v) gelatin (Bio-Rad), 1 × TBS (Bio-Rad)

### TBST

0.05 % (v/v) Tween 20 (Bio-Rad), 1 × TBS

### Antibody buffer

1 % (w/v) gelatin, TBST

### NMR buffer 1 ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ CRINEPT-HMQC-TROSY 測定の際に使用)

20 mM HEPES- $\text{d}_{18}$  (98 %  $^2\text{H}$ , Cambridge Isotope Laboratories)-KOH, pH 7.0,  
20  $\mu\text{M}$  leupeptin hemisulfate, 28  $\mu\text{M}$  E-64, 200  $\mu\text{M}$  AEBSF, 10 % (v/v)  $^2\text{H}_2\text{O}$   
(ISOTEC)

### NMR buffer 2 ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMQC 測定の際に使用)

20 mM HEPES- $\text{d}_{18}$ -KOH, pH 7.0, 20  $\mu\text{M}$  leupeptin hemisulfate, 28  $\mu\text{M}$  E-64,  
200  $\mu\text{M}$  AEBSF, 99.8 % (v/v)  $^2\text{H}_2\text{O}$

NMR buffer 3 ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 測定の際に使用)

20 mM NaPi, pH 7.0, 20  $\mu\text{M}$  leupeptin hemisulfate, 28  $\mu\text{M}$  E-64, 200  $\mu\text{M}$  AEBSF, 99.8 % (v/v)  $^2\text{H}_2\text{O}$

0.05 % Trypsin/EDTA 溶液

0.05 % Trypsin/EDTA (Invitrogen), PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Cell lysis buffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 0.1 % (v/v) Nonidet P-40, 1 mM EDTA

cAMP buffer

1  $\times$  HBSS (Invitrogen), 5 mM HEPES, pH 7.4 (Invitrogen), 0.1 % BSA (Lance *Ultra* cAMP Kit (PerkinElmer) に付属), 100  $\mu\text{M}$  rolipram (Sigma-Aldrich), 100  $\mu\text{M}$  cilostamide (Sigma-Aldrich), 0.8 U/mL adenosine deaminase (Roche Diagnostics)

3 - 1 - 4 の cAMP 産生アッセイにおいては、上記のバッファーに 0.05 mM IBMX (Sigma-Aldrich) を追加したものを使用した。

## 2 - 2 培地組成

本実験では、以下のようにして調製した培地を用いた。特に断らない限り、試薬はすべて和光純薬またはナカライテスクより購入した。

### YPDS プレート

10 g yeast extract

20 g peptone

182.2 g sorbitol

2 g agar

以上を 900 mL H<sub>2</sub>O に溶解した。120 °C でオートクレーブした後、オートクレーブした 20 % (w/v) dextrose を 100 mL 加えてからプレートを作成した。

### 10 × yeast nitrogen base

34 g Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate (BD)

100 g NH<sub>4</sub>Cl

以上を 1 L H<sub>2</sub>O に溶解し、0.22 μm フィルター (Millipore) で滅菌濾過した。

### BMGY 培地

10 g yeast extract

20 g peptone

以上を 700 mL H<sub>2</sub>O に溶解してオートクレーブした後、以下のものを加えた。

100 mL 1 M potassium phosphate, pH 6.0 (オートクレーブしたもの)

100 mL 10 × yeast nitrogen base

2 mL 4 × 10<sup>-5</sup> % (w/v) biotin (0.22 μm フィルターで滅菌濾過したもの)

100 mL 10 % (v/v) glycerol (オートクレーブしたもの)

### BMMY 培地

上述の BMGY 培地に、100 mL 10 % (v/v) glycerol の代わりに、100 mL 5 % (v/v) methanol (0.22  $\mu$ m フィルターで滅菌濾過したもの) を加えた。

### BMG 培地

オートクレーブした 700 mL H<sub>2</sub>O に、以下のものを加えた。

100 mL 1 M potassium phosphate, pH 6.0 (オートクレーブしたもの)

100 mL 10 × yeast nitrogen base

2 mL 4 × 10<sup>-5</sup> % (w/v) biotin (0.22  $\mu$ m フィルターで滅菌濾過したもの)

100 mL 10 % (v/v) glycerol (オートクレーブしたもの)

### <sup>2</sup>H-BMG 培地

3.4 g Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate

5 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (99.7 % <sup>15</sup>N, 昭光通商)

10 mL glycerol

50 mL H<sub>2</sub>O

以上を 840 mL 99.8 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O に溶解し、0.22  $\mu$ m フィルターで滅菌濾過した後、以下のものを加えた。

100 mL 1 M potassium phosphate, pH 6.0, 99.8 % (v/v) <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (0.22  $\mu$ m フィルターで滅菌濾過したもの)

2 mL 4 × 10<sup>-5</sup> % (w/v) biotin (0.22  $\mu$ m フィルターで滅菌濾過したもの)

### LB 培地

5 g yeast extract

10 g tryptone

10 g NaCl

以上を 1 L H<sub>2</sub>O に溶解し、オートクレーブした。冷却後、0.22 μm フィルターで滅菌濾過した 100 mg/mL ampicillin・Na 溶液を 1 mL 加えた。

#### DMEM 培地

以下の溶液を混合した。

500 mL DMEM, High Glucose, no Glutamine (Invitrogen)

50 mL GlutaMAX (Invitrogen)

50 mL 組織培養用ウシ胎児血清 (Biowest)

50 mL Penicillin-Streptomycin, Liquid (Invitrogen)

## 2-3 *Pichia pastoris* を用いた A<sub>2A</sub> 受容体の発現と精製

### 2-3-1 *P. pastoris* 用の A<sub>2A</sub> 受容体発現コンストラクト

野生型ヒト A<sub>2A</sub> 受容体の発現コンストラクトは、修士課程までに調製したものをを用いた(近藤、修士論文、2012)。その概要としては、human spleen cDNA library から増幅したヒト A<sub>2A</sub> 受容体の M1 から A316 までに対応する cDNA 配列を、*P. pastoris* 発現用ベクター pPICZαA (Invitrogen) の EcoRI サイトと NotI サイトの間にライゲーションし、C 末端側に His<sub>10</sub> タグ配列または 1D4-epitope タグ配列 (TETSQVAPA) を付加した。

上記の野生型ヒト A<sub>2A</sub> 受容体の発現コンストラクトと QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technology) を用いて、変異体の発現コンストラクトを構築した。変異体発現プラスミドの塩基配列を、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により確認した。

### 2-3-2 *P. pastoris* の形質転換

前項の A<sub>2A</sub> 受容体発現コンストラクトを、エレクトロポレーション法[27]によって *P. pastoris* X-33 株 (Invitrogen) に導入した。形質転換した菌体を、抗生物質 Zeocin (Invitrogen) を 1 mg/mL の濃度で含む YPDP プレートに塗布し、30 °C にて 3 日間インキュベートすることでセレクションを行った。

### 2-3-3 小スケールでの A<sub>2A</sub> 受容体の発現と活性確認

形質転換後のシングルコロニーを 3 mL の BMGY 培地に懸濁し、29 °C で 3 日間振盪培養した。遠心分離によって回収した菌体を 3 mL の BMMY 培地に再懸濁して発現誘導を開始し、22 °C で 1 日間振盪培養した。回収した菌体を 500

μL の assay buffer に懸濁し、500 μL 分の 0.5 mm ガラスビーズ (TOMY) を加えて vortex した (30 秒間×8)。破碎されていない菌体を遠心分離 (20,400 × g, 1 分間) によって取り除き、上清を 400 μL の assay buffer で希釈した。これを膜画分懸濁液とした。

100 μL の膜画分懸濁液を 96 ウェルプレート (BD Biosciences) にアプライし、1 nM [<sup>3</sup>H]ZM241385 (American Radiolabeled Chemicals) または 10 nM [<sup>3</sup>H]NECA (PerkinElmer) を含む 100 μL の assay buffer を加えた。25 °C にて振盪しながら 1 時間インキュベートした後、試料をセルハーベスター (PerkinElmer) にセットし、Unifilter-96 GF/C (PerkinElmer) に吸着させた。冷却した assay buffer でフィルターを素早く洗浄し、50 °C で乾燥した。各ウェルに 20 μL の Optiphas Supermix (PerkinElmer) をアプライしてから MicroBeta<sup>2</sup> (PerkinElmer) を用いて放射活性を測定した。非特異的結合の影響を見積もるために、終濃度が 10 μM となるように ZM241385 (Tocris Bioscience) を添加したバッファーを用いて、同様の実験を行った。

## 2-3-4 大スケールでの A<sub>2A</sub> 受容体の発現

非標識 A<sub>2A</sub> 受容体の発現は、以下のように行った。シングルコロニーを 10 mL の BMGY 培地で 29 °C にて 2 日間前培養した。菌体を 2.5 L の BMGY 培地に懸濁し、3 L ジャーファーメンター (高杉製作所) を用いて 29 °C で培養した。培地中の炭素源の残存量を見積もるために、溶存酸素 (DO) メーター (丸菱バイオエンジニア) を用いて培地中の DO 濃度を計測した。グリセロールが枯渇して DO が急激に増加してから 30 分後に 0.5 % methanol と 10 mM theophylline (Sigma-Aldrich) を加え、22 °C にて発現誘導を開始した。DO の急激な増加が起こるたびに 0.5 % methanol を追加した。誘導開始から 1.5 日後に菌体を回収した。

菌体を cell suspension buffer に懸濁して液体窒素中で凍結し、後の実験に使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

均一  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の発現は、以下のようにして行った。まず、次のようにして菌体を重水に馴化させた。形質転換後のコロニーを 10 mL の BMG 培地に懸濁し、 $30^{\circ}\text{C}$  にて 2 日間培養した。回収した菌体を 90 % (v/v)  $^2\text{H}_2\text{O}$  を含む 10 mL の BMG 培地に再懸濁し、2 日間培養した。再び回収した菌体を 95 % (v/v)  $^2\text{H}_2\text{O}$  を含む 10 mL の BMG 培地に懸濁し、2 日間培養した。その菌体を 99.8 % (v/v)  $^2\text{H}_2\text{O}$  を含む 10 mL の BMG 培地に懸濁してさらに 2-3 日間培養し、これを重水馴化後の菌体とした。重水馴化後の菌体を 1 L の  $^2\text{H}$ -BMG 培地に懸濁し、ジャーファーマンターを用いて  $29^{\circ}\text{C}$  にて 3 日間培養した。菌体を回収し、グリセロールを含まない  $^2\text{H}$ -BMG 培地に懸濁して再び培養した。2 時間後、0.5 % methanol- $\text{d}_4$  (99.8 %  $^2\text{H}$ , Cambridge Isotope Laboratories) と 10 mM theophylline を加え、 $22^{\circ}\text{C}$  にて発現誘導を開始した。誘導開始から 18 時間後に 0.5 % methanol- $\text{d}_4$  を追加し、36 時間後に菌体を回収した。菌体を cell suspension buffer に懸濁して液体窒素中で凍結し、後の実験に使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

均一  $^2\text{H}$ , メチル  $^{13}\text{C}$  メチオニン標識  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体を発現させる場合は、発現誘導の開始時にメチオニン生合成阻害物質 (1 g/L lysine, 1 g/L threonine, 0.5 g/L isoleucine) と 500 mg/L [ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ - $^2\text{H}_3$ , methyl- $^{13}\text{C}$ ] methionine (2 - 8 - 2 を参照) を加えた。

## 2 - 3 - 5 リガンドアフィニティー精製用レジン XAC-agarose の調製

25 mg の xanthine amine congener (XAC, Sigma-Aldrich) を終濃度 0.5 mg/mL になるように DMSO (同仁化学研究所) に溶かした。10 mL の Affi-gel 10



(Bio-Rad) をガラスフィルターに乗せ、氷冷した isopropanol と DMSO で順に洗浄した。洗浄後のゲルに XAC 溶液を加えて、室温で終夜ゆっくりと振盪した。ゲルを DMSO と氷冷した blocking buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) で順に十分に洗浄した。ゲルを 25 mL の blocking buffer に懸濁し、4 °C で 24 時間ゆっくりと振盪した。20 % (v/v) ethanol で十分に洗浄後、ゲルを 20 % (v/v) ethanol に懸濁して 4 °C で保存した。XAC とゲルの反応効率を、反応前後の XAC 溶液の 10 mM HCl 存在下での吸光度の差から見積った。

## 2 – 3 – 6 A<sub>2A</sub> 受容体の精製

以下の操作はすべて氷上または 4 °C で行った。

### 膜画分の調製

凍結した菌体を室温で解凍し、0.5 mm ジルコニアビーズ (BioSpec Products) と BeadBeater (BioSpec Products) を用いて破碎した (30 秒間×12)。破碎後の試料に glycerol を終濃度 10 % (v/v) になるように加えた。懸濁液を低速遠心 (10,500 × g, 5 分間) して未破碎の細胞や細胞破片を取り除いた後、上清を高速遠心 (150,000 × g, 1 時間) して細胞膜を沈殿させた。上清を取り除き、ペレットを membrane suspension buffer でリンスした後、6–7 mL 程度の液量になるように membrane suspension buffer を加えてからシリンジ針 (テルモ、21G) に通して懸濁した。この懸濁液をすぐに使用しない場合は、液体窒素で凍結させて –80 °C で保存した。

### 可溶化

凍結した膜画分懸濁液を氷上に静置して解凍した。membrane suspension buffer に溶かした theophylline を終濃度 4 mM になるように加え、液量が 10–12 mL

になるように調節後、氷上で 30 分間インキュベートした。等量の solubilization buffer D を加えて 4 時間穏やかに攪拌した。攪拌後の試料を遠心 ( $150,000 \times g$ , 30 分間) して不溶物を取り除いた。遠心の上清を直ちに次の精製に用いた。

His<sub>10</sub> タグを利用した IMAC 精製

His<sub>10</sub> タグ付き A<sub>2A</sub> 受容体は次のようにして精製した。可溶化後の試料に 0.5 mL の TALON Metal Affinity Resin (Takara Bio) と 5 mM imidazole を加えて一夜穏やかに攪拌した。試料をムロマックカラム（室町科学、M サイズ）にアプ  
ライして素通り画分を除去し、15 mL の purification buffer D + 5 mM imidazole をア  
プライして洗浄した。5 mL の purification buffer D + 220 mM imidazole をアプ  
ライし、溶出画分を回収した。

## 1D4-epitope タグを利用した抗体アフィニティー精製

1D4-epitope タグ付き A<sub>2A</sub> 受容体は以下のようにして精製した。可溶化後の上清に 1 mL の Rho 1D4 抗体カップリング Sepharose (近藤、修士論文、2012) を加えて 5 時間程度穏やかに攪拌した。レジンを Econo-Pac ディスポーザブルカラム (Bio-Rad) に詰めした後、50 mL の purification buffer をアプライして洗浄した。レジンを 0.4 mg/mL の 1D4 ペプチド (NH<sub>2</sub>-TETSQVAPA-COOH, 東レリサーチセンター) を含む 3 mL の purification buffer D に懸濁し、終夜穏やかに攪拌することで溶出させた。

リガンドアフィニティー精製

IMAC 精製または抗体アフィニティー精製後の試料に 0.5 mL の XAC-agarose を加えて、4 時間程度穏やかに攪拌した。試料を Econo-Pac ディスポーザブルカラムにアプライして素通り画分を除去し、5 mL の purification buffer

D をアプライして洗浄した。レジンを 4 mL の purification buffer D + 30 mM theophylline に懸濁して終夜攪拌した。その溶出液を回収した後、レジンを再び 4 mL の purification buffer D + 30 mM theophylline に懸濁して 1 時間以上攪拌し、溶出液を回収した。この溶出液を次の実験にすぐ使用しない場合は、液体窒素で凍結させてから $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

精製後の  $A_{2A}$  受容体の定量は、EZQ Protein Quantitation Kit (Invitrogen) を用いて行った。

### 界面活性剤の交換

リガンドアフィニティー精製後の試料に 0.3 mL の TALON Metal Affinity Resin を加えて、 $4^{\circ}\text{C}$  にて穏やかに振盪しながら 2 時間程度インキュベートした。懸濁液をムロマックカラム (M サイズ) にアプライして素通り画分を除去した後、目的のリガンドを含む solubilization buffer M を 1 時間以上かけて合計 5 mL アプライすることで界面活性剤を交換した。続いて、目的のリガンドを含む purification buffer M を 10 カラム体積以上アプライして洗浄した。目的のリガンドを含む purification buffer M + 220 mM imidazole を 1.2 mL アプライし、その溶出画分を回収した。

## 2-4 リガンド結合アッセイ

オルソステリックリガンドの結合アッセイは、次のようにして行った。リガンドアフィニティー精製後の 1D4-epitope タグ付き  $A_{2A}$  受容体 (15 nM) の溶液 75  $\mu\text{L}$  に、0.2–200 nM [ $^3\text{H}$ ]ZM241385 を含む 25  $\mu\text{L}$  の purification buffer D を混合し、氷上で 1 時間インキュベートした。混合液をゲル濾過カラム NAP-5 (GE

healthcare) にアプライし、 $A_{2A}$  受容体と [ $^3H$ ]ZM241385 の複合体を回収した。200  $\mu L$  の試料と 400  $\mu L$  の Optiphase Supermix を混合し、MicroBeta (PerkinElmer) で測定した。また、非特異的結合の影響を見積もるため、12.5  $\mu M$  ZM241385 を添加したバッファーを用いて同様の実験を行った。得られたデータを one-site binding モデルによってフィッティングした[28]。

アミロライドの結合アッセイは、次のようにして行った。リガンドアフィニティー精製後の 1D4-epitope タグ付き  $A_{2A}$  受容体を、20 mM HEPES-KOH, pH 7.0, 1.25 % (w/v) MNG-3, 0.25 % (w/v) CHS で 5 倍希釈し、氷上で 2 時間インキュベートした。NAP-5 を用いて脱塩してから AmiconUltra-4 (MWCO 30k, Millipore) で濃縮した。得られた試料に 7 nM [ $^3H$ ]ZM241385 と 0.9 nM–0.9  $\mu M$  アミロライドを添加し、全体の液量が 100  $\mu L$  になるように調節してから氷上で 2 時間インキュベートした。試料を NAP-5 にアプライして B/F 分離した。300  $\mu L$  の溶出液と 600  $\mu L$  の Optiphase Supermix を混合し、MicroBeta<sup>2</sup> を用いて測定した。得られたデータを one-site competition binding モデルにフィッティングし、見かけの阻害定数 Cheng-Prusoff 式を用いて算出した。

## 2 – 5 $A_{2A}$ 受容体の経時的安定性の検討

リガンドアフィニティー精製後の 1D4-epitope タグ付き  $A_{2A}$  受容体のバッファーを、NAP-5 を用いて NMR buffer 3 (0.05 % (w/v) DDM, 0.01 % (w/v) CHS を含む) に交換した。150 nM [ $^3H$ ]ZM241385 を添加し、25 °C で 10.5 時間インキュベートした。インキュベート前後の試料をそれぞれ NAP-5 にアプライし、B/F 分離した。以降の操作は、前項と同様にして行った。非特異的結合の影響を見積もるために、25  $\mu M$  ZM241385 存在下で同様の実験を行った。

## 2-6 A<sub>2A</sub> 受容体の生化学的解析

### 2-6-1 HEK293T 細胞用の発現コンストラクトの構築

非構造形成領域である C 末端領域 (A317-S412) を deletion した A<sub>2A</sub> 受容体の cDNA を pcDNA3.1/Zeo (+) (Invitrogen) ベクターの BamHI サイトと EcoRI サイトの間に挿入した。QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit を用いて、A<sub>2A</sub> 受容体の cDNA の 5'側に Kozak 配列 (gacacc)、開始コドン (atg)、FLAG タグ配列 (gactacaaggacgacgacgacaag) を順に付加した。

### 2-6-2 細胞継代とトランスフェクション

HEK293T 細胞を 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 存在下で DMEM 培地中にて培養した。2, 3 日おきに細胞を 0.05 % Trypsin/EDTA 溶液で処理して回収し、15 倍程度希釈してから 9.6 cm<sup>2</sup> のウェルに継代した。

トランスフェクションを行うために、細胞を 1-2 × 10<sup>5</sup> cells/well の濃度で播種して 1 日間 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 中でインキュベーションした。A<sub>2A</sub> 受容体発現コンストラクト 1 μg と FuGENE6, DMEM の混合物を室温にて 30 分間程度インキュベートした後ウェルに滴下し、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 中で培養した。

### 2-6-3 発現の確認

#### フローサイトメトリー解析

トランスフェクションから 24 時間後に、0.05 % Trypsin/EDTA 溶液で処理して細胞を回収した。遠心して上清を捨てた後 PBS で細胞を懸濁し、再度遠心して上清を捨てた。500 倍希釈したマウス由来抗 FLAG M2 モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) を含む 30 μL の PBS に細胞を懸濁して氷上で 15 分間インキュ

ベートしてから遠心し、回収した細胞を PBS で洗浄した。100 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識ロバ由来抗マウス IgG を含む 30  $\mu$ L の PBS に細胞を懸濁し、遮光しながら氷上で 10 分間インキュベートした。遠心して上清を捨て、PBS で洗浄してから Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter) を用いて蛍光強度を測定した。

#### ウェスタンブロッティング解析

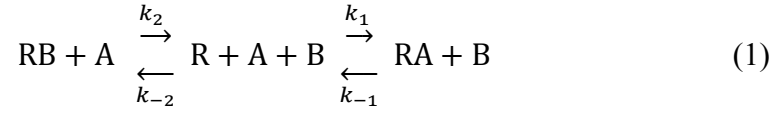
トランスフェクションから 24 時間後に回収した細胞を cell lysis buffer に再懸濁して氷上で 10 分間インキュベートした。懸濁液を遠心して上清と沈殿に分けた。両者を 12 % SDS-PAGE ゲルにアプライし、40 mA の定電流を 45 分間流して電気泳動した。ゲルを Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) にセットし、Towbin buffer を用いたセミドライ法によって、200 mA の定電流を流しながら 30 分間かけて PVDF メンブレン (Bio-Rad) に転写した。転写後のメンブレンを blocking buffer 中にて室温で 2 時間穏やかに振盪した。メンブレンを TBST で洗浄し、500 倍希釈したマウス由来抗 FLAG M2 モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) を含む antibody buffer 中で終夜穏やかに振盪した。メンブレンを TBST で 2 回洗浄し、5000 倍に希釈した HRP 標識抗マウス抗体 (GE Healthcare) と 5000 倍希釈した CPK1070 S-protein (GE Healthcare) を含む antibody buffer 中で 2 時間穏やかに振盪した。メンブレンを TTBS と TBS で洗浄後、ECL Prime (GE Healthcare) でバンドを発光させ、AE9300 Ez-Capture MG (ATTO) で撮影した。

#### 2-6-4 リガンド解離アッセイの定式化

リガンド解離アッセイは、アロステリックモジュレーターを検出するための手法としてしばしば用いられてきた[29]。このアッセイでは、受容体と  $^3\text{H}$  標識オルソステリックリガンドの結合が平衡状態にある系に過剰量の拮抗薬を加えたときに起こるオルソステリックリガンドの解離を、アロステリックモジ

モジュレーター存在下と非存在下でモニターする。オルソステリックリガンドの解離速度の変化を解析することで、アロステリックモジュレーターの作用の強さを評価する。そこで本研究では、アミロライドの結合部位を同定するための変異体解析においてこの手法を用いることにした。以下では、定量的に解析を行うために、このアッセイにおいて起こるリガンドの解離を定式化した[30]。

受容体 R とオルソステリックリガンド A、および A の拮抗薬 B が存在するとき、R と A, B の結合は次のように表すことができる：



$k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}$  はそれぞれ結合速度または解離速度である。このとき、複合体 RA, RB の濃度  $[\text{RA}], [\text{RB}]$  の時間変化は以下の式で表される：

$$\frac{d}{dt}[\text{RA}] = k_1[\text{R}][\text{A}] - k_{-1}[\text{RA}] \quad (2)$$

$$\frac{d}{dt}[\text{RB}] = k_2[\text{R}][\text{B}] - k_{-2}[\text{RB}] \quad (3)$$

(2), (3) 式を変形して

$$\frac{d}{dt}[\text{RA}] = k_1(R_t - [\text{RA}] - [\text{RB}])[\text{A}] - k_{-1}[\text{RA}] \quad (4)$$

$$\frac{d}{dt}[\text{RB}] = k_2(R_t - [\text{RA}] - [\text{RB}])[\text{B}] - k_{-2}[\text{RB}] \quad (5)$$

ここで、 $R_t$  は受容体 R の総濃度である。今、受容体 R に対してリガンド A と B はどちらも過剰量存在しており、 $[\text{A}], [\text{B}]$  の時間変化は  $[\text{RA}], [\text{RB}]$  の時間変化に対して無視できるものとする。(4), (5) 式の両辺をラプラス変換すると

$$sF(s) - [\text{RA}]_0 = \frac{k_1 R_t [\text{A}]}{s} - k_1 [\text{A}] F(s) - k_{-1} F(s) \quad (6)$$

$$sG(s) - [\text{RB}]_0 = \frac{k_2 R_t [\text{B}]}{s} - k_2 [\text{B}] G(s) - k_{-2} G(s) \quad (7)$$

となる。 $F(s)$  と  $G(s)$  はそれぞれ  $[\text{RA}]$  と  $[\text{RB}]$  のラプラス変換、 $[\text{RA}]_0$  と  $[\text{RB}]_0$  はそれぞれ時刻  $t = 0$  での RA と RB の濃度である。リガンド解離アッセイにおいては

$[RB]_0 = 0$ である。また、簡単のため $[RA]_0 \cong R_t$ とする。(6) 式を $G(s)$ について解いて(7) 式に代入し、 $K_A = k_1[A] + k_{-1}$ ,  $K_B = k_2[B] + k_{-2}$ とおくと

$$-[RA]_0 + (s + K_A)F(s) = \frac{k_1[A]R_t}{s} - \frac{k_1k_2[A][B]R_t}{(s + K_B)s} - \frac{k_1k_2[A][B]F(s)}{s + K_B} \quad (8)$$

となる。(8) 式を $F(s)$ について解くと

$$F(s) = \frac{k_1[A]R_t}{(s + K'_A)(s + K'_B)} - \frac{k_1k_{-2}[A]R_t}{s(s + K'_A)(s + K'_B)} - \frac{(s + K_B)[RA]_0}{(s + K'_A)(s + K'_B)} \quad (9)$$

になる。ただし、

$$K'_A = \frac{K_A + K_B - \sqrt{(K_B - K_A)^2 + 4k_1k_2[A][B]}}{2} \quad (10)$$

$$K'_B = \frac{K_A + K_B + \sqrt{(K_B - K_A)^2 + 4k_1k_2[A][B]}}{2} \quad (11)$$

である。(9) 式の両辺を逆ラプラス変換することにより $[RA]$ が求められる：

$$\begin{aligned} [RA] = \frac{R_t}{K'_B - K'_A} & \left[ \left( k_1[A] - \frac{k_1k_{-2}[A]}{K'_A} + K_B - K'_A \right) e^{-K'_A t} \right. \\ & \left. - \left( k_1[A] - \frac{k_1k_{-2}[A]}{K'_B} + K_B - K'_B \right) e^{-K'_B t} \right] \\ & + \frac{k_1k_{-2}[A]R_t}{K'_AK'_B} \end{aligned} \quad (12)$$

(12) 式がオルソステリックリガンド A の解離を記述する理論式である。

本研究ではオルソステリックリガンド A として逆アゴニスト  $[^3H]ZM241385$ 、過剰量の拮抗薬 B として非標識 ZM241385 を用いる。両者の解離定数は約 0.95 nM であり、 $[^3H]ZM241385$  の濃度 $[A]$ は解離定数と同程度、ZM241385 の濃度 $[B]$ は解離定数の 1000 倍程度とする。このとき

$$\begin{aligned} k_1 &= k_2, k_{-1} = k_{-2} \\ k_1 &\gg k_{-1}, k_2 \gg k_{-2} \\ [A] &\cong \frac{k_{-1}}{k_1} \cong \frac{1}{1000} [B] \end{aligned} \quad (13)$$

文献では $k_{-1} = 0.24 \text{ min}^{-1}$ 程度であることが報告されている[21]。(13) 式より

$$K'_B - K'_A = \sqrt{(K_B - K_A)^2 + 4k_1k_2[A][B]} \approx 240 \quad (14)$$



よって、アッセイの時間範囲では

$$e^{-K'_A t} \gg e^{-K'_B t} \quad (15)$$

である。また、(12) 式の指数部分の係数について

$$\begin{aligned} \frac{\left(k_1[A] - \frac{k_1 k_{-2}[A]}{K'_A} + K_B - K'_A\right)}{K'_B - K'_A} &= 1.0009 \dots \\ \frac{\left(k_1[A] - \frac{k_1 k_{-2}[A]}{K'_B} + K_B - K'_B\right)}{K'_B - K'_A} &= 0.000000997 \dots \end{aligned} \quad (16)$$

(15), (16) 式より、(12) 式の  $e^{-K'_B t}$  の項は  $e^{-K'_A t}$  の項と比較して無視できる。そこで、(12) 式を簡略化して

$$[RA] \approx A e^{-K'_A t} + C_0 \quad (17)$$

と書く。 $e^{-K'_A t}$  の係数と定数項をそれぞれ  $A$ ,  $C_0$  とおいた。(17) 式にデータをフィッティングすることで、見かけの解離定数を求めることができる。

また、(10) 式から

$$K'_A = \frac{K_A + K_B}{2} - \frac{K_B}{2} \sqrt{1 - \frac{2K_A}{K_B} + \frac{K_A^2}{K_B^2} + \frac{4k_1 k_2 [A][B]}{K_B^2}} \quad (18)$$

であり、その第二項を一次までのテイラー展開で近似すると

$$K'_A \cong \frac{K_A + K_B}{2} - \frac{K_B}{2} \left[ 1 + \frac{1}{2} \left( -\frac{2K_A}{K_B} + \frac{K_A^2}{K_B^2} + \frac{4k_1 k_2 [A][B]}{K_B^2} \right) \right] \quad (19)$$

となる。右辺を整理して

$$K'_A \cong k_{-1} + \frac{4k_1 k_2 [A] - K_A^2}{2K_B} \quad (20)$$

今回のアッセイ条件下では、(20) 式の第二項は第一項と比較して無視できる。

よって、見かけの解離速度  $K'_A$  は拮抗薬 B の濃度や解離速度、結合の強さの影響をほとんど受けないことが分かる。

## 2-6-5 膜画分を用いたリガンド解離アッセイ

トランスフェクションから 48 時間後に回収した細胞を assay buffer に懸濁し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (EDTA-free) を加え、1 mm ジルコニアビーズ (TOMY) を混合して vortex することで破碎した。25  $\mu$ L の破碎液を 96 ウェルプレートにアプライし、4 nM [ $^3$ H]ZM241385 または 80 nM [ $^3$ H]NECA を含む 25  $\mu$ L の assay buffer と混合して 30–60 分間インキュベートした。そこに 8  $\mu$ M ZM241385 または 26.6  $\mu$ M NECA を含む 50  $\mu$ L の assay buffer を添加し、 $^3$ H 標識リガンドの解離を開始した。適当な時間が経過した後、セルハーベスター (PerkinElmer) を用いて膜画分を Unifilter-96 GF/C に吸着させ、冷却した assay buffer で素早く洗浄した。フィルターを 50  $^{\circ}$ C で 1 時間以上乾燥してから 20  $\mu$ L の Optiphase Supermix を混合し、MicroBeta<sup>2</sup> を用いて放射活性を測定した。リガンド解離の開始に用いるバッファーに 1 mM アミロライドまたは 100  $\mu$ M HMA を添加して、同様の操作を行った。非特異的な結合を見積もるために、4  $\mu$ M ZM241385 または 13.3  $\mu$ M NECA を加えて 1–2 時間インキュベートした膜画分の放射活性を同様に測定した。

得られたデータから、Levenberg-Marquardt 法を用いたカーブフィッティングにより [ $^3$ H]ZM241385 または [ $^3$ H]NECA の解離速度を求めた。

## 2-6-6 cAMP 産生アッセイ

トランスフェクションから 48 時間後に細胞を回収し、cAMP buffer に懸濁した。cAMP の定量は、LANCE Ultra cAMP Kit のプロトコールに従って行った。具体的には、まず 5  $\mu$ L の細胞懸濁液を Optiplate-384 (PerkinElmer) に分注し、各種リガンドを含む cAMP buffer を添加して室温で 30 分インキュベートした。0.35 % TritonX-100 を含むバッファーで細胞を可溶化して反応を停止させた後、

Eu-cAMP 溶液と ULight 標識抗体溶液を加えて遮光しながら 1 時間インキュベートした。EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer) を用いて蛍光を検出した (励起 340 nm、検出 615 nm/665 nm)。得られたデータを four-parameter logistic 関数にフィッティングした。

## 2 - 7 ドッキング解析

ドッキングシミュレーションのソフトウェアには、Scripps 研究所の A. J. Olson 研究室から配布されている AutoDock 4.2 を用いた[31]。受容体の構造として、逆アゴニスト ZM241385 結合状態 A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造 (PDB ID: 4EIY) を用いた。水素原子と電荷をコンピュータ内で付加した。結晶構造内の水、イオン、脂質分子は取り除いた。W246 側鎖は flexible に、他の残基は rigid に設定した。リガンドの単結合の回転を自由に变化できるようにした。A<sub>2A</sub> 受容体とリガンドの位置関係を遺伝的アルゴリズムに従って変化させ、各状態での自由エネルギーを計算することでコンフォメーションを最適化した。最終的に得られた 100 個のコンフォメーションのうち、最もエネルギーの小さいものを採用した。

## 2 - 8 [ $\alpha$ , $\beta$ , $\beta$ -<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, methyl-<sup>13</sup>C] methionine の調製

[ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, methyl-<sup>13</sup>C] methionine の調製は、文献[32]を参考にして行った。

### 2 - 8 - 1 *E. coli* cystathionine $\gamma$ -synthase の調製

N 末端に His<sub>6</sub> タグを付加した *E. coli* cystathionine  $\gamma$ -synthase (eCGS) の

cDNA を pET15b (Novagen) に組み込んだ発現コンストラクトを幸福裕特任助教よりお譲りいただいた。その発現コンストラクトを *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus に導入し、得られたシングルコロニーを 5 mL の LB 培地で 37 °C にて終夜培養した。2 L 振盪フラスコに入れた 1 L の LB 培地に菌体を希釈してさらに培養した。OD<sub>600</sub> = 0.8 に達したときに 1 mM IPTG を加えて培養を続け、8 時間後に回収した。回収した菌体を eCGS buffer に懸濁して超音波破碎した。14,000 × g で 30 分間、4 °C にて遠心分離して得られた上清に、1 L 培地あたり 3 mL の HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) を加えて 4 °C にて 2 時間穏やかに振盪した。レジンに 10 カラム体積の eCGS buffer で洗浄した。50 mM imidazole を含む eCGS buffer を 5 カラム体積だけアプライして溶出させた。溶出液を Vivaspin 20 (MWCO 100k, GE Healthcare) で濃縮し、同時にバッファーを deuteration buffer に交換した。280 nm の吸光により定量し、最終的な濃度を 5 mg/mL にした。モル吸光係数は 25900 として計算した。

## 2-8-2 eCGS によるメチオニンの <sup>2</sup>H 標識

deuteration buffer に [methyl-<sup>13</sup>C] methionine (99 % methyl-<sup>13</sup>C, ISOTEC および Cambridge Isotope Laboratories) を 30 mg/mL の濃度で溶かし、さらに eCGS を終濃度 0.5 mg/mL となるように加えた。この反応液を 37 °C で終夜インキュベートした。反応効率を確かめるために、TCI クライオプローブを装着した Avance 800 分光器で反応液を NMR 測定した。

調製した [α, β, β-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, methyl-<sup>13</sup>C] methionine を A<sub>2A</sub> 受容体の標識に用いる場合には、上記の反応液を直接培地に加えた。

## 2-9 A<sub>2A</sub> 受容体の NMR 測定

高い運動性をもつ N 末端領域にある M1 と M4 は、活性には関与しない一方で、他の残基より顕著に強いシグナルを与えて解析を妨げるおそれがある。そこで、本研究のすべての NMR 解析では、M1A/M4T 変異を施した A<sub>2A</sub> 受容体を用いた。

均一 <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N 標識 A<sub>2A</sub> 受容体の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY または <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N CRINEPT-HMQC-TROSY 解析は、以下のようにして行った。精製後の A<sub>2A</sub> 受容体のバッファーを、AmiconUltra (MWCO 30k) を用いて目的のリガンドを含む NMR buffer 1 に交換し、250 μL になるまで濃縮した。直径 5 mm のマイクロセル (シゲミ) にサンプルを封入し、シリンジを用いて脱気した。測定には TCI クライオプローブを装着した Avance 800 分光器または Avance 950 分光器 (Bruker Biospin) を用いた。測定温度は、別途記載がない場合は 25 °C とした。

均一 <sup>2</sup>H, メチル <sup>13</sup>C メチオニン標識 A<sub>2A</sub> 受容体の <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC 解析の際は、交換するバッファーに NMR buffer 2 (MNG-3 に可溶化した A<sub>2A</sub> 受容体の場合) または NMR buffer 3 (DDM に可溶化した A<sub>2A</sub> 受容体の場合) を用いた。その他の手順は、均一 <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N 標識 A<sub>2A</sub> 受容体の場合と同じようにして行った。

リガンドには、逆アゴニストとして ZM241385 (100 μM, Tocris Bioscience) を、部分アゴニストとして regadenoson (100 μM, Toronto Research Chemicals) と 2-(1-hexynyl)adenosine (200 μM, 2-10 の方法で合成), LUF5834 (50 μM, Tocris Bioscience)、アゴニストとして UK-432097 (25 μM, Axon Medchem) と NECA (100 μM, Tocris Bioscience) を、アロステリックモジュレーターとしてアミロライド (2 mM, Sigma-Aldrich) と HMA (1 mM, Sigma-Aldrich) を用いた。

測定条件は次のように設定した。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY および CRINEPT-HMQC-TROSY 測定の場合、<sup>1</sup>H 方向と <sup>15</sup>N 方向それぞれについて中心

周波数を 4.7 ppm と 121 ppm、スペクトル幅を 16 ppm と 30 ppm、ポイント数を 1024 と 64 とした。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 測定は、 $^1\text{H}$  方向と  $^{13}\text{C}$  方向それぞれについて中心周波数を 4.7 ppm と 11.5–24 ppm、スペクトル幅を 16 ppm と 8–32 ppm、ポイント数を 2048 と 128–256 として行った。

NMR 測定後のリガンド交換は、以下のようにして行った。まず、NMR サンプルを NAP-5 にアプライし、目的のリガンドを含む purification buffer D または purification buffer M にバッファー交換した。その溶出液に 0.3 mL の TALON Metal Affinity Resin を加え、4 °C で 2 時間以上穏やかに攪拌した。レジンをムロマックカラム (M サイズ) に詰めた後、目的のリガンドを含むバッファーで 1 時間以上かけて洗浄した。その後の操作は、前述の方法に従って行った。

A<sub>2A</sub> 受容体のメチオニン残基の帰属と M211 のオルソステリックリガンド (LUF5834 を除く) 依存的な化学シフト変化の解析には、DDM に可溶化した試料を用いた。その他の測定には、MNG-3 に可溶化した試料を用いた。

## 2 – 1 0 部分アゴニスト 2-(1-hexynyl)adenosine の合成

以下の試薬をナスフラスコ中で混合し、遮光しながら室温にて終夜攪拌した。

1.96 mL acetonitrile (> 99 %) (和光純薬工業)

1.96 mL Et<sub>3</sub>N (> 98.0 %) (和光純薬工業)

100 mg 2-iodoadenosine (> 98.0 %) (東京化成工業)

4.0 mg CuI (I) (99.5 %) (和光純薬工業)

2.5 mg PdCl<sub>2</sub> (II) (> 98.0 %) (和光純薬工業)

7.4 mg Ph<sub>3</sub>P (97 %) (和光純薬工業)

142  $\mu$ L 1-hexyne (97.0 %) (和光純薬工業)

エバポレーターを用いて溶液を蒸発させ、残渣を少量のアセトニトリルに溶解した。試料をムロマックカラム (S サイズ) に通して不溶物を取り除いた後、逆相 HPLC (島津製作所) によって精製した。カラムには YMC-Pack ODS-AM-323 (ワイエムシィ) を用いた。移動相としてアセトニトリルを用いて、流速 2.0 mL/min で定組成溶離させた。

得られた 2-(1-hexynyl)adenosine を MALDI-TOFMS によって解析した。逆速 HPLC の溶出画分 1  $\mu$ L をサンプルプレートに載せ、そこに 0.1 % TFA と飽和濃度の CHCA を含む 1  $\mu$ L のアセトニトリルを加えた。乾燥後、MALDI TOFMS AXIMA (島津製作所) を用いて解析した。

また、逆速 HPLC の溶出画分を凍結乾燥して溶媒を蒸発させ、DMSO- $d_6$  (99.9 %  $^2H$ , ISOTEC) に再度溶かした後、TXI クライオプローブを装着した Avance500 分光器 (Bruker Biospin) を用いて  $^1H$ -NMR スペクトルを測定した。

## 第3章 結果

### 3-1 試料調製

本節では、NMR 解析および生化学的解析に用いるヒト A<sub>2A</sub> 受容体の発現と精製、活性の確認を行った。また、A<sub>2A</sub> 受容体の部分アゴニストである 2-(1-hexynyl)adenosine の合成を行った。

#### 3-1-1 *P. pastoris* を用いた A<sub>2A</sub> 受容体の発現と精製

膜蛋白質が活性を保った状態で発現されるためには、生合成された膜蛋白質が細胞膜に輸送される必要がある。真核生物である *P. pastoris* を発現ホストに用いる場合、発現産物の N 末端側に分泌シグナル  $\alpha$ -factor を付加すると細胞膜への輸送が起こるようになる。そこで、構造非形成領域の A317-S412 を欠損させた A<sub>2A</sub> 受容体の cDNA を pPICZ $\alpha$ A ベクターの  $\alpha$ -factor 配列の下流にライゲーションし、エレクトロポレーション法によって *P. pastoris* に組み込んだ (図 6)。

発現誘導後の細胞を破碎して膜画分を調製し、界面活性剤を用いて可溶化した。可溶化後の試料を、A<sub>2A</sub> 受容体の C 末端に付加した His<sub>10</sub> タグまたは 1D4-epitope タグを利用したアフィニティー精製にかけた。その精製物をリガンドアフィニティー精製にかけることで、リガンド結合活性を保った A<sub>2A</sub> 受容体を得た。

最終精製後の A<sub>2A</sub> 受容体を SDS-PAGE で解析したところ、単一バンドが得られるまで精製されていることが確認された (図 7)。収量は培地 1 リットルあたり約 0.8 mg と見積もった。



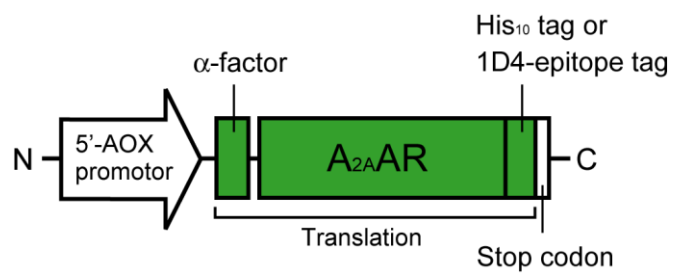


図 6 本研究で用いた *P. pastoris* 用 A<sub>2A</sub> 受容体発現コンストラクトの模式図。

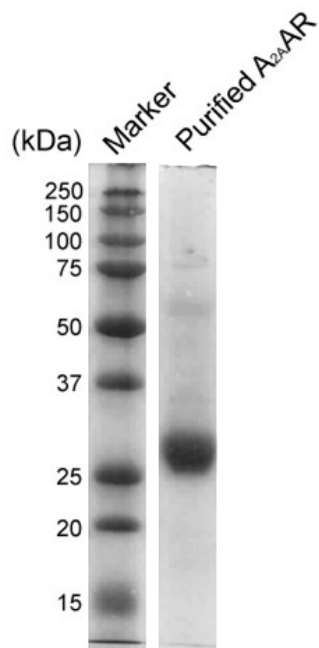


図 7 精製した A<sub>2A</sub> 受容体の SDS-PAGE 解析。

*P. pastoris* 発現系を用いて発現した A<sub>2A</sub> 受容体を可溶化および精製し、SDS-PAGE で解析した (CBB 染色)。

### 3-1-2 A<sub>2A</sub> 受容体の活性の確認

#### オルソステリックリガンドおよびアミロライドに対する結合活性の確認

精製した A<sub>2A</sub> 受容体のオルソステリックリガンド活性が保たれていることは、修士課程までの研究において確認していた（近藤、修士論文、2012）。具体的には、飽和リガンド結合アッセイによって逆アゴニスト [<sup>3</sup>H]ZM241385 の特異的結合を検出し、その解離定数を約 36.6 nM と算出した（図 8）。この値は文献値[33]と同程度であったことから、精製した受容体が活性を保っていると結論した。

さらに本研究では、精製した A<sub>2A</sub> 受容体がアミロライドに対する結合活性を保っているかを調べるために、アミロライド依存的な [<sup>3</sup>H]ZM241385 結合阻害実験を行った。その結果、アミロライドの濃度依存的に [<sup>3</sup>H]ZM241385 の結合量が減少するのが確認された（図 9）。このことから、精製した受容体がアミロライドへの結合活性も保っていると結論した。このアッセイの条件下におけるアミロライドの見かけの解離定数を約 80 μM と算出した。

これらの結果から、NMR による構造生物学的な解析を行うのに十分な精製度で A<sub>2A</sub> 受容体は精製され、活性も保持していると結論した。

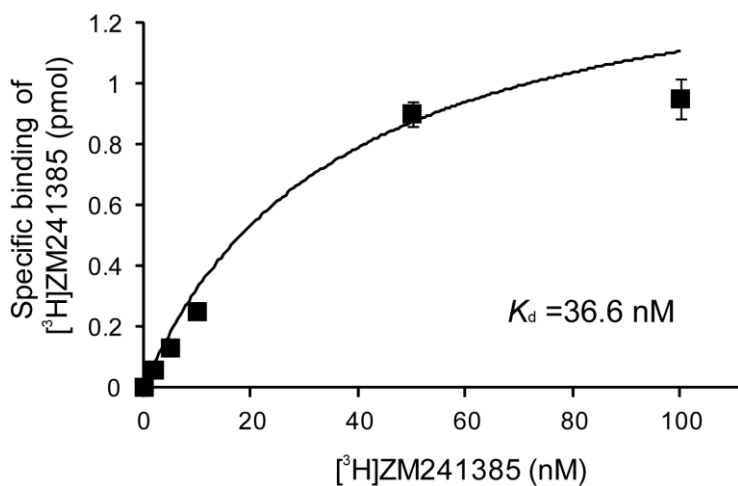


図 8 精製した  $A_{2A}$  受容体のオルソステリックリガンド結合活性の確認。

精製した  $A_{2A}$  受容体の逆アゴニスト [<sup>3</sup>H]ZM241385 に対する結合活性を調べた（近藤、修士論文、2012）。横軸は [<sup>3</sup>H]ZM241385 の濃度、縦軸は特異的な [<sup>3</sup>H]ZM241385 結合量を示している。データは one-site binding モデルによってフィッティングした。

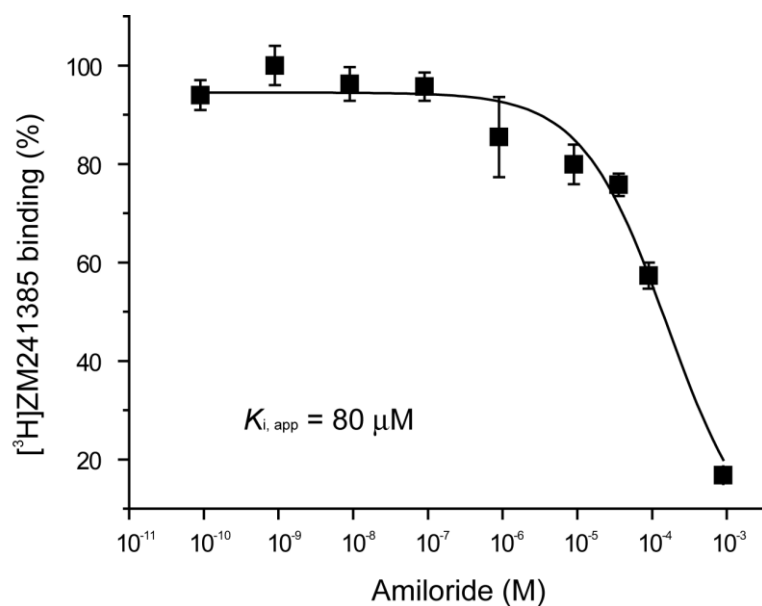


図 9 精製した  $A_{2A}$  受容体に対するアミロライドの結合活性の解析。

アミロライドによる逆アゴニスト [<sup>3</sup>H]ZM241385 の結合阻害実験を行った。横軸はアミロライドの濃度、縦軸は [<sup>3</sup>H]ZM241385 結合量の割合を示している。データは one-site competition モデルによってフィッティングし、見かけの解離定数を Cheng-Prusoff 式によって求めた。

## 経時的安定性の確認

調製した A<sub>2A</sub> 受容体の構造解析を行うためには、NMR 測定にかかる時間（10 時間程度）において試料が活性を保って安定していることが必要である。そこで、精製後の A<sub>2A</sub> 受容体の経時的な安定性を評価することにした。

具体的には、精製後の A<sub>2A</sub> 受容体のバッファーを NMR 測定用バッファーに交換した後、逆アゴニスト [<sup>3</sup>H]ZM241385 存在下で 25 °C にて 10.5 時間インキュベートした。インキュベート前後の試料における A<sub>2A</sub> 受容体と [<sup>3</sup>H]ZM241385 の複合体の量を比較することで、リガンド結合活性の経時的変化を調べた。

その結果、両者の複合体量に有意な差は観測されなかった（図 10）。このことから、NMR 測定の間に A<sub>2A</sub> 受容体が顕著に変性することはないと結論した。

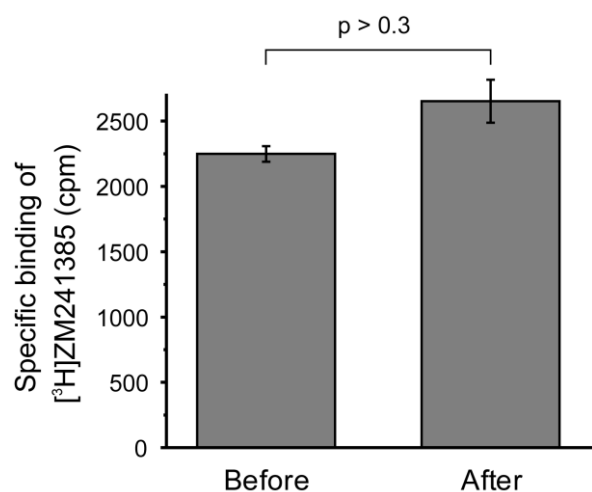


図 10 A<sub>2A</sub> 受容体の経時的安定性。

精製後の A<sub>2A</sub> 受容体を逆アゴニスト [<sup>3</sup>H]ZM241385 の存在下で 25 °C にて 10.5 時間インキュベートし、その前後での特異的 [<sup>3</sup>H]ZM241385 結合量を比較した。

### 3-1-3 部分アゴニスト 2-(1-hexynyl)adenosine の合成

解析に用いる  $A_{2A}$  受容体のリガンドのうち、市販されていない部分アゴニスト 2-(1-hexynyl)adenosine については自分で合成を行った。文献[34]を参考にして、園頭カップリング反応を利用して 2-iodoadenosine と 1-hexyne から 2-(1-hexynyl)adenosine を合成し、逆相 HPLC によって精製した (図 11)。

精製後の試料を質量分析法で解析したところ、2-(1-hexynyl)adenosine のプロトン化分子の分子量と一致する分子量のピークが観測された (図 12)。また、精製物の  $^1\text{H}$  NMR 解析で観測されたシグナルは、すべて 2-(1-hexynyl)adenosine のプロトンに帰属することができた (図 13)。副産物や未反応物に由来する顕著なシグナルは観測されなかった。これらの結果から、目的の 2-(1-hexynyl)adenosine が得られたと結論した。100 mg の 2-iodoadenosine から得られた 2-(1-hexynyl)adenosine は約 60 mg、収率は約 60 %だった。

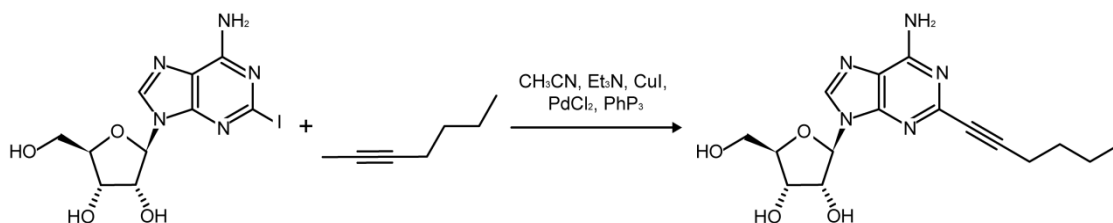


図 11 部分アゴニスト 2-(1-hexynyl)adenosine の合成。

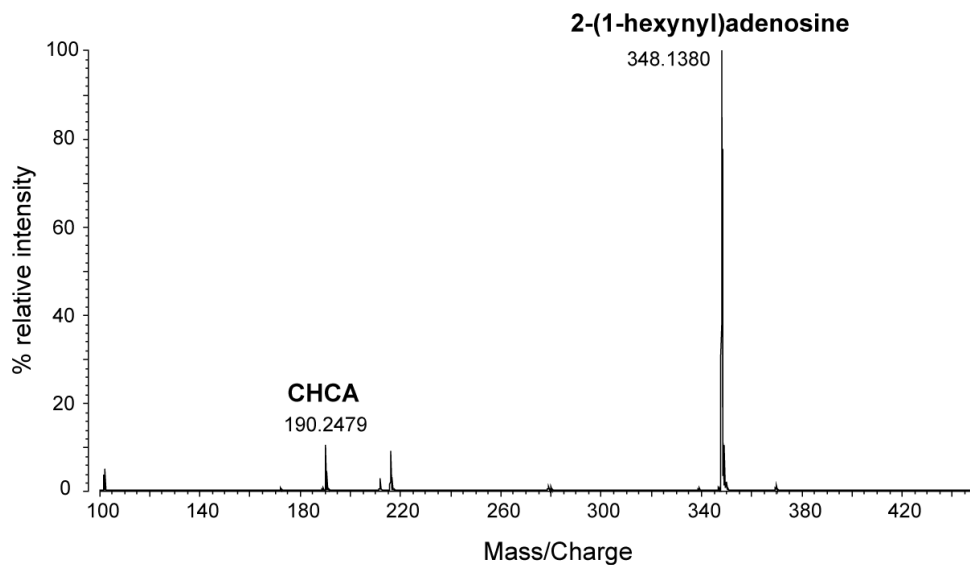


図 12 合成した 2-(1-hexynyl)adenosine の MALDI-TOFMS スペクトル。

試料のイオン化のためのマトリックスとして CHCA (プロトン化分子の質量 190) を用いた。2-(1-hexynyl)adenosine のプロトン化分子の質量は 348。横軸は質量電荷比、縦軸は相対強度を示している。

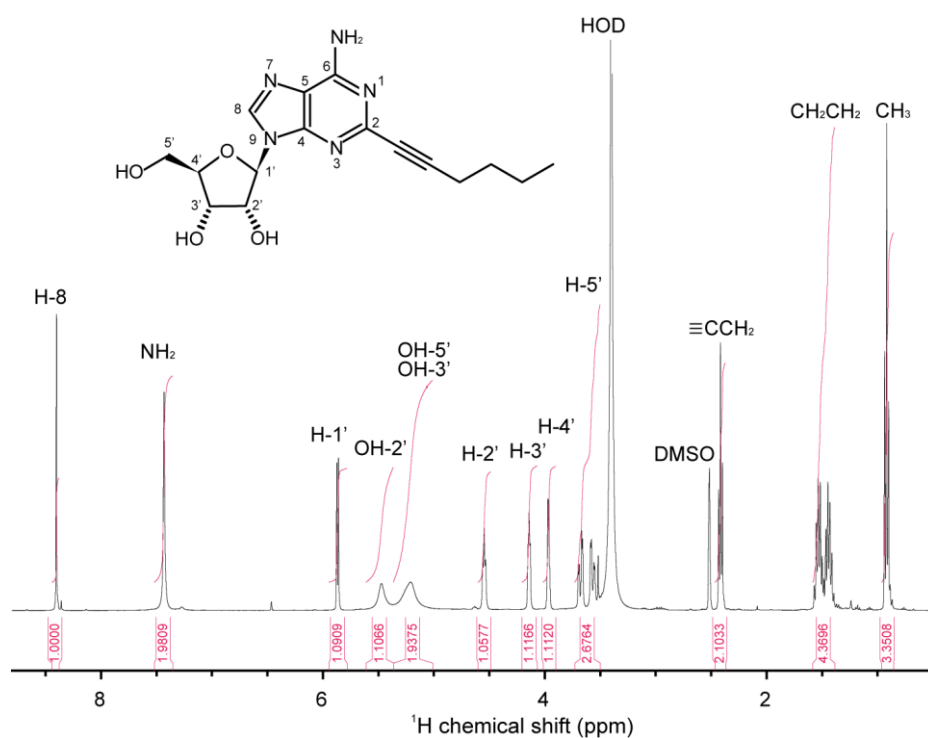


図 13 合成した 2-(1-hexynyl)adenosine の <sup>1</sup>H NMR スペクトル。

2-(1-hexynyl)adenosine を DMSO-d<sub>6</sub> に溶かして 25 °C にてスペクトルを得た。横軸は <sup>1</sup>H 化学シフトを示している。各シグナルの帰属と積分強度 (マゼンタ) を付記している。

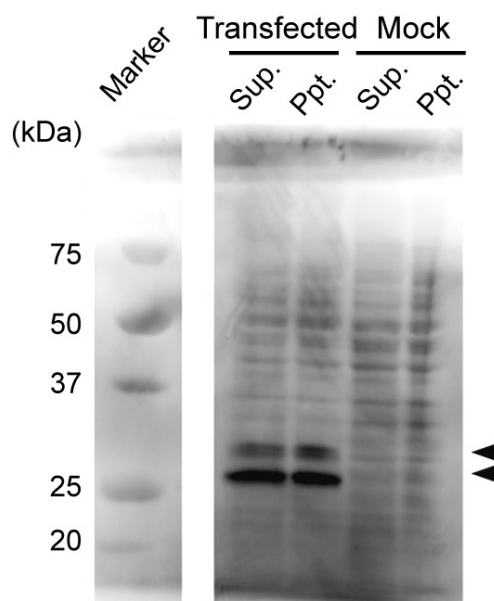
### 3-1-4 A<sub>2A</sub> 受容体を発現させた HEK293T 細胞の調製

シグナル伝達活性やリガンド解離速度の生化学的解析に用いるために、ヒト A<sub>2A</sub> 受容体を一過的に発現させた HEK293T 細胞を調製することにした。具体的には、まずウェスタンブロッティングとフローサイトメトリー解析によって A<sub>2A</sub> 受容体の発現を確認した。その後、調製した細胞を用いて、A<sub>2A</sub> 受容体のシグナル伝達活性のオルソステリックリガンド依存的な変化を解析した。

#### ウェスタンブロッティング解析による発現確認

N 末端側に FLAG タグ配列を付加した A<sub>2A</sub> 受容体の cDNA を組み込んだプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後の細胞を可溶化し、ウェスタンブロッティングによって解析した。一次抗体には、FLAG タグを認識する抗 FLAG M2 抗体を用いた。その結果、二つの特異的なバンドが検出された (図 14)。低分子量側のバンドの方が高分子量側のバンドよりも数倍濃くなった。各バンドの分子量から、高分子量側のバンドは糖鎖修飾された A<sub>2A</sub> 受容体であり、低分子量側のバンドは糖鎖修飾されていない A<sub>2A</sub> 受容体だと推測した。この結果から、トランスフェクション後の HEK293T 細胞に A<sub>2A</sub> 受容体が発現されていると結論した。

A<sub>2A</sub> 受容体の糖鎖修飾部位は細胞外ループ 2 の N154 である。糖鎖修飾されない N154Q 変異体のリガンド結合活性は野生型と同等であることが報告されていることから[10, 35]、糖鎖修飾の有無は A<sub>2A</sub> 受容体の活性には影響しないと考えられる。



**図 14 HKE293T 細胞に発現させた  $A_{2A}$  受容体のウェスタンブロッティングによる検出。**  
トランスフェクションから 24 時間後の細胞および mock 細胞を可溶化して遠心し、その上清と沈殿をそれぞれウェスタンブロッティング解析した。ウェスタンブロッティングの一次抗体には、 $A_{2A}$  受容体の N 末端側に付加した FLAG タグ配列を認識する抗 FLAG M2 抗体を用いた。

#### フローサイトメトリー解析による $A_{2A}$ 受容体の配向の確認

発現された  $A_{2A}$  受容体が細胞膜に対して正しい向きをしているかを調べるために、トランスフェクションから 24 時間後の細胞を用いてフローサイトメトリー解析を行った。一次抗体には、 $A_{2A}$  受容体の N 末端に付加した FLAG タグを認識する抗 FLAG M2 抗体を用いた。解析の結果、トランスフェクション後の細胞の蛍光強度は、mock 細胞の蛍光強度よりも顕著に高くなった (図 15)。

この結果は、抗 FLAG M2 抗体が細胞表面に露出している FLAG タグ配列を認識したことを示している。したがって、N 末端側を細胞外側に向けた  $A_{2A}$  受容体が存在する、すなわち正しい配向になった  $A_{2A}$  受容体が発現していると結論した。



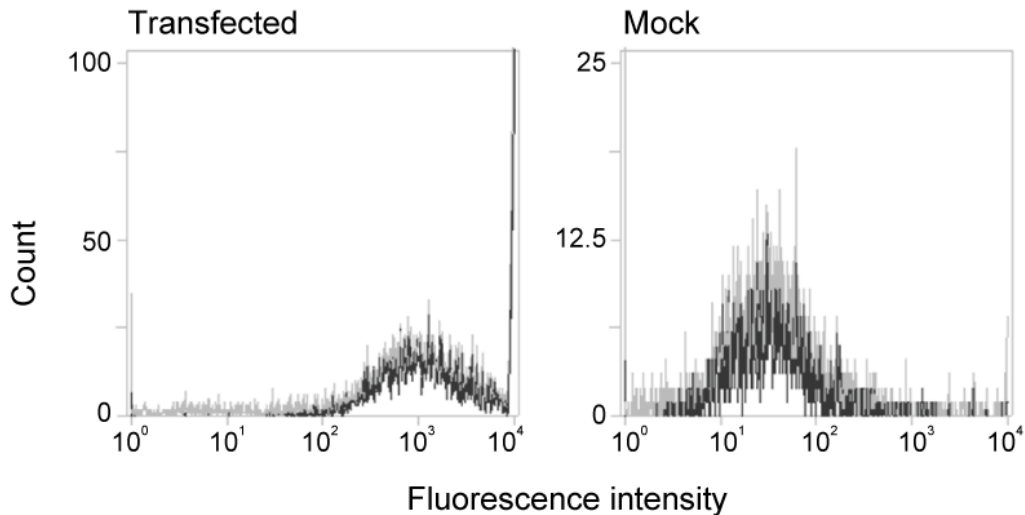


図 15 HEK293T 細胞に発現させた  $A_{2A}$  受容体のフローサイトメトリーによる検出。  
一次抗体として抗 FLAG 抗体、二次抗体として Alexa Flour 488 修飾抗体で処理したトランスフェクション後の細胞（左）と mock 細胞（右）をフローサイトメトリーで解析した。横軸は蛍光強度、縦軸はカウント数を示している。

### シグナル伝達活性の解析

次に、上記の方法で調製した細胞を用いて、オルソステリックリガンド依存的な  $A_{2A}$  受容体のシグナル伝達活性の変化を調べた。具体的には、トランスフェクションから 48 時間後に回収した  $A_{2A}$  受容体発現 HEK293T 細胞とさまざまなオルソステリックリガンド（図 16）を混合してインキュベートし、蛍光標識 cAMP と抗 cAMP 抗体を用いた競合法によって cAMP 産生量を定量した（図 17）。

その結果、オルソステリックリガンドの濃度依存的に cAMP 産生量が増加するのが観測された（図 18、表 1）。また、最大 cAMP 産生量は、多い順に UK-432097 > NECA > 2-(1-hyxynyl)adenosine > regadenoson となった。

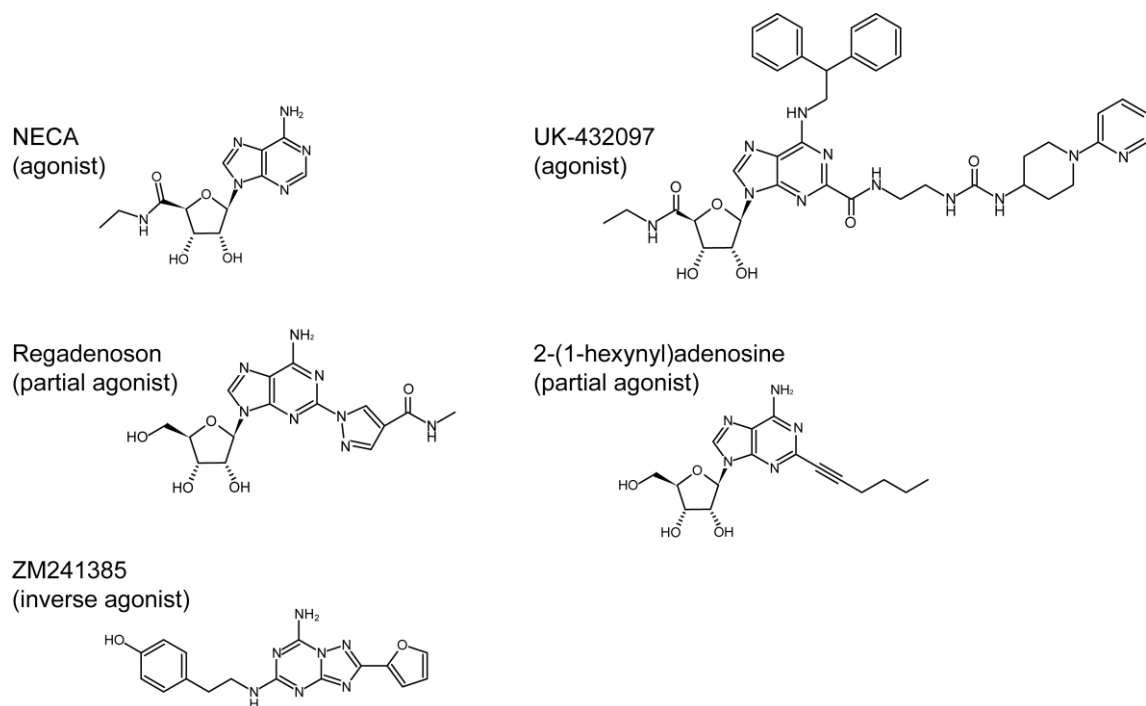


図 16 本研究で用いた  $A_{2A}$  受容体のオルソステリックリガンド。

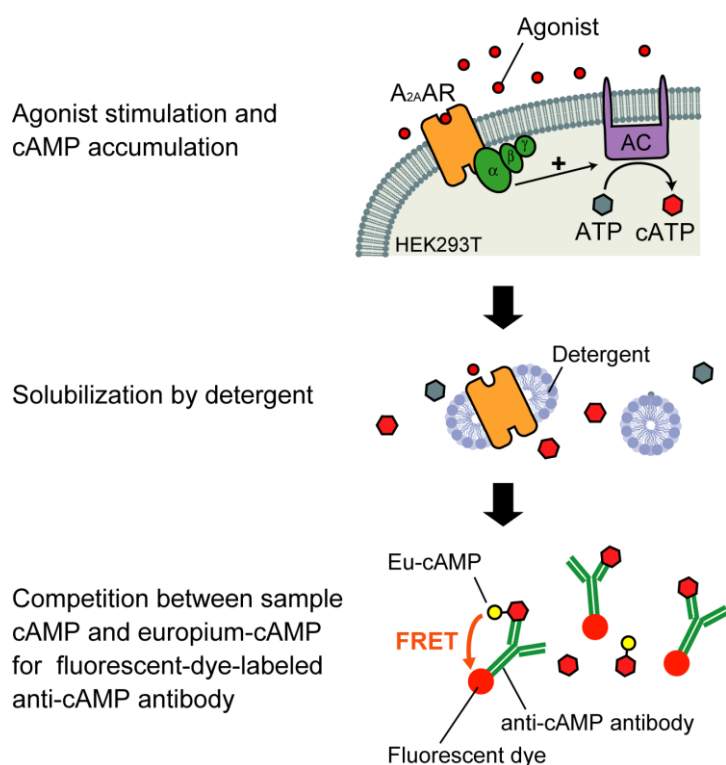


図 17 cAMP 産生アッセイの概要の模式図。

$A_{2A}$  受容体を一過的に発現させた HEK293T 細胞に対してさまざまなオルソステリックリガンドを作用させた。細胞を可溶化した後、蛍光標識 cAMP と抗 cAMP 抗体を用いた競合法によって、産生された cAMP 量を定量した。

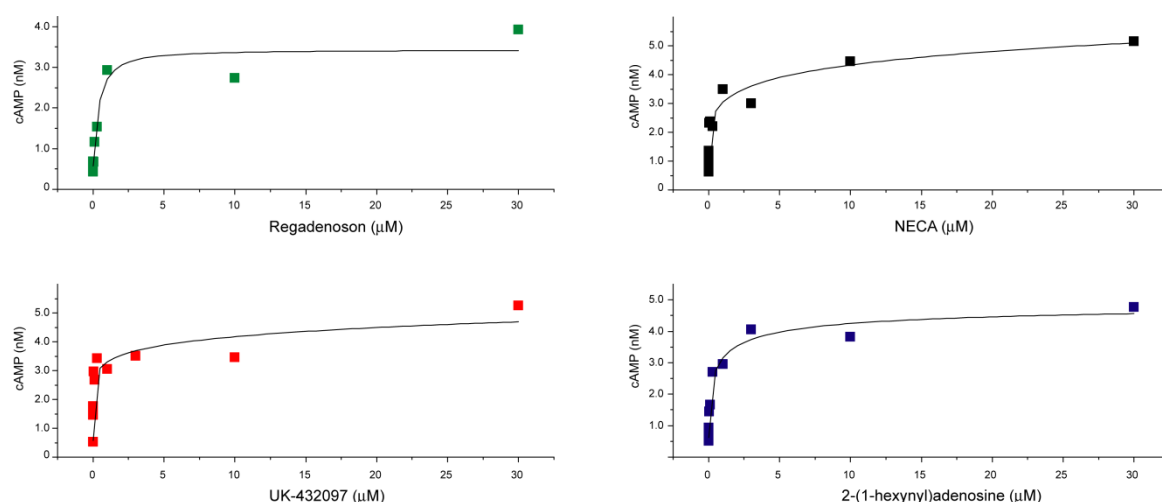


図 18 HEK293T 細胞に発現させた  $A_{2A}$  受容体のオルソステリックリガンド依存的なシグナル伝達。

$A_{2A}$  受容体を一過的に発現させた HEK293T 細胞に対してアゴニスト UK-432097 または NECA、部分アゴニスト regadenoson または 2-(1-hexynyl)adenosine を作用させたときの cAMP 産生量を、図 17 の方法によって測定した。横軸は各リガンドの濃度、縦軸は cAMP 濃度を表している。得られたデータを four-parameter logistic 関数によってフィッティングした。

表 1 さまざまなオルソステリックリガンド存在下での最大 cAMP 産生量。

図 18 の cAMP 産生量のリガンド依存性から、各リガンド存在下における最大 cAMP 産生量を求めた。アゴニスト UK-432097 存在下を 100 %、逆アゴニスト ZM241385 存在下を 0 % として規格化して表した。

Orthosteric ligand		Maximal cAMP accumulation (%)
Agonist	UK-432097	100
	NECA	98
Partial agonist	Regadenoson	74
	2-(1-hexynyl)adenosine	91
Inverse agonist	ZM241385	0

## 3-2 アミロライドと A<sub>2A</sub> 受容体の結合の検出

実際にアミロライドが A<sub>2A</sub> 受容体に対してアロステリックに結合できるかどうかということは、従来の研究では十分に確認されてはいなかった。そこで本節では、前節で調製した試料を用いて、A<sub>2A</sub> 受容体とアミロライドの結合を直接検出することを試みた。そのための手法として核磁気共鳴 (NMR) 法を用いることにした。まず A<sub>2A</sub> 受容体由来の NMR シグナルの帰属を行った後、アミロライドの結合に伴う A<sub>2A</sub> 受容体の NMR スペクトルの変化を解析することで、アミロライドの結合を直接的に検出することにした。

### 3-2-1 NMR 法の利点

GPCR の構造は高い運動性を持ち、それが機能の発現に重要な役割を担うと考えられている[16, 36-38]。NMR 法は水溶液中の蛋白質の構造を直接観測することができる手法であり、分子の動的な性質を解析するのに適している[39]。そこで本研究では、NMR 法を用いて A<sub>2A</sub> 受容体の構造解析を行うことにした。

蛋白質を NMR 法で解析するためには、観測したい残基を安定同位体標識する必要がある。今回、A<sub>2A</sub> 受容体のトリプトファン残基の側鎖インドール NH 基とメチオニン残基のメチル基に着目した (図 19)。その理由は二つある。

第一に、A<sub>2A</sub> 受容体のメチオニン残基やトリプトファン残基は分子全体に広く分布していることが挙げられる (図 19)。例えば、生理的リガンド結合部位近傍にある M140 や分子中腹にある W129 は保存性の高い残基であり、それらの領域の構造変化を検出する上で良いプローブになると考えられる。特に M211 は、前述の結晶構造解析で大きな変化を示した TM5 の細胞内側にあることから (図 4)、A<sub>2A</sub> 受容体のシグナル伝達活性に重要な細胞内側領域の構造変化を反映する可能性があると考えた。

第二の理由として、NMR 測定を高感度化できることが挙げられる。 $A_{2A}$  受容体のような高分子量の分子を NMR で直接観測する場合、分子の回転相関時間が増加することで横緩和時間が短縮し、シグナルの検出感度が顕著に低下することが問題になる。この問題を解決するためには、主鎖よりも高い内部運動性があるためにシグナルの先鋭化が期待できる側鎖を観測対象とすることや、分子を均一重水素 ( $^2H$ ) 標識することが有効である[40]。特に側鎖メチル基は、プロトンを 3 個持つことや、メチル基自身の速い内部運動があること、HMQC スペクトルを利用することで横緩和時間が相対的に遅い磁化成分のみを選択的に取り出せること (methyl-TROSY 効果) により、感度良く測定できることが知られている[41, 42]。したがって、メチオニンメチル基やトリプトファン側鎖インドール NH 基を観測対象とすることで、 $A_{2A}$  受容体を高感度に観測できると考えられる。

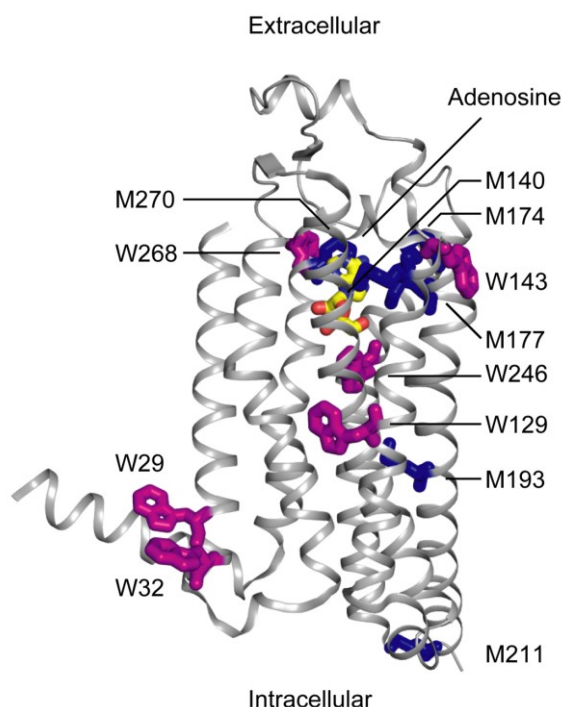


図 19  $A_{2A}$  受容体のメチオニンとトリプトファンの分布。

アデノシン (黄) 結合状態ヒト  $A_{2A}$  受容体の結晶構造 (PDB ID: 2YDO) におけるメチオニン (青) とトリプトファン (紫) 残基を示した。

私はこれまでに、*P. pastoris* 発現系を用いて発現産物を均一 $^2\text{H}$ 、メチル $^{13}\text{C}$ メチオニン標識または均一 $^2\text{H}$ 、 $^{15}\text{N}$ 標識する方法を確立していた（近藤、修士論文、2012）。これらの標識法を利用することで、 $\text{A}_{2\text{A}}$ 受容体のメチオニンメチル基とトリプトファン側鎖インドール NH 基を観測することが可能になる。そこで、この方法によって安定同位体標識  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体を調製し、NMR による構造解析に用いることにした。

### 3-2-2 $\text{A}_{2\text{A}}$ 受容体の NMR シグナルの帰属

はじめに、逆アゴニスト ZM241385 結合状態の均一 $^2\text{H}$ 、メチル $^{13}\text{C}$ メチオニン標識  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルを測定した(図 20)。その結果、 $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体由来のシグナルが計 6 個観測された。このシグナル数は、受容体がつメチオニン残基数と同じであった。

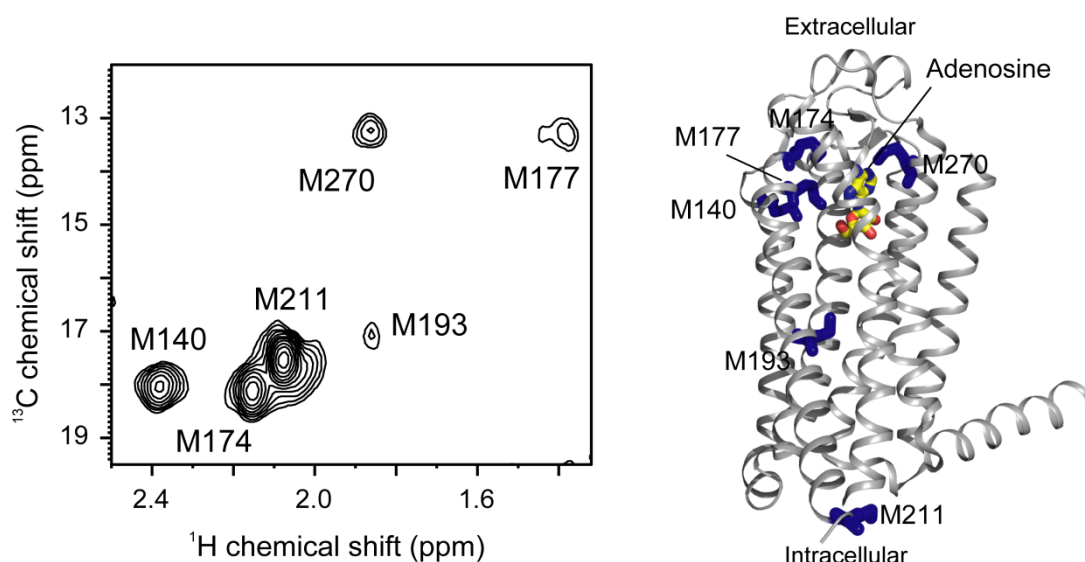


図 20 逆アゴニスト ZM241385 結合状態の均一 $^2\text{H}$ 、メチル $^{13}\text{C}$ メチオニン標識  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の NMR スペクトル。

(左)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル。各シグナルのそばに、どのシグナルとどの残基が対応しているかの帰属を記した。(右) メチオニン残基(青)の分布をアデノシン結合状態  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の結晶構造 (PDB ID: 2YDO) 上にマッピングした。

そこで次に、どのシグナルとどの残基が対応しているのかを同定するために、変異体を用いた帰属を行った。M140, M211, M270 の帰属については修士課程から着手しており（近藤、修士論文、2012）、今回さらに M174, M177, M193 の帰属も行った。

まず、できるだけ活性に影響のない変異体を作成するためにサブタイプ内でのアミノ酸配列の保存性を調べたところ、M174, M177, M193 に対応する位置では完全にメチオニンが保存されていた。そこで、メチオニンと性質が近いアミノ酸への置換変異体を数種類作成し、逆アゴニスト $[^3\text{H}]\text{ZM241385}$  およびアゴニスト $[^3\text{H}]\text{NECA}$  の特異的結合量を比較した（図 21）。その結果から、高いリガンド結合活性を保持していた M174L, M177V および M193L を以降の解析に用いることにした。

上記の変異体の均一  $^2\text{H}$ , メチル  $^{13}\text{C}$  メチオニン標識体を調製し、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 測定を行った。変異体と野生型のスペクトルを比較し、消失したシグナルが目的のメチオニン残基であると帰属した（図 22）。最終的に、すべてのメチオニン残基について一義的な帰属が得られた。

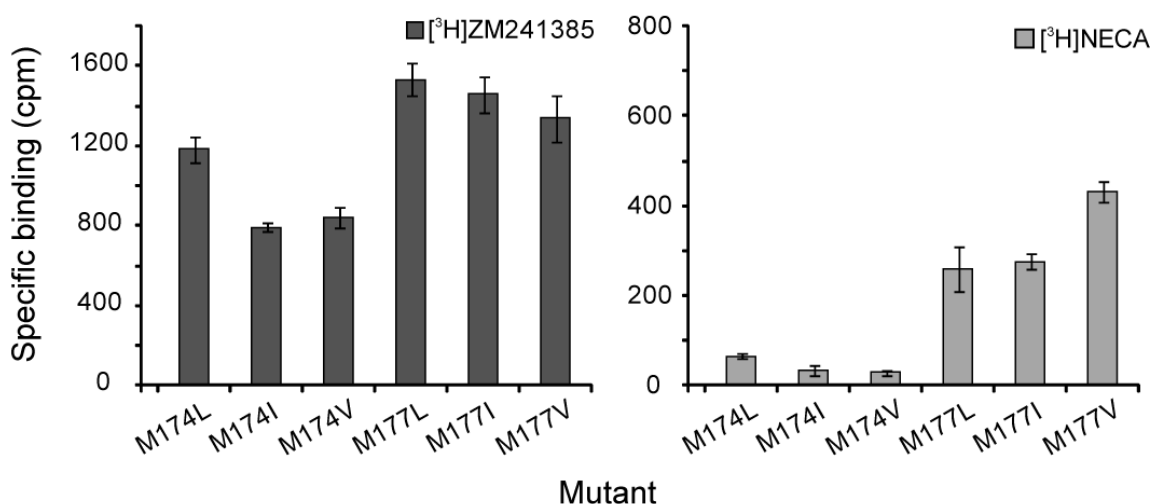


図 21 帰属のための  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の変異体の選定。

各変異体を発現させた *P. pastoris* の膜画分を用いて、逆アゴニスト $[^3\text{H}]\text{ZM241385}$  またはアゴニスト $[^3\text{H}]\text{NECA}$  結合活性を比較した（ $N=3$ ）。

同様に、アゴニスト UK-432097、部分アゴニスト regadenoson、またはアミロライドの各存在下におけるメチオニン残基のシグナルも帰属した (図 22)。

加えて、均一  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体のトリプトファン側鎖のシグナルについても帰属を行った。野生型と変異体の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY または CRINEPT-HMQC-TROSY スペクトルを比較することで、 $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の持つ 6 個すべてのトリプトファン側鎖の帰属を得た (図 23、図 24)。

#### 変異がスペクトルに与えた影響と帰属の妥当性について

W29Y 変異体のスペクトルでは W32 の化学シフトが、W32Y 変異体のスペクトルでは W29 の化学シフトが若干変化していた。これは、両残基が隣接しているために、変異の影響を直接受けたことを反映していると考えられる。

W129 と W246 の NMR シグナルは、他のトリプトファン残基のシグナルと比較して広幅であった。W129 と W246 は分子の中腹にあり、他のトリプトファン残基は分子の先端近くにあるため (図 19)、前者の運動性は後者のそれよりも制限されていると予想される。そのため、W129 と W246 のシグナルが他と比較して広幅であることは妥当であると考えた。

M177 は TM5 の細胞外側にあり、リガンド結合に直接関わる。特に逆アゴニスト ZM241385 結合状態では、リガンドのフラン環からの環電流効果を強く受けることが結晶構造から予想されるため、ZM241385 存在下で M177 が  $^1\text{H}$  方向に高磁場側の化学シフトを示すことは妥当だと思われる。

M174 と M177 の片方を変異させたとき、他方の残基のシグナルの化学シフトが若干変化していた。これは、M174 と M177 の両残基が空間的に隣接して



いるために、変異の影響を受けたせいであると考えた。

アゴニスト UK-432097 結合状態の M270 のシグナルは、他の状態のときのそれと比較して顕著に高磁場側に現れた。UK-432097 結合状態の結晶構造から、M270 は UK-432097 のフェニル環から環電流効果を強く受けるが予想されるため、そのような化学シフトを示すことは妥当であると推測した。

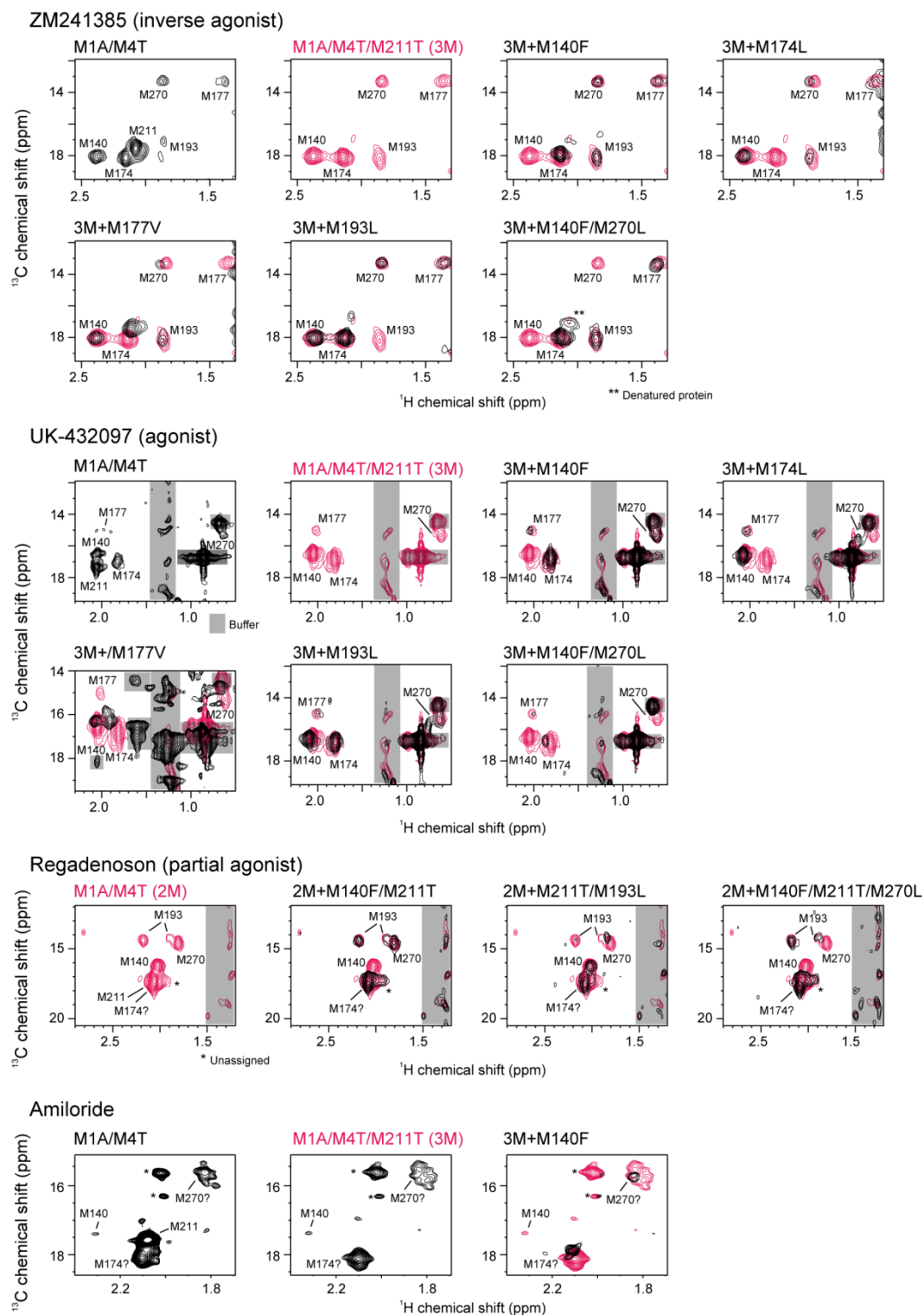


図 22  $A_{2A}$  受容体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトルの帰属。

さまざまなリガンドが結合した  $A_{2A}$  受容体変異体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトルを比較し、各シグナルを帰属した。M1A/M4T (2M) または M1A/M4T/M211T (3M) 変異体のスペクトルをマゼンタで色付けして、他の変異体のスペクトルに重ね合わせて示している。バッファー由来のシグナルを網掛け（灰色）で示している。

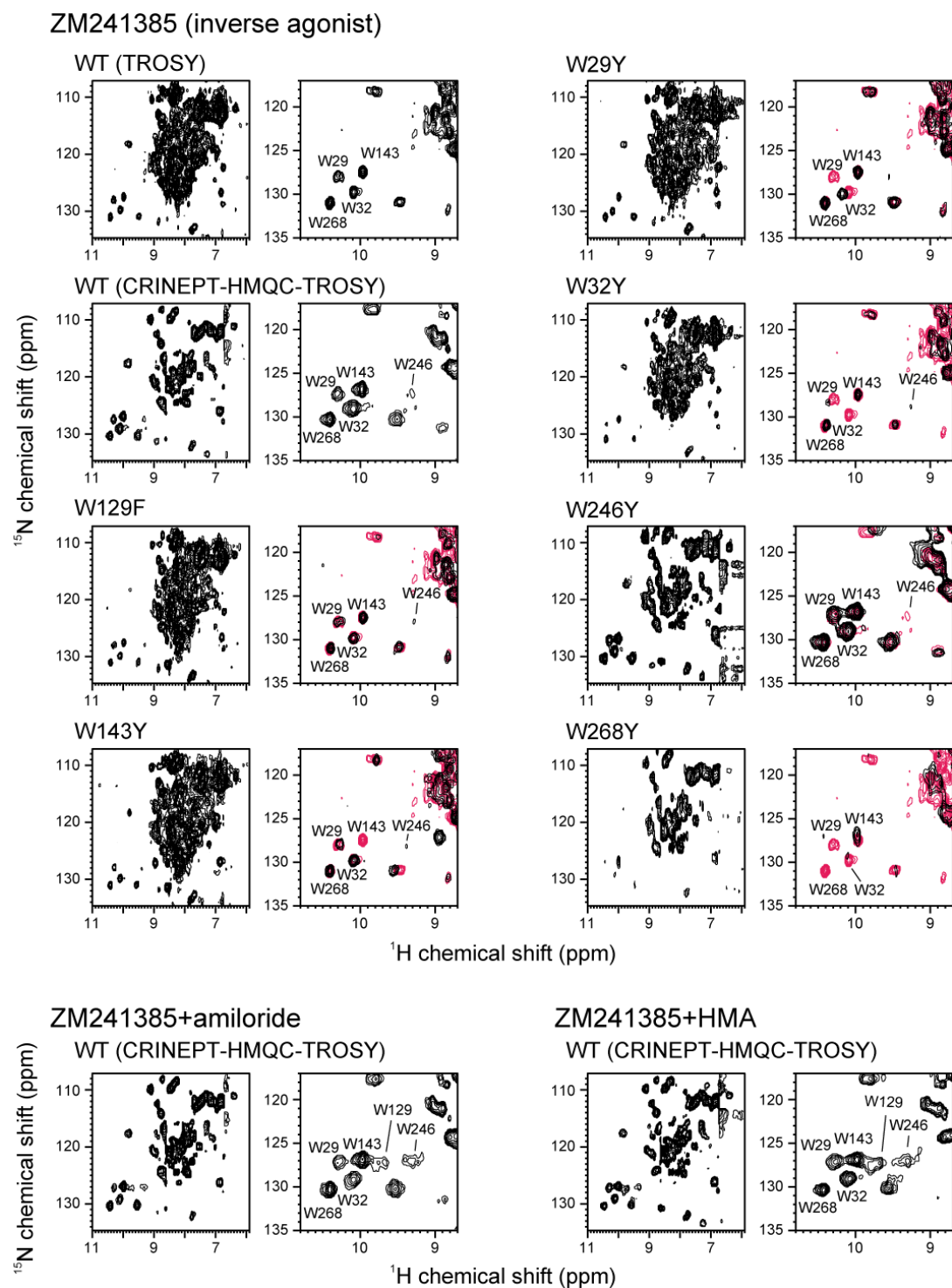


図 23 逆アゴニスト、アミロライド、HMA 存在下の  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY および  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CRINEPT-HMQC-TROSY スペクトルの帰属。

各スペクトルの全体図と、トリプトファン側鎖の化学シフト領域の拡大図を示している。野生型 (WT) のスペクトルをマゼンタで色付けして他の変異体のスペクトルに重ね合わせて示している。

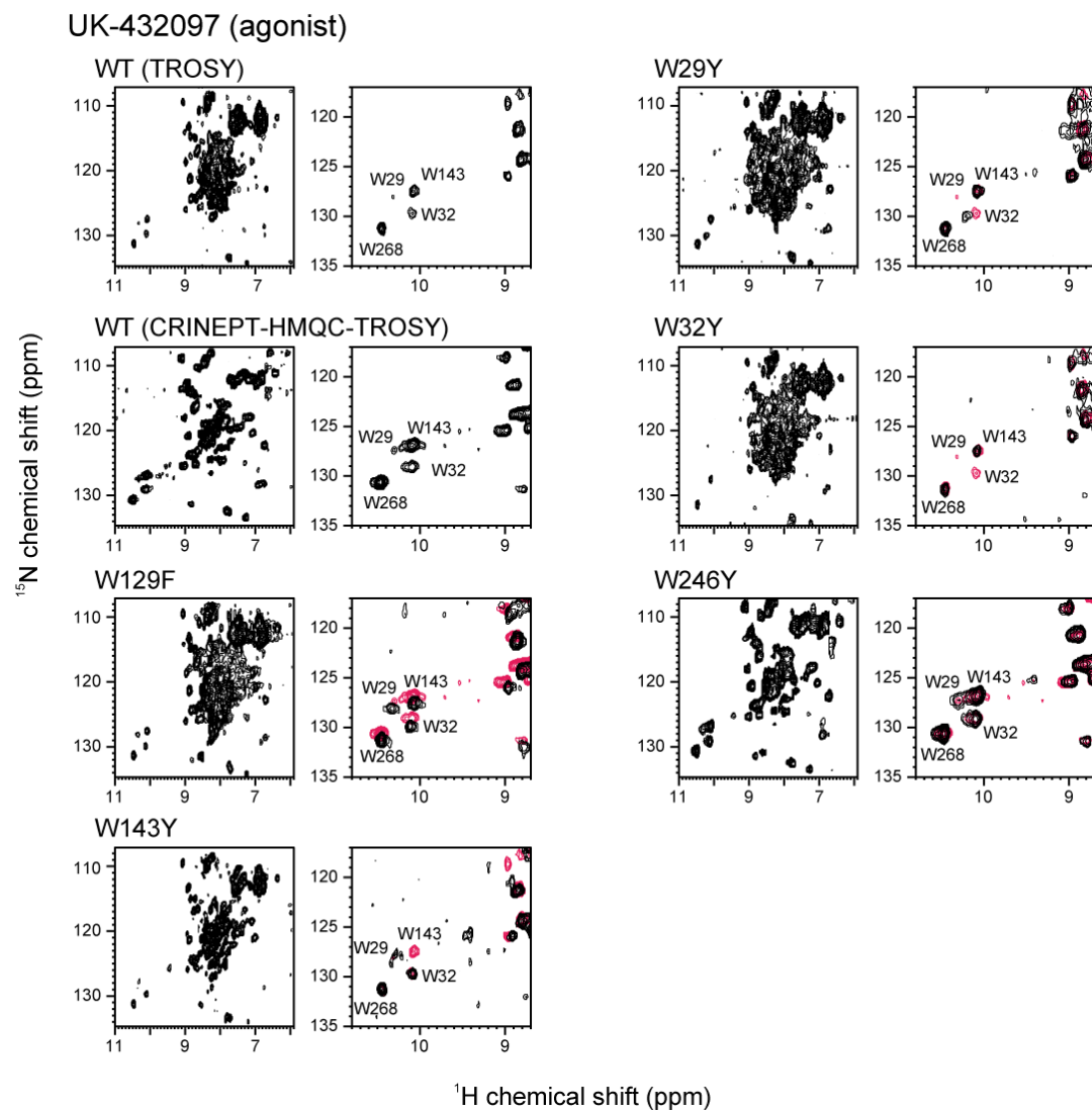


図 24 アゴニスト存在下における  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY および  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CRINEPT-HMQC-TROSY スペクトルの帰属。

各スペクトルの全体図と、トリプトファン側鎖の化学シフト領域の拡大図を示している。野生型 (WT) のスペクトルをマゼンタで色付けして他の変異体のスペクトルに重ね合わせて示している。

### 3-2-3 アミロライドと $A_{2A}$ 受容体の結合の検出

次に、アミロライドとオルソステリックリガンドが同時に結合した状態が実際に存在するのか調べることにした。アミロライド存在下、逆アゴニスト ZM241385 存在下、および両者が存在する状態における均一  $^2H$ , メチル  $^{13}C$  メチオン標識  $A_{2A}$  受容体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC スペクトルを比較した。

M140 は生理的リガンド結合部位に隣接する残基であり (図 25 右)、リガンドの結合モードの変化による影響を大きく受けると考えられる。そこで M140 のシグナルに着目したところ、M140 の化学シフトは三条件の間で異なっていた (図 25 左)。また、その変化は非直線的であった。

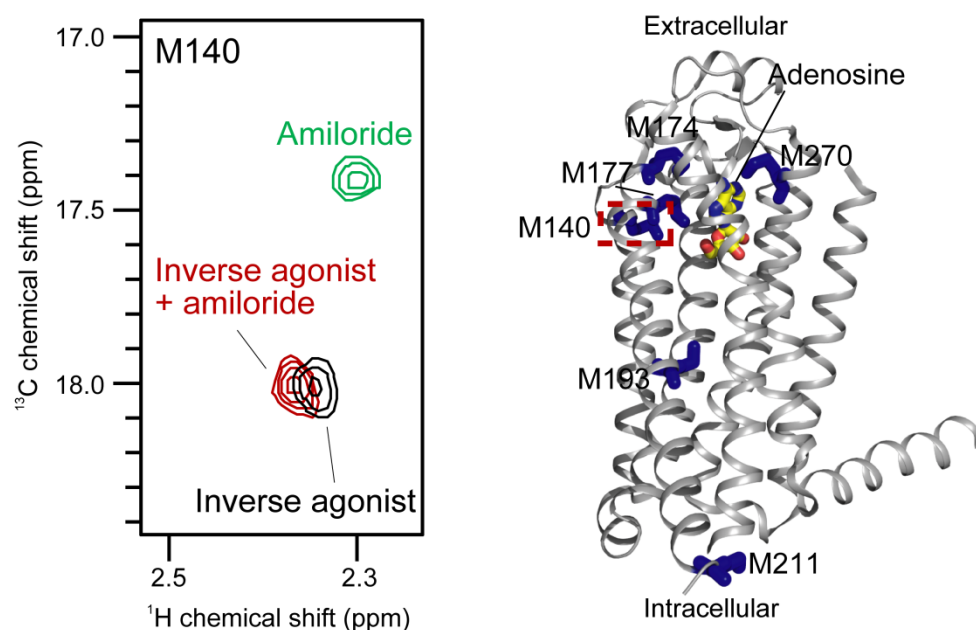


図 25 アミロライド存在下における  $A_{2A}$  受容体の生理的リガンド結合部位周辺の変化。アミロライド存在下 (緑)、逆アゴニスト ZM241385 存在下 (黒)、両者の存在下 (赤) における M140 のシグナルを重ねて示した。右側には、 $A_{2A}$  受容体の結晶構造上の M140 の位置を示した。

逆アゴニストとアミロライドが両方存在するとき、 $A_{2A}$  受容体を取りうる状態としては、いずれのリガンドも結合していない状態、逆アゴニストのみが結合している状態、アミロライドのみが結合している状態、両者が結合している状態の 4 通りが存在し得る。上述の NMR 解析においてはどちらのリガンドも解離定数より過剰に存在しているので、いずれもリガンドも結合していない状態はほとんど存在しないと考えられる。また、もしも片方のリガンドが結合した状態しか存在しないのであれば、M140 の化学シフトはアミロライドまたは逆アゴニストのみが存在するときの化学シフトと一致するか、それらを結ぶ直線上にあるはずである。したがって、M140 の化学シフトが非直線的な変化をしたという結果は (図 25)、逆アゴニストとアミロライドが両方結合した状態が存在するということを示している。

以上の結果から、逆アゴニストとアミロライドが同時に結合した状態が実際に存在すると結論した。

### 3-3 A<sub>2A</sub>受容体のアミロライド結合部位の同定

前節において、逆アゴニストとアミロライドが同時に結合した状態が実際に存在することが確認された。そこで本節では、アミロライドの結合部位を同定することにした。

#### 3-3-1 アミロライド結合状態 A<sub>2A</sub>受容体の NMR による観測

はじめに、メチオニン残基をプローブとした前述の NMR 解析に加えて、アミロライドの結合によって A<sub>2A</sub> 受容体のどの領域が顕著に変化するかを調べるために、分子全体に分布するトリプトファン残基をプローブとした NMR 解析も行った。逆アゴニスト ZM241385 存在下および ZM241385 とアミロライドの共存下における均一 <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N 標識 A<sub>2A</sub> 受容体の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N CRINEPT-HMQC-TROSY スペクトルを取得し、両者を比較した。

その結果、アミロライド存在下では、分子中腹にある W129 と W246 のシグナルが顕著な先鋭化と化学シフト変化していた (図 26)。これらの残基は、前述の M140 よりも生理的リガンド結合部位から離れた位置にある。そのため、W129 と W246 のシグナルに顕著な変化が観測されたという結果は、この領域にアミロライドが結合したことを示唆している。

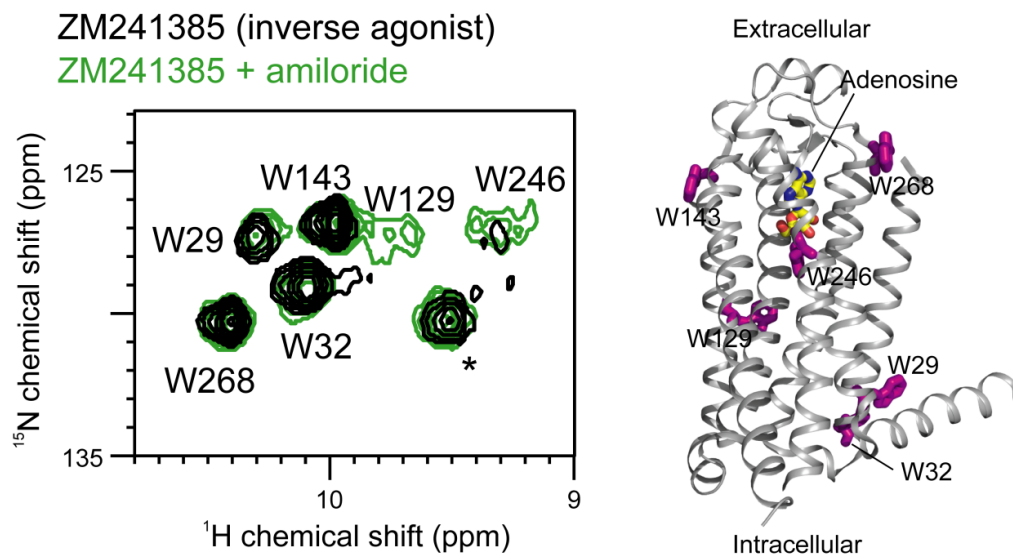


図 26 アミロライドの結合に伴う均一-<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N 標識 A<sub>2A</sub> 受容体の NMR スペクトルの変化。逆アゴニスト ZM241385 のみが存在するとき（黒）と、ZM241385 とアミロライドが同時に存在するとき（緑）の均一-<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N 標識 A<sub>2A</sub> 受容体の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N CRINEPT-HMQC-TROSY スペクトルを比較した。\*印のシグナルは非トリプトファン。右側には結晶構造上のトリプトファン残基の分布を示した。



### 3-3-2 変異体解析による結合部位の同定

次に、さまざまな A<sub>2A</sub> 受容体変異体のアミロライド感受性を調べることで、アミロライドの結合に重要な残基を同定することを試みた。

#### 変異体作成の指針

グアニジン骨格をもつアミロライドは正に帯電することができるため、負電荷を帯びた領域に結合しやすいことが予想される (図 27)。そこで、オルソステリック部位周辺にあるアスパラギン酸やグルタミン酸残基、およびその周辺の残基に着目した。計 12 種類の変異体 (E12Q, L48A, D52N, T88A, E151Q, E161Q, D170A, N181A, W246Y, D261A, N280A, N284A) をそれぞれ HEK293T 細胞に一過的に発現させた。その膜画分に対する逆アゴニスト [<sup>3</sup>H]ZM241385 の特異的結合を検出することで、変異体がりガンド結合活性を保っていることを確認した。

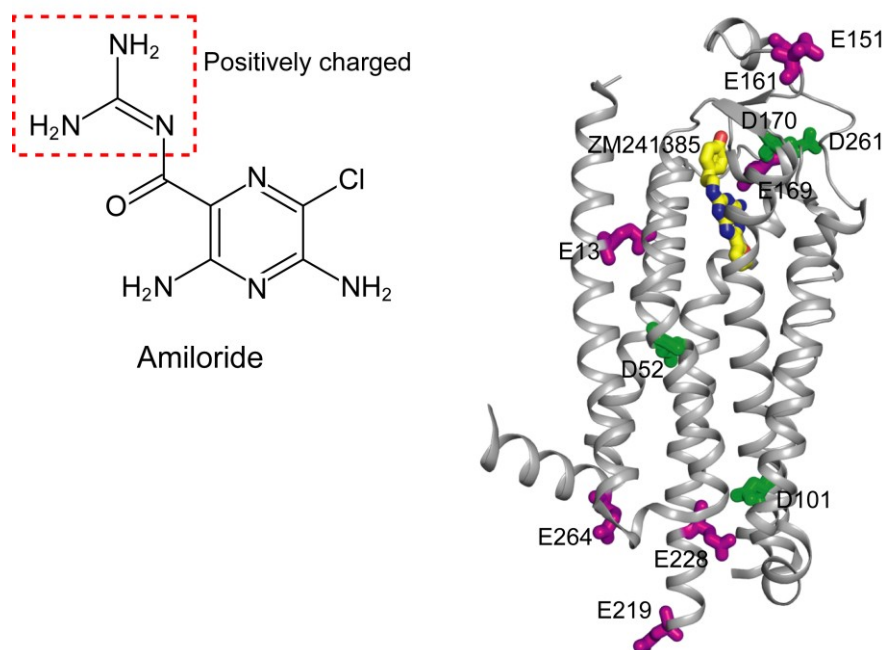


図 27 変異体解析の指針。

アミロライド (左) は正電荷を帯び得るため、A<sub>2A</sub> 受容体 (右、PDB ID: 4E1Y) のもつグルタミン酸 (紫) やアスパラギン酸 (緑)、その周辺の残基と相互作用しやすいと予想される。

## リガンド解離アッセイによるアミロライド感受性の解析

変異体のアミロライド感受性を調べる方法として、リガンド解離アッセイを用いた。この手法は、飽和リガンド結合アッセイのような定常状態を解析する手法と比較して、アロステリック効果を検出するのに適している[43]。このアッセイでは、受容体と  $^3\text{H}$  標識オルソステリックリガンドの複合体に過剰量の拮抗薬を加えたときに起こる、複合体量の経時的な減少を測定する（図 28）。オルソステリックリガンドとして逆アゴニストを用いたとき、アミロライドや HMA の存在下では逆アゴニストの解離が速くなることが知られている[21]。変異によってアミロライドや HMA と受容体の結合が抑制された場合、解離速度の変化が小さくなると考えられる。そこで、逆アゴニストの解離速度の変化を指標にして、変異体のアミロライド感受性を調べた。

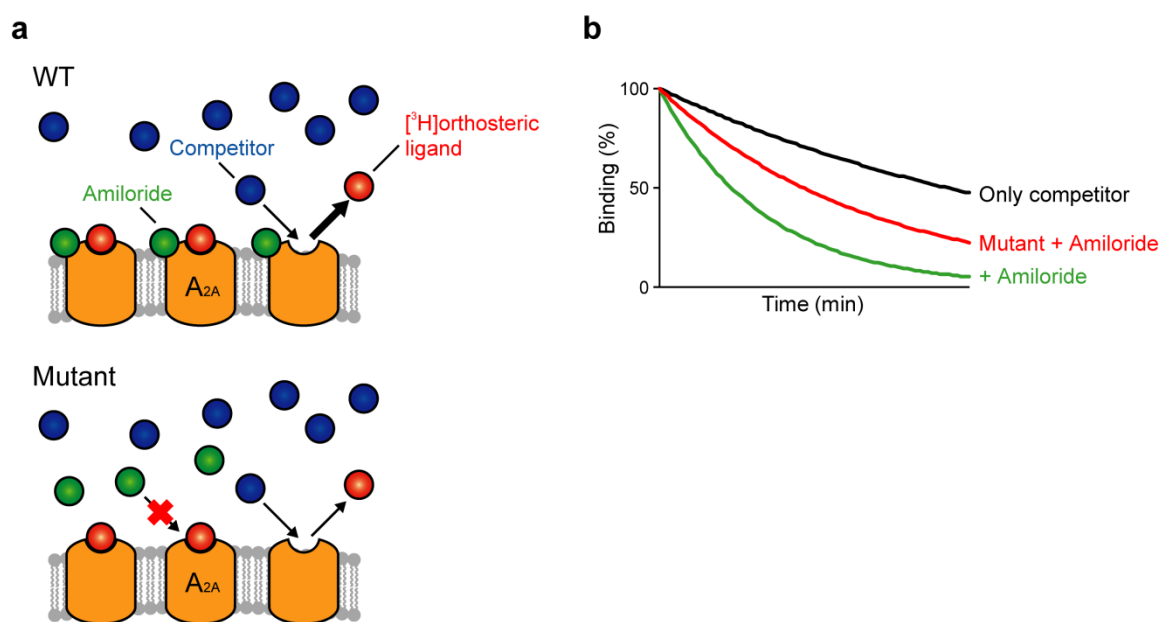


図 28 リガンド解離アッセイの概要。

- a. リガンド解離アッセイでは、受容体と  $^3\text{H}$  標識オルソステリックリガンドの複合体に過剰量の拮抗薬を加えたときに起こる複合体の解離を測定する。アミロライド存在下ではオルソステリックリガンドの解離速度が速くなる。変異によってアミロライドの結合が減弱すると、解離速度の変化が小さくなる。
- b. 時間依存的な逆アゴニストの解離の模式図。横軸は拮抗薬を加えてからの時間、縦軸は複合体の割合を示している。

解析の結果、D52N や T88A および N284A 変異体では、アミロライドや HMA 存在下での逆アゴニスト [ $^3\text{H}$ ]ZM241385 解離の加速効果が顕著に低下していた (図 29、図 30、表 2)。D52 や T88, N284 は生理的リガンド結合部位よりも細胞内側の領域に集まっていた。また、これらの残基は、前項の NMR 解析で顕著な変化を示していた W129 や W246 と隣接していた。

E169Q 変異体ではもともとのリガンド解離速度が非常に速く、アミロライドによるその変化を定量的に解析するのは困難だった (表 2、図 30)。細胞外ループ 2 (ECL2) にある E169 は結晶構造中で逆アゴニスト ZM241385 の環外アミノ基と直接相互作用しているため、変異による影響が大きく現れたと考えられる。温度を低温に保つことで解離速度を遅くすることを試みたが、それでも解析は困難だった。同様に L48A 変異体についても、発現量が非常に少なかったため定量的な解析が困難だった。

また、E13Q 変異体では、アミロライドや HMA が存在しない状態でも [ $^3\text{H}$ ]ZM241385 解離速度が野生型のそれよりも顕著に増加していた (約 3.8 倍)。それにより、アミロライドや HMA 存在下では測定開始直後にほとんどの複合体が解離してしまい、正確な [ $^3\text{H}$ ]ZM241385 解離速度を求めるのが困難だった。

以上の結果から、生理的リガンド結合部位よりも細胞内側の領域にある D52, T88 および N284 の周辺にアミロライドが結合すると考えた (図 29)。

また、N181A や N280A 変異体では、アミロライドの効果には顕著な変化がない一方で HMA の作用が抑制されていた (表 2、図 30)。このことから、これらの残基は HMA とのみ相互作用を形成している可能性がある。

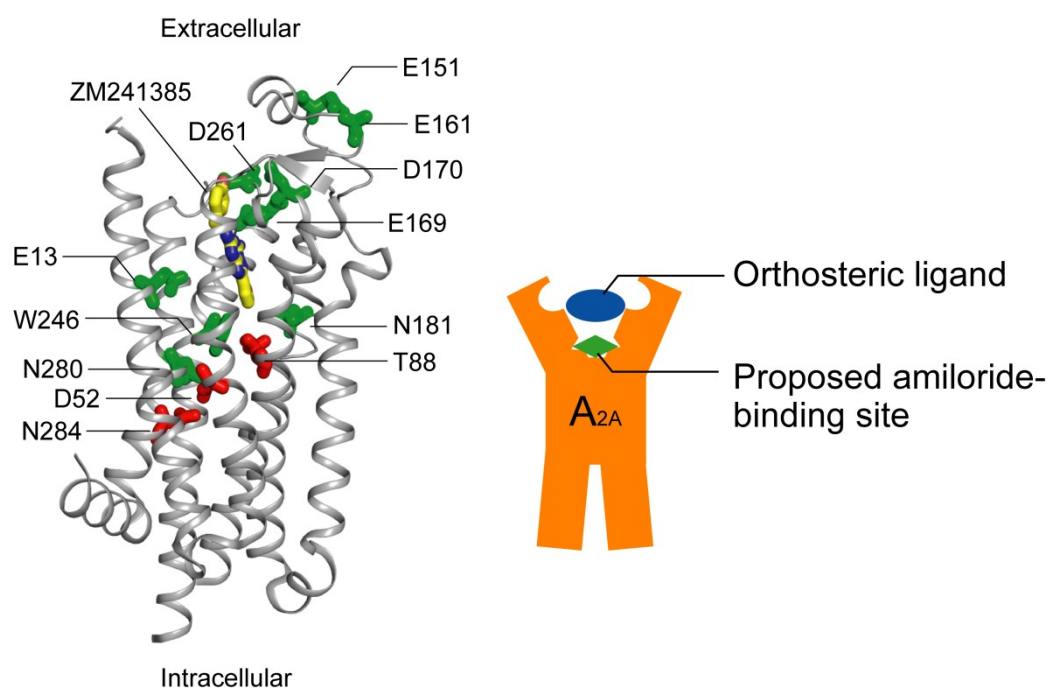


図 29 変異体解析の結果のマッピング。

アミロライドの結合による逆アゴニスト ZM241385 解離速度の増加率が 1.5 倍以下に低下した残基を赤色、それ以外を緑色で A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造 (PDB ID: 4EIY) 上にマッピングした。右側には、アッセイの結果から推測したアミロライドと A<sub>2A</sub> 受容体の結合の模式図を示した。

**表 2** A<sub>2A</sub> 受容体変異体からの逆アゴニスト解離速度のアミロライド依存性。

さまざまな A<sub>2A</sub> 受容体変異体からの逆アゴニスト [<sup>3</sup>H]ZM241385 解離速度 (min<sup>-1</sup>) を、アミロライドや HMA の存在下または非存在下で解析した。拮抗薬のみ (only competitor) を加えたときの解離速度に対する倍率を括弧内に記した。<sup>a</sup> 12 °C; <sup>b</sup> 4 °C; <sup>c</sup> 25 °C; N.D., not determined.

Mutant	Only competitor	+ Amiloride	+ HMA
WT <sup>a</sup>	0.031 ± 0.005	0.067 ± 0.007 (2.1)	0.085 ± 0.008 (2.7)
E13Q <sup>b</sup>	0.12 ± 0.02	0.42 ± 0.07 (3.6)	0.54 ± 0.14 (4.6)
L48A <sup>c</sup>	N.D.	N.D.	-
D52N <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01	0.028 ± 0.009 (1.4)	0.031 ± 0.009 (1.6)
T88A <sup>b</sup>	0.013 ± 0.005	0.017 ± 0.006 (1.3)	0.016 ± 0.005 (1.2)
E151Q <sup>b</sup>	0.033 ± 0.009	0.056 ± 0.009 (1.7)	0.074 ± 0.011 (2.2)
E161Q <sup>b</sup>	0.033 ± 0.012	0.065 ± 0.015 (1.9)	0.081 ± 0.017 (2.4)
E169Q <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	N.D.
D170A <sup>a</sup>	0.08 ± 0.01	0.17 ± 0.03 (2.1)	0.26 ± 0.04 (3.3)
N181A <sup>b</sup>	0.06 ± 0.01	0.13 ± 0.02 (2.1)	0.12 ± 0.02 (2.0)
W246Y <sup>b</sup>	0.112 ± 0.009	0.27 ± 0.02 (2.4)	0.15 ± 0.01 (1.4)
D261A <sup>a</sup>	0.025 ± 0.005	0.045 ± 0.005 (1.8)	0.084 ± 0.007 (3.4)
N280A <sup>a</sup>	0.08 ± 0.01	0.15 ± 0.03 (1.9)	0.17 ± 0.03 (2.1)
N284A <sup>a</sup>	0.069 ± 0.007	0.101 ± 0.009 (1.5)	0.104 ± 0.009 (1.5)

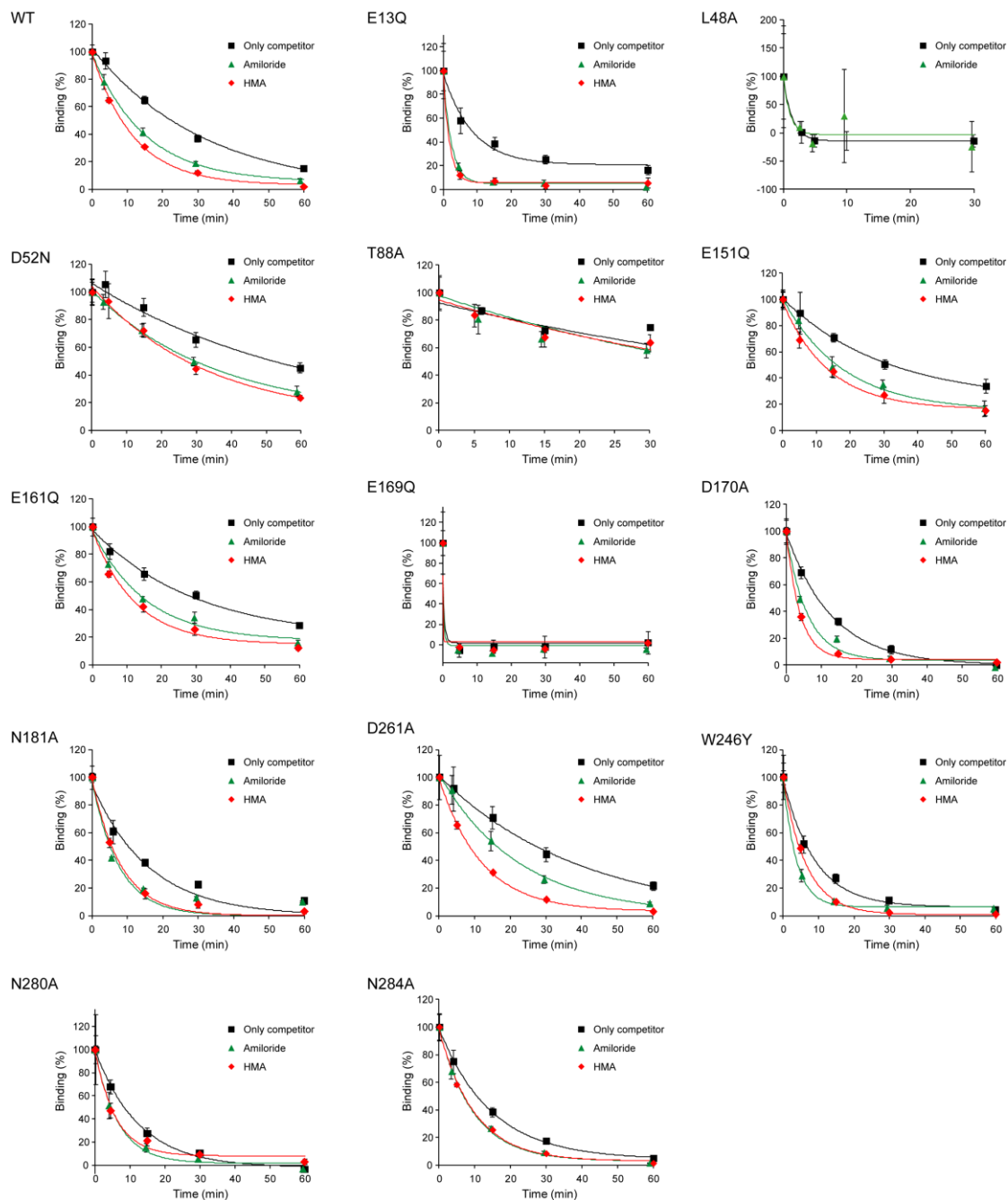


図 30 変異体解析によるアミロライド結合部位の同定。

さまざまな  $A_{2A}$  受容体変異体からの逆アゴニスト $^3$ H]ZM241385 解離速度を解析した。アロステリックモジュレーター非存在下 (黒)、アミロライド (緑) または HMA (赤) 存在下での結果を重ねて示した。

### 3-3-3 A<sub>2A</sub> 受容体とアミロライドのドッキング解析

最後に、前述の変異体解析によって同定されたオルソステリック部位の下部領域にアミロライドが結合することが空間的に可能かどうかを調べるために、アミロライドと A<sub>2A</sub> 受容体のドッキング解析を行うことにした。逆アゴニスト結合状態の A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造 (PDB ID: 4EIY) をテンプレートとして、アミロライドの結合自由エネルギーが最も低くなる結合ポーズを探索した。

その結果、アミロライドの結合部位はよく収束し、オルソステリック部位よりも下部の領域に収まった (図 29)。また、受容体側の構造として逆アゴニストが存在する状態と存在しない状態の A<sub>2A</sub> 受容体のいずれを用いた場合でも、アミロライドのドッキングポーズはほとんど同じだった。これらの結果から、アミロライドをこの部位に収容することは空間的に可能であると結論した。

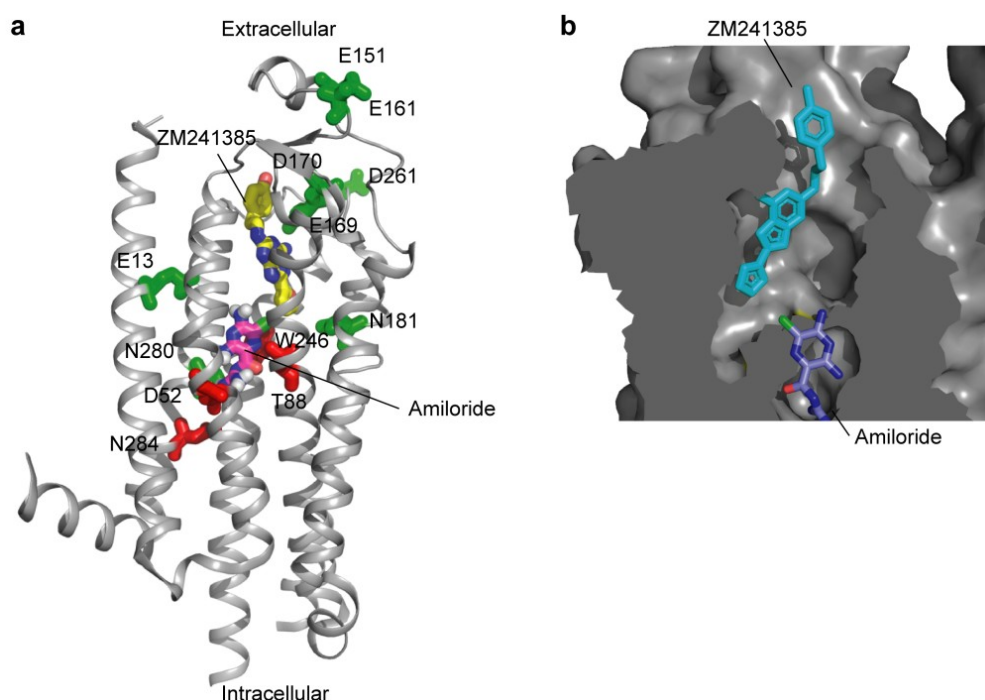


図 31 アミロライドのドッキング解析。

a. 逆アゴニスト ZM241385 結合状態 A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造 (PDB ID: 4EIY) とアミロライドのドッキング構造。残基の色分けは図 24 と同様。

b. surface 表示のドッキング構造の断面図。

### 3-4 アミロライドによる $A_{2A}$ 受容体の活性変化

従来の研究では、 $A_{2A}$  受容体のシグナル伝達やアゴニスト解離に対してアミロライドが与える影響については不明であった。そこで本節では、アミロライド存在下と非存在下における  $A_{2A}$  受容体の各種活性を測定することで、アミロライド依存的な  $A_{2A}$  受容体の活性変化を定量した。

#### 3-4-1 シグナル伝達活性に対する作用

まず、 $A_{2A}$  受容体のシグナル伝達活性に対するアミロライドの影響を調べた。 $A_{2A}$  受容体を一過的に発現させた HEK293T 細胞に、アミロライド存在下または非存在下でアゴニスト NECA の刺激を与えた。その細胞を可溶化し、蛍光標識 cAMP と抗 cAMP 抗体を用いた競合法によって cAMP 産生量を測定した。

その結果、アミロライド存在下で産生された cAMP の産生量は非存在下のその 30 % 程度に低下していた (図 32)。この結果から、アミロライドは  $A_{2A}$  受容体の G 蛋白質シグナル活性を阻害すると考えた。

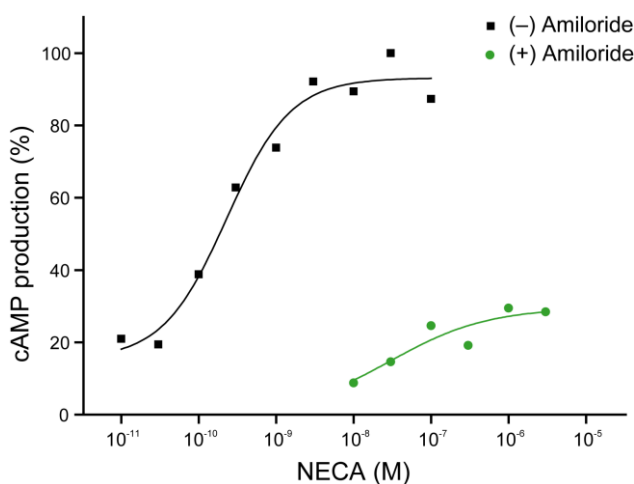


図 32  $A_{2A}$  受容体を介した cAMP 産生に対するアミロライドの影響。

アミロライド非存在下 (黒) と存在下 (赤) において  $A_{2A}$  受容体発現 HEK293T 細胞にアゴニスト NECA 刺激を与えたときの cAMP 産生量をプロットした。



### 3-4-2 リガンド解離速度に対する作用

次に、 $A_{2A}$  受容体とアゴニストの解離速度に対してアミロライドが与える作用を解析し、逆アゴニストの場合と比較した。 $A_{2A}$  受容体を一過的に発現させた HEK293T 細胞の膜画分に用いて、リガンド解離アッセイを行った。

逆アゴニスト [ $^3H$ ]ZM241385 の解離速度は、アミロライド存在下では非存在下と比較して、前述のように約 2.1 倍加速した (図 33)。アミロライド誘導体の HMA の存在下で同様のアッセイを行ったところ、 [ $^3H$ ]ZM241385 の解離速度は 2.8 倍まで速くなった。一方、アゴニスト [ $^3H$ ]NECA の解離速度は、アミロライド存在下では非存在下よりも約 0.87 倍まで遅くなった。HMA 存在下では、さらに約 0.29 倍まで減速した。

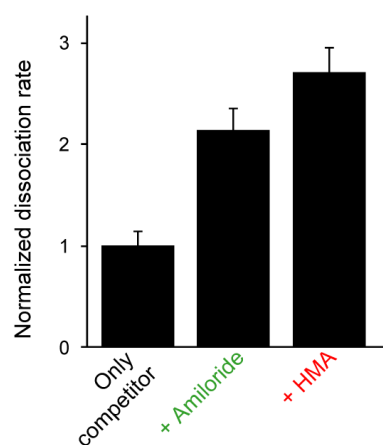
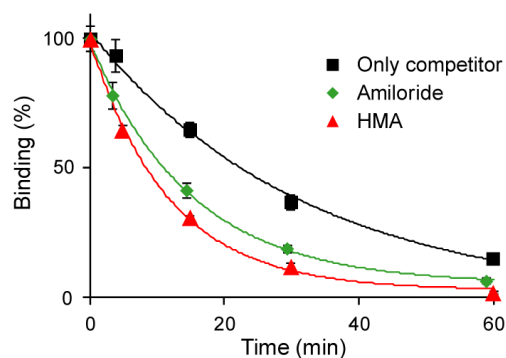
このことから、アゴニストと逆アゴニストの解離に対してアミロライドや HMA は逆の作用を持つことが明らかになった。

表 3  $A_{2A}$  受容体からのリガンド解離速度に対するアミロライドと HMA の作用。

図 33 のリガンド解離アッセイから求めたアゴニスト [ $^3H$ ]NECA と逆アゴニスト [ $^3H$ ]ZM241385 の解離速度 ( $\text{min}^{-1}$ ) を示した。括弧内の数値は、拮抗薬のみ (only competitor) のときの解離速度に対する比を表している。

Orthosteric ligand	Only competitor	+ Amiloride	+ HMA
Agonist NECA	$0.18 \pm 0.04$	$0.12 \pm 0.03$ (0.87)	$0.013 \pm 0.03$ (0.29)
Inverse agonist ZM241385	$0.031 \pm 0.005$	$0.067 \pm 0.007$ (2.2)	$0.085 \pm 0.008$ (2.7)

### ZM241385 (inverse agonist)



### NECA (agonist)

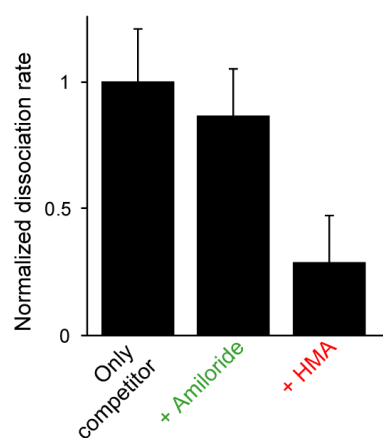
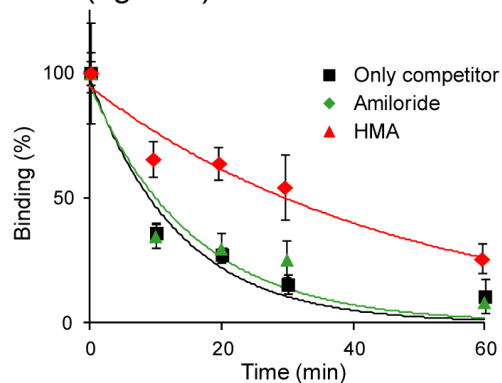


図 33 アミロライドまたは HMA 存在下における逆アゴニストとアゴニストの解離速度。  
 (左) 拮抗薬のみを加えたとき (黒)、アミロライド存在下 (緑)、HMA 存在下 (赤) における逆アゴニスト ZM241385 またはアゴニスト NECA の解離の時間依存性。  
 (右) 左のグラフから求めた各条件での解離速度の比。

### アミロライドによる $A_{2A}$ 受容体の活性の変調のまとめ

- ・アミロライド存在下では、 $A_{2A}$  受容体の G 蛋白質シグナル活性が抑制された。
- ・アミロライドやその誘導体 HMA の存在下では  $A_{2A}$  受容体からの逆アゴニスト  $[^3H]$ ZM241385 の解離が加速し、アゴニスト  $[^3H]$ NECA の解離は減速した。
- ・リガンド解離に対する効果は、アミロライドより HMA の方が大きくなった。

### 3-5 アミロライドによる A<sub>2A</sub> 受容体の構造変化

前節にて、アミロライドが A<sub>2A</sub> 受容体の活性に対して与える作用が明らかになったが、それがどのような構造変化によってもたらされるのかは不明であった。そこで本節では、アミロライドの結合に伴う A<sub>2A</sub> 受容体の構造変化様式を NMR 法によって解析した。

#### 3-5-1 細胞内側領域の構造変化

##### オルソステリックリガンドによる構造変化

はじめに、A<sub>2A</sub> 受容体の G 蛋白質シグナル活性に重要な細胞内側領域について調べることにした。そこで、TM5 の細胞内側にある M211 に着目した (図 34 右)。TM5 の細胞内側は、活性化に伴って大きく構造変化する領域であり、G 蛋白質との相互作用において重要である (図 4)。よって M211 は、活性化に伴う細胞内側領域の構造変化を反映する良いプローブになると考えられる。

まず、オルソステリックリガンドによる構造変化を観測した。具体的には、均一 <sup>2</sup>H, メチル <sup>13</sup>C メチオニン標識 A<sub>2A</sub> 受容体を調製し、アゴニストの UK-432097 と NECA、部分アゴニストの regadenoson と 2-(1-hexynyl)adenosine, LUF5834、または逆アゴニストの ZM241385 存在下で <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC 測定を行った。その結果、M211 のシグナルの化学シフトはリガンド依存的に連続的な変化を示した (図 34 左)。また、その化学シフトは、逆アゴニスト結合状態、部分アゴニスト結合状態、アゴニスト結合状態の順に並んでいた。

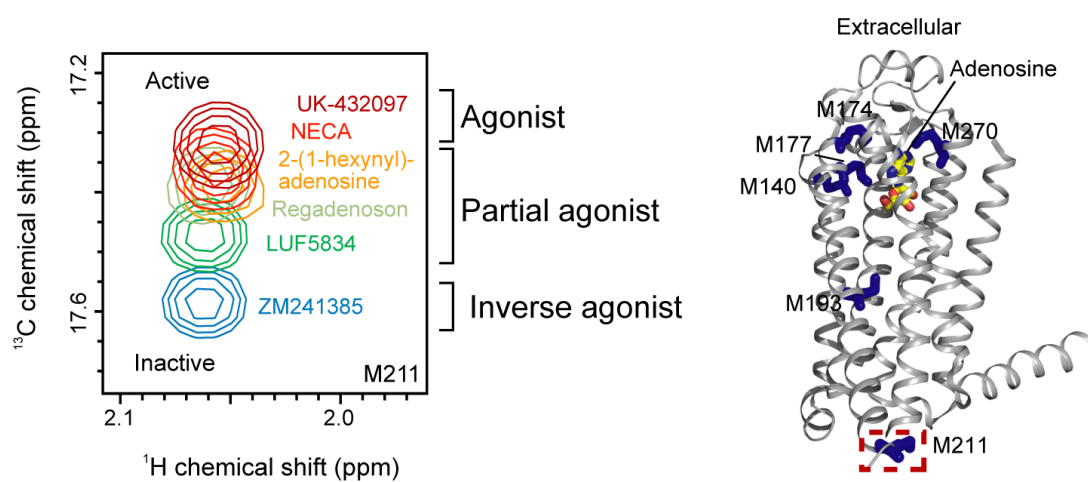


図 34 さまざまなオルソステリックリガンド存在下での  $A_{2A}$  受容体の細胞内側の構造変化。各種オルソステリックリガンド存在下で均一  $^2H$ , メチル  $^{13}C$  メチオニン標識  $A_{2A}$  受容体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC 測定を行った。活性化に伴って大きく構造変化すると考えられている TM5 の細胞内側にある M211 のシグナルを、色を変えて重ね合わせて示した。右図は、アデノシン結合状態  $A_{2A}$  受容体の結晶構造 (PDB ID: 2YDO) 上のメチオニン残基 (青) を示している。

逆アゴニスト結合状態とアゴニスト結合状態を比較すると、M211 の化学シフトは  $^{13}C$  方向高磁場側に変化し、 $^1H$  方向にはほとんど変化しなかった (図 34)。側鎖メチル基の化学シフトは、側鎖のコンフォメーションによって  $^{13}C$  方向に大きく影響を受け、周囲の芳香環との距離や角度によって  $^1H$  方向に大きく影響を受けることが知られている[44-46]。特にメチオニンのメチル基の場合、側鎖の配座が *gauche* 型有的时候には *trans* 型の時よりも  $^{13}C$  方向に高磁場側の化学シフトを示す傾向がある[44]。

逆アゴニスト ZM241385 結合状態およびアゴニスト NECA 結合状態の  $A_{2A}$  受容体の結晶構造では、M211 の側鎖のコンフォメーションはそれぞれ *trans* 型と *gauche* 型になっていた (図 35a)。そのメチル基の周辺に芳香環は存在しないため、環電流効果の変化はほとんどないと推測される。また、これらの結晶構造では、活性化によって G 蛋白質結合ポケットが開くのに伴って TM5 と TM6

の細胞内側が分子の外側にシフトし、さらに TM6 が回転していた (図 35b)。この構造変化をする際に M211 側鎖は、TM6 の L255 などと相互作用してより安定な疎水的環境を形成するために、*trans* 型から *gauche* 型に変化したと考えられる。

このことから、逆アゴニストまたはアゴニスト存在下において観測された M211 シグナルはそれぞれ、結晶構造解析で観測されていた逆アゴニストまたはアゴニスト結合状態のコンフォメーションに対応していると考えた。

また、M211 が連続的な化学シフト変化を示したことから、細胞内側領域の構造変化様式について二つの可能性が示唆される。それは、結合するリガンドごとに M211 が異なるコンフォメーションをとっているという可能性と、二つのコンフォメーションの間を交換する平衡状態にあるという可能性である。

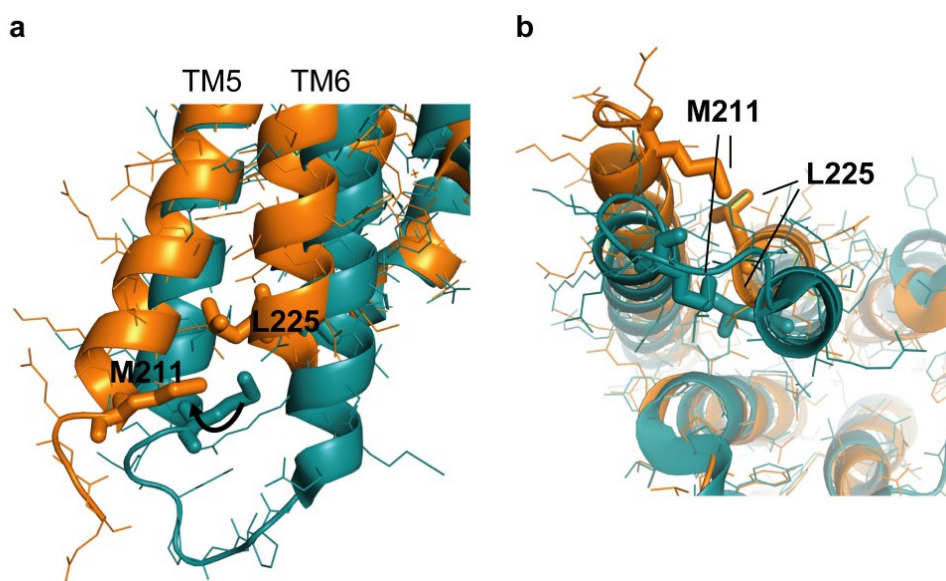


図 35 活性化による A<sub>2A</sub> 受容体の M211 のコンフォメーション変化。

逆アゴニストの ZM241385 結合状態 (青、PDB ID: 3PWH) とアゴニストのアデノシン結合状態 (橙、PDB ID: 2YDO) の A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造の重ね合わせを、ヘリックスに水平な方向 (a) と細胞内側 (b) から見た。活性化によって TM5 と TM6 の細胞内側が分子の外側にシフトしている。

## 温度依存性の解析による構造平衡の検出

M211 の化学シフト変化がどちらの可能性を反映しているのかを調べるために、シグナルの温度依存性を調べた。アゴニスト UK-432097 存在下において測定温度を 25 °C から 15 °C に低下させたところ、二つのシグナルが観測された (図 36)。そのうちの  $^{13}\text{C}$  方向高磁場側のシグナルの化学シフトは、アゴニスト存在下で 25 °C において観測された活性化状態のシグナルの化学シフトと対応していた。一方、 $^{13}\text{C}$  方向低磁場側のシグナルは、逆アゴニスト ZM241385 存在下で 15 °C において観測された不活性化状態のシグナルと対応していた。

この結果は、M211 は活性化コンフォメーションと不活性化コンフォメーションの二状態を交換する平衡状態にあり、温度を低下させたことでその交換速度が遅くなったということを示している。

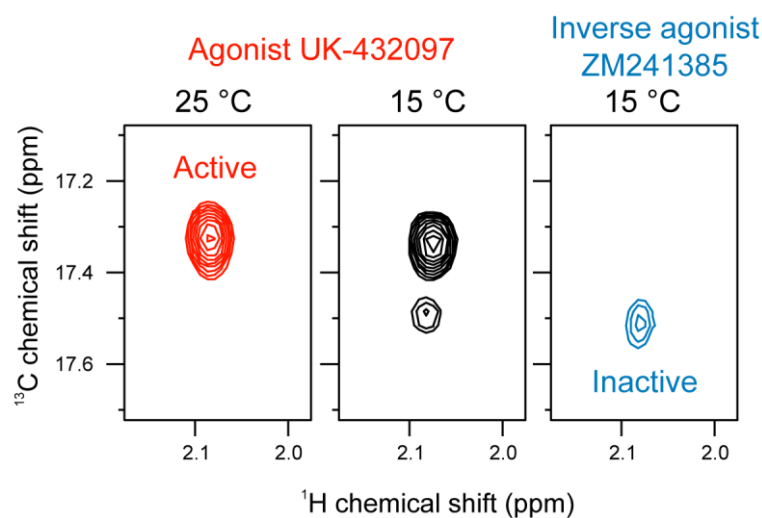


図 36 M211 の NMR シグナルの温度による変化。

アゴニスト UK-432097 結合状態で 25 °C (左) または 15 °C (中央)、および逆アゴニスト ZM241385 結合状態で 15 °C (右) における  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルの M211 シグナルを示した。アゴニスト UK-432097 結合状態で 15 °C のときには、M211 由来のシグナルが二つ観測されていた。

## 構造平衡とシグナル伝達活性の相関

これまでの解析で観測された細胞内側領域の構造平衡が、どのように活性と関わっているのかを調べた。図 38 は、M211 の化学シフト変化量から求めた活性化コンフォメーションの存在割合を縦軸に、cAMP 産生アッセイから求めた最大 cAMP 産生量を横軸にしてプロットした結果を示している。両者の間には高い相関が認められた。

以上の結果から、オルソステリックリガンドが  $A_{2A}$  受容体の細胞内側領域の活性化コンフォメーションの量比を変化させること、および、その活性化コンフォメーションの量比がシグナル伝達の強さを決定することが分かった。

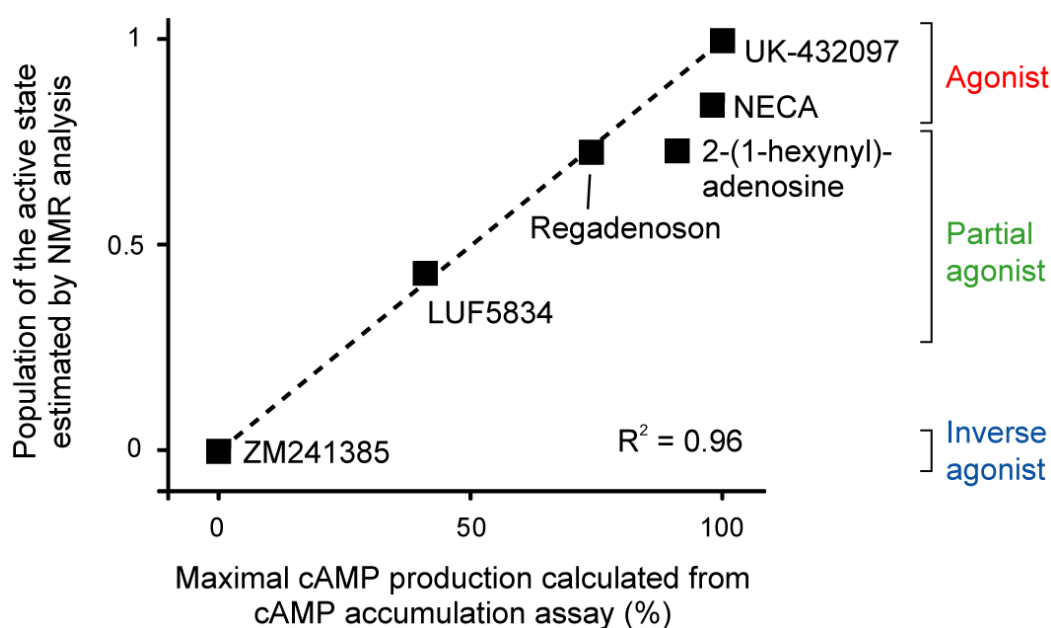


図 37 最大 cAMP 産生量と活性化コンフォメーション量の相関。

$A_{2A}$  受容体発現 HEK293T 細胞を用いたアッセイから求めた最大 cAMP 産生量と NMR 解析から求めた活性化コンフォメーション量をプロットした。LUF5834 存在下での最大 cAMP 産生量は文献の値を用いた[47]。

## アミロライドによる細胞内側領域の構造変化

そこで次に、アミロライドの添加によって  $A_{2A}$  受容体の細胞内側領域の構造平衡がどう変化するかを調べた。アゴニスト UK-432097 のみ、逆アゴニスト ZM241385 のみ、または UK-432097 とアミロライドの存在下において均一  $^2H$ , メチル  $^{13}C$  メチオニン標識  $A_{2A}$  受容体の  $^1H$ - $^{13}C$  HMQC 測定を行い、M211 のシグナルを比較した。

その結果、アゴニストのみが存在するときと比較して、さらにアミロライドが存在するときには、M211 の化学シフトは逆アゴニスト結合状態側にシフトしていた (図 38)。

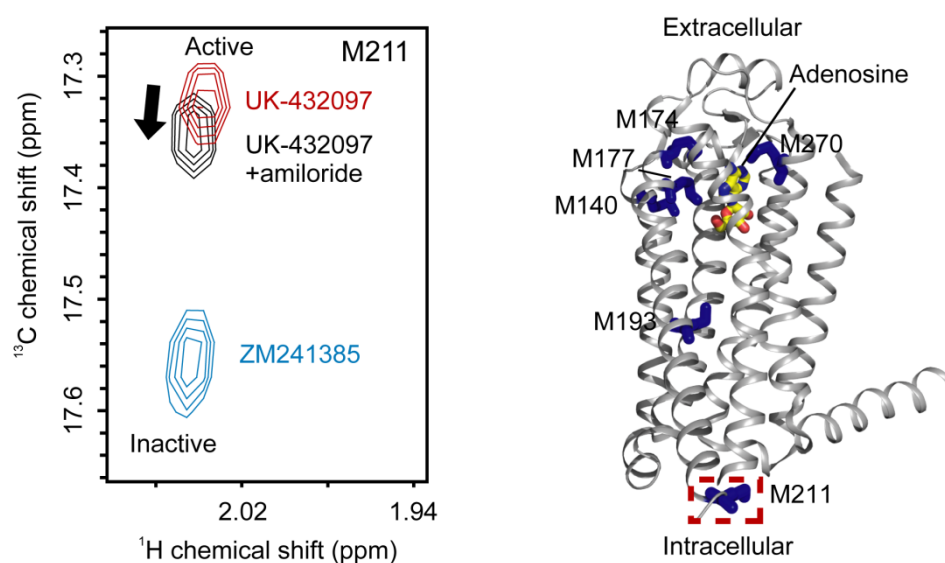


図 38 アミロライドの結合による  $A_{2A}$  受容体の細胞内側領域の構造変化。

逆アゴニスト ZM241385 結合状態 (青)、アゴニスト UK-432097 結合状態 (赤)、および UK-432097 とアミロライド結合状態の  $A_{2A}$  受容体の M211 の NMR シグナルを重ね合わせた。右図は、アデノシン結合状態  $A_{2A}$  受容体の結晶構造 (PDB ID: 2YDO) におけるメチオニン残基 (青) を示している。



### 3-5-2 オルソステリック部位の構造変化

次に、 $A_{2A}$  受容体の細胞外側の構造変化について調べることにした。そこで、分子中腹にあり、オルソステリック部位とアミロライド結合部位の両方に隣接している W129 に着目した (図 39)。W129 は、 $A_{2A}$  受容体の属するロドプシンファミリーにおいて良く保存された残基である[48]。

逆アゴニスト ZM241385 結合状態の結晶構造において、W129 は TM3 の S90 などとヘリックスをまたいだ相互作用を形成していた (図 40)。TM3 は、V86などを介してアゴニストと直接相互作用すると、軸方向細胞外側に約 2 Å 動く。この構造変化はロドプシン-オプシンの系でも観測されており[17]、GPCR の活性化に伴う構造変化において一般的であることが示唆されている。この構造変化によって、W129 と S90 の相互作用様式も変化すると考えられる。よって W129 のシグナルは、アゴニストとの相互作用による TM3 の構造変化を反映すると考えられる[49]。

また、 $A_{2A}$  受容体の結晶構造における W129 の位置から、W129 自身はオルソステリックリガンドやアミロライドとは直接相互作用しないと考えられる。

これらのことから、W129 のシグナルの変化は、リガンド結合に伴う  $A_{2A}$  受容体の細胞外側の構造変化を調べる上で良いプローブになると考えた。

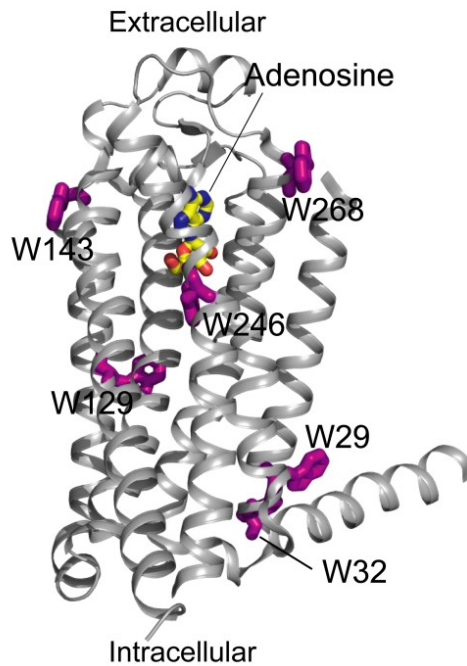


図 39  $A_{2A}$  受容体のトリプトファン残基の分布。

アデノシン結合状態  $A_{2A}$  受容体の結晶構造 (PDB ID: 2YDO) 上のトリプトファン残基 (紫) を示した。

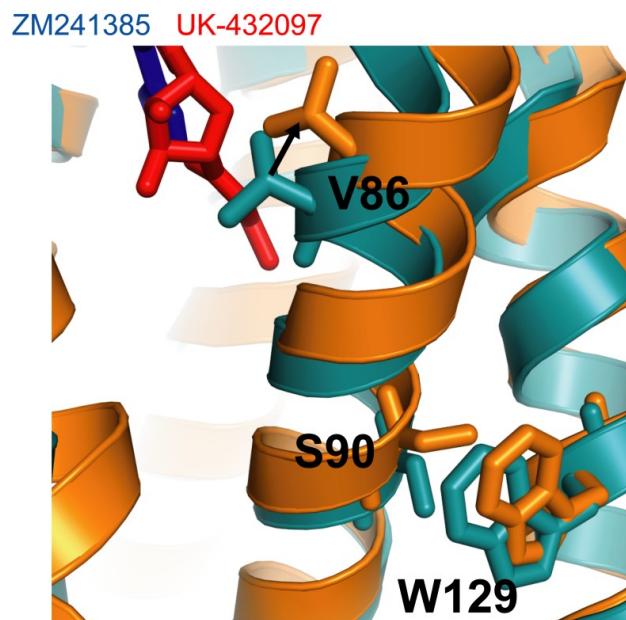


図 40 W129 周辺の構造。

逆アゴニストの ZM241385 結合状態 (青、PDB ID: 4EIY) とアゴニスト UK-432097 結合状態 (橙、PDB ID: 3QAK) の  $A_{2A}$  受容体の結晶構造の重ね合わせ。

まず、均一  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体を調製し、アゴニスト UK-432097 または逆アゴニスト ZM241385 の存在下で  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CRINEPT-HMQC-TROSY 測定を行った。その結果、各スペクトルにおいて W129 に由来する二つのシグナルが観測された (図 41)。また、アゴニスト存在下と逆アゴニスト存在下で W129 のシグナルの化学シフトは異なっていた。

次に、逆アゴニスト ZM241385 存在下にさらにアミロライド誘導体 HMA を添加したところ、W129 の化学シフトは、逆アゴニストのみが存在する時よりもアゴニスト存在下の方向にシフトしていた。

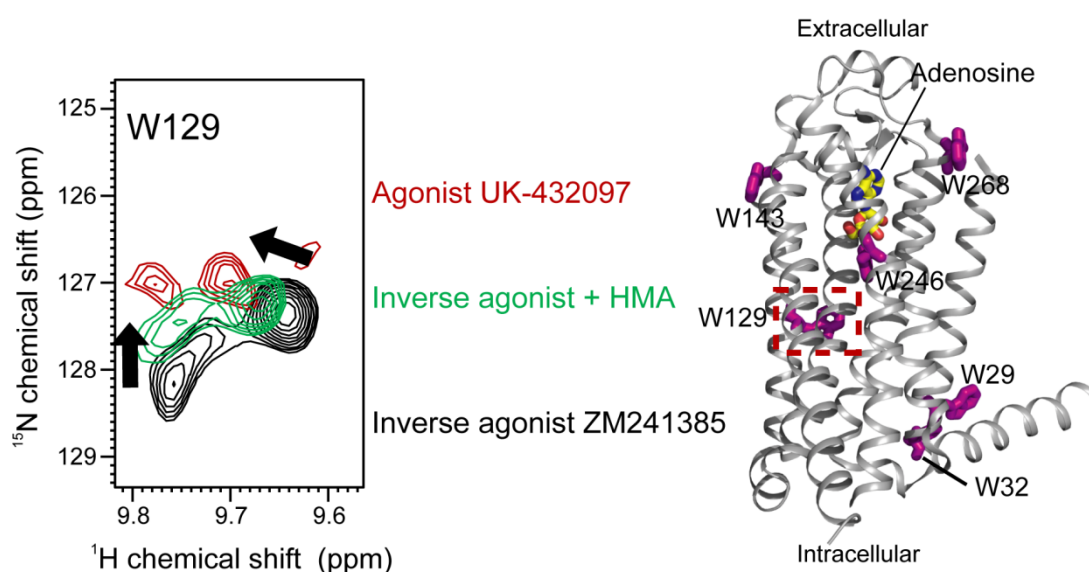


図 41 アロステリックモジュレーター存在下における均一  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CRINEPT-HMQC-TROSY 解析。

アゴニスト UK-432097 存在下 (赤)、逆アゴニスト ZM241385 存在下 (黒)、ZM241385 とアミロライド誘導体 HMA の存在下 (緑) における W129 シグナルを重ね合わせた。右図はアデノシン結合状態  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体の結晶構造 (PDB ID: 2YDO) におけるトリプトファン残基 (紫) を示している。

## 第4章 考察

### 4-1 アミロライドによる $A_{2A}$ 受容体の細胞内側の構造変化とシグナル伝達活性の関係

本研究ではまず、G 蛋白質との相互作用に重要な細胞内側領域の動的構造の変化を調べるために、 $A_{2A}$  受容体の TM5 の細胞内側にある M211 をプローブとした NMR 解析を行った (図 34、図 36)。M211 は、活性化によって G 蛋白質結合ポケットが開くのに伴って構造変化する残基である。解析の結果、細胞内側領域の構造変化様式について以下のことが明らかになった (図 42)。

1. 細胞内側領域は、活性化コンフォメーションと不活性コンフォメーションを常に交換する平衡状態にある。
2. 活性化コンフォメーションは細胞内側が開いた構造に、不活性コンフォメーションは細胞内側が閉じた構造に対応する。
3. 二つのコンフォメーションの量比は、リガンド依存的に変化する。

また、M211 の化学シフト変化量から見積もった活性化コンフォメーションの量比と、cAMP 産生アッセイから求めた cAMP 産生量には高い相関があった (図 37)。これらの結果から、 $A_{2A}$  受容体の細胞内側領域の構造平衡における活性化コンフォメーションの量比がシグナル伝達強度を決定すると結論した。

我々は近年、 $A_{2A}$  受容体と同じロドプシンファミリーに属する GPCR である  $\beta_2$  アドレナリン受容体のシグナル伝達活性が、その膜貫通領域の構造平衡の

変化によって調節されることを見出していた[36]。よって、このような構造平衡の変化によるシグナル伝達活性の制御という機構は、GPCR に共通する性質であるということが考えられる。

アミロライド存在下での M211 の NMR シグナルの挙動から (図 38)、アミロライドの結合によっても細胞内側の構造平衡が変化することが明らかになった。アゴニストのみが結合した状態では、細胞内側の平衡はほとんど活性化状態側に偏っていた。しかし、さらにアミロライドが結合すると、アゴニストも結合しているにもかかわらず平衡は不活性側にシフトしたのである (図 42)。また、cAMP 産生アッセイの結果から、アミロライド存在下ではアゴニスト依存的な cAMP 産生が抑制されることが示された (図 32)。これらの結果からアミロライドは、アゴニストが同時に結合している状態であっても、A<sub>2A</sub> 受容体の細胞内側の構造平衡を不活性側にシフトさせてシグナル伝達を抑制すると考えた。

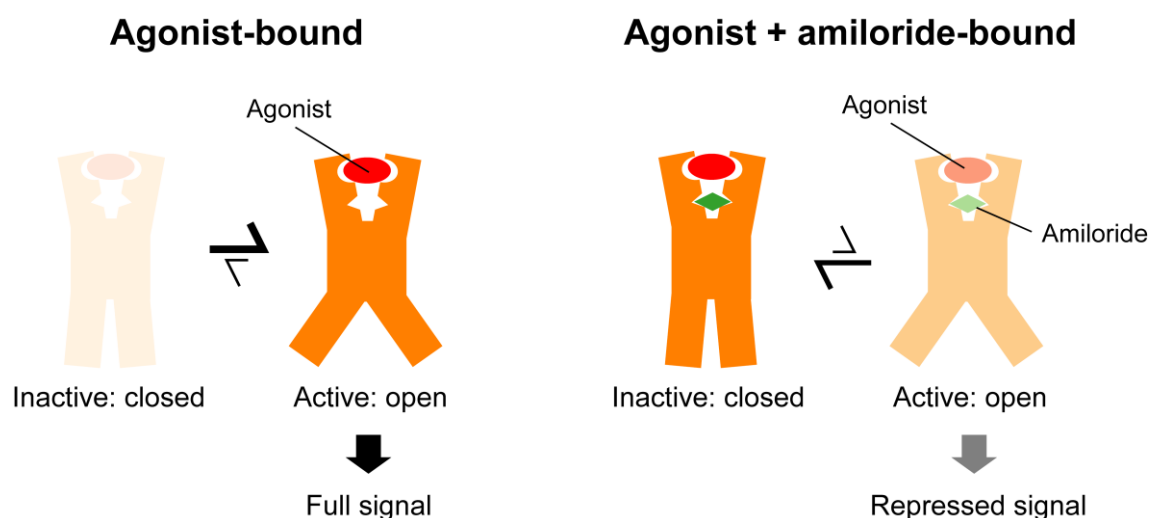


図 42 A<sub>2A</sub> 受容体の細胞内側領域の構造平衡とシグナル伝達活性の関係。

A<sub>2A</sub> 受容体の細胞内側領域は、活性化コンフォメーションと不活性コンフォメーションを交換する平衡状態にある。アゴニスト結合状態ではそれが活性化コンフォメーション側にほとんど偏っている。さらにアミロライドが結合した場合、アゴニストも結合しているにもかかわらず、平衡は不活性側にシフトする。それによりシグナル伝達が抑制される。

## 4-2 アミロライドによるオルソステリック部位周辺の構造変化とリガンド結合活性の関係

次に、 $A_{2A}$  受容体のオルソステリック部位周辺の構造平衡とリガンド結合活性の関係について調べるために、オルソステリック部位とアミロライド結合部位の両方に隣接している W129 をプローブとした NMR 解析を行った(図 39、図 40)。

解析の結果、W129 のシグナルはアゴニスト結合状態と逆アゴニスト結合状態で異なる化学シフトを示した(図 41)。 $A_{2A}$  受容体の結晶構造解析から、逆アゴニスト結合状態のオルソステリック部位は開いたコンフォメーションをしており、アゴニスト結合状態では閉じたコンフォメーションをしていることが報告されている(図 3、図 43)。また、生化学的な解析から、逆アゴニスト結合状態とアゴニスト結合状態のコンフォメーションはそれぞれ、逆アゴニストまたはアゴニストの結合に有利なコンフォメーションであると考えられている[50](図 43)。よって、アゴニストまたは逆アゴニスト存在下の NMR 解析で観測された W129 のシグナルは、それぞれアゴニスト結合に有利なコンフォメーションと逆アゴニスト結合に有利なコンフォメーションに対応すると考えた。

逆アゴニスト存在下の  $A_{2A}$  受容体に対してさらに HMA を添加すると、W129 の化学シフトはアゴニスト結合状態側にシフトした。このことから、HMA 存在下では、すでに逆アゴニストが結合しているにも関わらず、オルソステリック部位の構造平衡がアゴニスト結合に有利な側にシフトしていることが示唆される(図 43)。

リガンド解離アッセイの結果から、アミロライドや HMA 存在下ではアゴニストの解離は遅くなり、逆アゴニストの解離は速くなることが示された。よ

って、このような活性の変化が起きるのは、HMA が  $A_{2A}$  受容体のオルソステリック部位の構造平衡をアゴニスト結合に有利な側にシフトさせるためであると考えた。

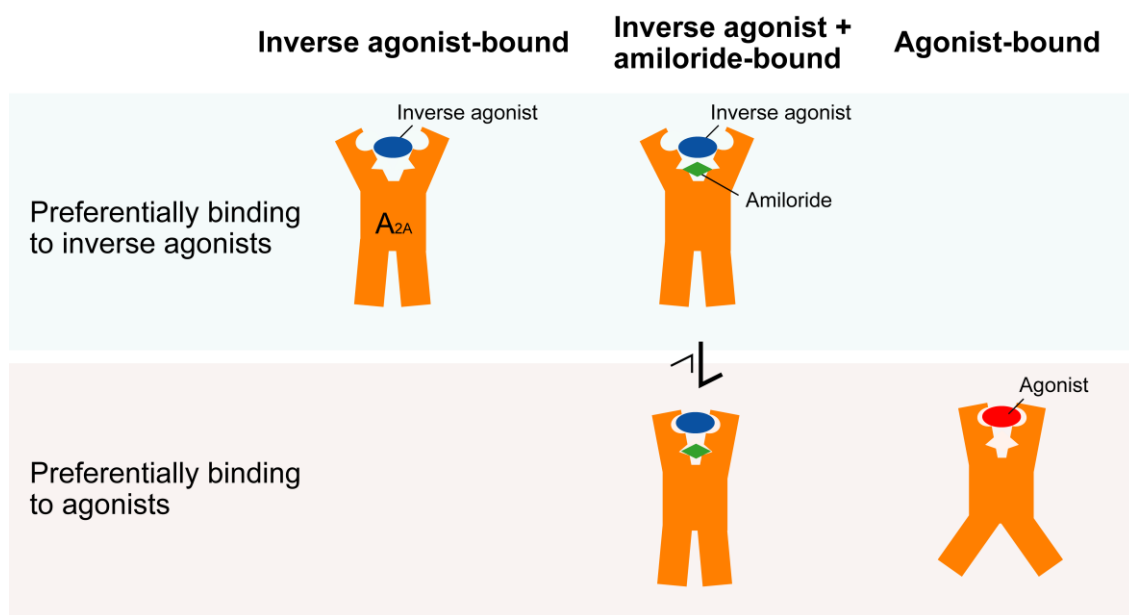


図 43  $A_{2A}$  受容体のオルソステリック部位の構造平衡のリガンド依存的な変化。

オルソステリック部位は、逆アゴニスト結合に有利な閉じたコンフォメーションと、アゴニスト結合に有利な閉じたコンフォメーションの間の平衡状態にある。アミロライドはこの平衡を変化させることで、逆アゴニストの解離を速め、アゴニストの解離を遅くする。

### 4-3 アミロライドがオルソステリック部位と細胞内側の構造平衡を同時に制御する機構

本研究で行った NMR 解析や変異体解析、ドッキング解析の結果から、アミロライドは A<sub>2A</sub> 受容体分子の中腹に結合すると考えた (図 44)。この位置は、細胞内側にあり活性化に重要な NPxxY モチーフの N284 や、アゴニスト認識と活性化に寄与する H250 などの中間に位置する[9, 51, 52]。そのため、アミロライドはオルソステリック部位と細胞内側領域の両方に作用できると推測した。

また、アゴニスト結合状態の A<sub>2A</sub> 受容体の細胞内側にある W29 や W32, M193 の NMR シグナルが顕著に広幅化していたことから (図 22、図 23、図 24)、アゴニストが結合して活性化した A<sub>2A</sub> 受容体の細胞内側領域は、複数のコンフォメーションを交換していることが示唆される。このような活性化状態におけるコンフォメーション交換の存在は、β<sub>2</sub> アドレナリン受容体などにおいても観測されている[36, 37]。また、これまでに行われたアゴニスト結合状態 A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造解析では、細胞内側領域が開いたものと閉じたものの両方が報告されている[9, 10]。したがって、アゴニストが結合した A<sub>2A</sub> 受容体のコンフォメーションには、オルソステリック部位と細胞内側領域のそれぞれの活性-不活性の平衡が連動していない状態が存在すると考えた。

以上のことから、アミロライドや HMA はアゴニスト結合状態 A<sub>2A</sub> 受容体に結合することで、オルソステリック部位が活性化状態で細胞内側領域が不活性化状態になるように平衡をシフトさせると推測した (図 42、図 43)。また、アゴニストが結合しているのに細胞内側が不活性な GPCR の結晶構造が複数知られていることから、このようにオルソステリック部位と細胞内側領域の構造平衡が別々に制御されるという機構は、GPCR に広く共通することが示唆される。



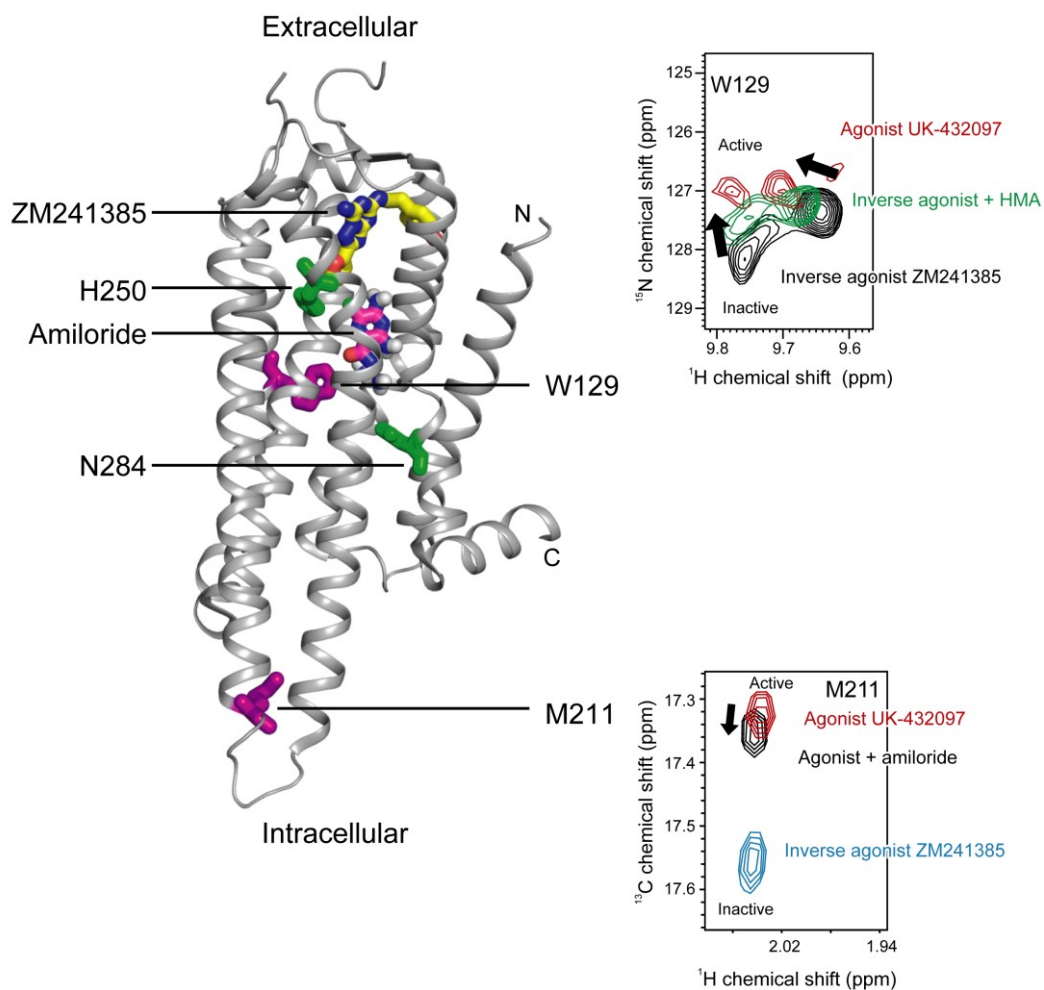


図 44 アミロライドの結合位置と活性に重要な残基。

逆アゴニスト ZM241385 結合状態熱安定変異 A<sub>2A</sub> 受容体の結晶構造 (PDB ID: 3PWH) に対して、前述のドッキング構造のアミロライド (図 31) を重ね合わせた。アゴニスト認識に重要な H250 (緑)、細胞内領域の活性化に重要な NPxxY モチーフの N284 (緑)、NMR 解析でプローブとした W129 と M211 (紫) およびそれらの NMR スペクトル (図 41、図 38) を示した。

## 第5章 結論

A<sub>2A</sub>受容体は神経伝達や炎症反応を制御する GPCR であり、そのアロステリックモジュレーターは新しい種類の薬剤として期待されている。しかしこれまで、その作用機構はほとんど不明であった。そこで本論文では、NMR 解析や変異体解析、ドッキング解析を組み合わせることによって、A<sub>2A</sub>受容体のオルソステリック部位よりも細胞内側の領域にあるアミロライド結合部位を同定した。また、NMR を用いた構造解析から、A<sub>2A</sub>受容体の細胞外側領域と細胞内側領域はそれぞれ活性化コンフォメーションと不活性コンフォメーションの間を交換する平衡状態にあることが明らかになった。アミロライドは、細胞外側の平衡を活性化状態側に、細胞内側の平衡を不活性状態側にシフトさせることで、アゴニスト解離の減速とシグナル伝達の抑制を起こすという機構を提唱した。

A<sub>2A</sub>受容体を含めた GPCR の従来の構造生物学的研究は、静的な構造を解析する結晶構造解析が中心であった。しかし、生体内における GPCR は動的に変化する構造をしており、それが機能に重要な役割を果たす。本研究は、このような本来の状態により近い構造を解明することに成功したと考えられる。

本研究を通じて得られた分子機構の理解は、より効果的なアロステリックモジュレーターを理論的に設計するために役立つと期待される。今後アミロライドを発展させた薬剤が創られた場合、いくつかの利用法が考えられる。例えば、A<sub>2A</sub>受容体の不活性化はパーキンソン病などの神経変性疾患の治療に繋がることが知られていることから、それらの疾患の治療薬として直接使用できる可能性がある。また、他の GPCR に何らかの薬剤を作用させたい場合にアミロライドを併用することで、A<sub>2A</sub>受容体へのオフターゲットな結合を抑制し、副作

用を低減するという間接的な使い方も考えられる。本研究の知見は、このような医薬品を創出することに貢献できるであろう。また、本研究で用いた試料調製や解析の手法は他の GPCR に対しても適応可能であることから、より多くの疾患領域における創薬研究も加速することが期待される。

## 第6章 参考文献

1. Fredholm, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* **14**, 1315-23 (2007).
2. Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B. & Pacher, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 759-70 (2008).
3. Jacobson, K. A. & Gao, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 247-64 (2006).
4. Palmer, T. M. & Trevethick, M. A. Suppression of inflammatory and immune responses by the A(2A) adenosine receptor: an introduction. *Br J Pharmacol* **153**, S27-34 (2008).
5. Ferre, S., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P. & Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **20**, 482-7 (1997).
6. Ferre, S., Diamond, I., Goldberg, S. R., Yao, L., Hourani, S. M., Huang, Z. L., Urade, Y. & Kitchen, I. Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry implications for drug addiction, sleep and pain. *Prog Neurobiol* **83**, 332-47 (2007).
7. Neves, S. R., Ram, P. T. & Iyengar, R. G protein pathways. *Science* **296**, 1636-9 (2002).
8. Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P. & Stevens, R. C. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**, 1211-7 (2008).
9. Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Jacobson, K. A., Gao, Z. G., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* **332**, 322-7 (2011).
10. Lebon, G., Warne, T., Edwards, P. C., Bennett, K., Langmead, C. J., Leslie, A. G. & Tate, C. G. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **474**, 521-5 (2011).
11. Dore, A. S., Robertson, N., Errey, J. C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B., Hurrell, E., Bennett, K., Congreve, M., Magnani, F., Tate, C. G., Weir, M. & Marshall, F. H. Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with

- ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure* **19**, 1283-93 (2011).
12. Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., Cameron, A. D., Kobayashi, T., Hamakubo, T., Iwata, S. & Murata, T. G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* **482**, 237-40 (2012).
  13. Congreve, M., Andrews, S. P., Dore, A. S., Hollenstein, K., Hurrell, E., Langmead, C. J., Mason, J. S., Ng, I. W., Tehan, B., Zhukov, A., Weir, M. & Marshall, F. H. Discovery of 1,2,4-triazine derivatives as adenosine A(2A) antagonists using structure based drug design. *J Med Chem* **55**, 1898-903 (2012).
  14. Liu, W., Chun, E., Thompson, A. A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G. W., Roth, C. B., Heitman, L. H., AP, I. J., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* **337**, 232-6 (2012).
  15. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K. & Kobilka, B. K. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549-55 (2011).
  16. Deupi, X. & Standfuss, J. Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 541-51 (2011).
  17. Scheerer, P., Park, J. H., Hildebrand, P. W., Kim, Y. J., Krauss, N., Choe, H. W., Hofmann, K. P. & Ernst, O. P. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**, 497-502 (2008).
  18. White, J. F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., Gvozdenovic-Jeremic, J., Shah, P., Shiloach, J., Tate, C. G. & Grisshammer, R. Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* **490**, 508-13 (2012).
  19. Kruse, A. C., Ring, A. M., Manglik, A., Hu, J., Hu, K., Eitel, K., Hubner, H., Pardon, E., Valant, C., Sexton, P. M., Christopoulos, A., Felder, C. C., Gmeiner, P., Steyaert, J., Weis, W. I., Garcia, K. C., Wess, J. & Kobilka, B. K. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **504**, 101-6 (2013).
  20. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., DeVree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I. & Kobilka, B. K. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2)

- adrenoceptor. *Nature* **469**, 175-80 (2011).
21. Gao, Z. G. & Ijzerman, A. P. Allosteric modulation of A(2A) adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. *Biochem Pharmacol* **60**, 669-76 (2000).
  22. Conn, P. J., Christopoulos, A. & Lindsley, C. W. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 41-54 (2009).
  23. Wootten, D., Christopoulos, A. & Sexton, P. M. Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 630-44 (2013).
  24. Chen, J. F., Eltzschig, H. K. & Fredholm, B. B. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* **12**, 265-86 (2013).
  25. Lindberg, J. S., Culleton, B., Wong, G., Borah, M. F., Clark, R. V., Shapiro, W. B., Roger, S. D., Husserl, F. E., Klassen, P. S., Guo, M. D., Albizem, M. B. & Coburn, J. W. Cinacalcet HCl, an oral calcimimetic agent for the treatment of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis and peritoneal dialysis: a randomized, double-blind, multicenter study. *J Am Soc Nephrol* **16**, 800-7 (2005).
  26. Wu, S. & Letchworth, G. J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques* **36**, 152-4 (2004).
  27. Religa, T. L., Sprangers, R. & Kay, L. E. Dynamic regulation of archaeal proteasome gate opening as studied by TROSY NMR. *Science* **328**, 98-102.
  28. Hulme, E. C. & Trevethick, M. A. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br J Pharmacol* **161**, 1219-37 (2010).
  29. May, L. T. & Christopoulos, A. Allosteric modulators of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 551-6 (2003).
  30. Motulsky, H. J. & Mahan, L. C. The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. *Mol Pharmacol* **25**, 1-9 (1984).
  31. Cosconati, S., Forli, S., Perryman, A. L., Harris, R., Goodsell, D. S. & Olson, A. J. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. *Expert Opin Drug Discov* **5**, 597-607 (2010).
  32. Homer, R. J., Kim, M. S. & LeMaster, D. M. The use of cystathionine gamma-synthase in the production of alpha and chiral beta deuterated amino acids. *Anal Biochem* **215**, 211-5 (1993).
  33. Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M. J. & Tate, C. G. Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A* **105**, 10744-9 (2008).
34. van Tilburg, E. W., Gremmen, M., von Frijtag Drabbe Kunzel, J., de Groote, M. & AP, I. J. 2,8-Disubstituted adenosine derivatives as partial agonists for the adenosine A2A receptor. *Bioorg Med Chem* **11**, 2183-92 (2003).
  35. Fraser, N. J. Expression and functional purification of a glycosylation deficient version of the human adenosine 2a receptor for structural studies. *Protein Expr Purif* **49**, 129-37 (2006).
  36. Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Maeda, M., Tsujishita, H. & Shimada, I. Efficacy of the beta(2)-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat Commun* **3**, 1045 (2012).
  37. Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R. O., Mildorf, T. J., Arlow, D. H., Manglik, A., Pan, A. C., Liu, C. W., Fung, J. J., Bokoch, M. P., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Shaw, D. E., Mueller, L., Prosser, R. S. & Kobilka, B. K. The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell* **152**, 532-42 (2013).
  38. Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Mizumura, T., Suzuki, S. & Shimada, I. Functional Dynamics of Deuterated beta2 -Adrenergic Receptor in Lipid Bilayers Revealed by NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**, 13376-9 (2014).
  39. Sprangers, R., Velyvis, A. & Kay, L. E. Solution NMR of supramolecular complexes: providing new insights into function. *Nat Methods* **4**, 697-703 (2007).
  40. Gardner, K. H. & Kay, L. E. The use of <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**, 357-406 (1998).
  41. Tugarinov, V., Hwang, P. M., Ollerenshaw, J. E. & Kay, L. E. Cross-correlated relaxation enhanced <sup>1</sup>H[<sup>13</sup>C] NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *J Am Chem Soc* **125**, 10420-8 (2003).
  42. Ruschak, A. M. & Kay, L. E. Methyl groups as probes of supra-molecular structure, dynamics and function. *J Biomol NMR* **46**, 75-87 (2010).
  43. Christopoulos, A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 198-210 (2002).
  44. London, R. E., Wingad, B. D. & Mueller, G. A. Dependence of amino acid side chain <sup>13</sup>C shifts on dihedral angle: application to conformational analysis. *J Am Chem Soc* **130**, 11097-105 (2008).
  45. Butterfoss, G. L., DeRose, E. F., Gabel, S. A., Perera, L., Krahn, J. M., Mueller,

- G. A., Zheng, X. & London, R. E. Conformational dependence of  $^{13}\text{C}$  shielding and coupling constants for methionine methyl groups. *J Biomol NMR* **48**, 31-47 (2010).
46. Perkins, S. J. & Wuthrich, K. Ring current effects in the conformation dependent NMR chemical shifts of aliphatic protons in the basic pancreatic trypsin inhibitor. *Biochim Biophys Acta* **576**, 409-23 (1979).
  47. Lane, R., Klein Herenbrink, C., van Western, G. J., Spoorendonk, J. A., Hoffmann, C. & Ijzerman, A. P. A Novel Non-ribose Agonist, LUF5834, Engages Distinct Residues from that of Adenosine-like Ligands to Activate the Adenosine A2A Receptor. *Mol Pharmacol* (2012).
  48. Mirzadegan, T., Benko, G., Filipek, S. & Palczewski, K. Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry* **42**, 2759-67 (2003).
  49. Lee, Y., Choi, S. & Hyeon, C. Mapping the intramolecular signal transduction of G-protein coupled receptors. *Proteins* **82**, 727-43 (2013).
  50. Yao, X. J., Velez Ruiz, G., Whorton, M. R., Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Deupi, X., Sunahara, R. K. & Kobilka, B. The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9501-6 (2009).
  51. Jiang, Q., Lee, B. X., Glashofer, M., van Rhee, A. M. & Jacobson, K. A. Mutagenesis reveals structure-activity parallels between human A2A adenosine receptors and biogenic amine G protein-coupled receptors. *J Med Chem* **40**, 2588-95 (1997).
  52. Audet, M. & Bouvier, M. Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell* **151**, 14-23 (2012).



# 謝辞

本研究を行う機会と素晴らしい環境を与えて頂き、また、日々の研究や本論文の執筆において貴重なご助言と激励を賜ったのみならず、研究者としての信念をご教授頂きました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の嶋田一夫教授に心より感謝と御礼を申し上げます。

本研究を行うにあたり、特に本論文を執筆するにあたって熱心なご助言とご指摘を頂きました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の上田卓見助教に深く感謝を申し上げます。

本研究の開始当初より技術的なご助言や GPCR に関する知見についてのご指導を頂き、また、熱心に議論をして頂きました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の幸福裕特任助教に深く感謝を申し上げます。

日々の研究において貴重なご助言と激励を終始頂きました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の大澤匡範講師と西田紀貴助教に深く感謝を申し上げます。

日々の研究においてさまざまな形でご助力を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の皆様、特に、同じ研究グループのメンバーとして多くのご協力を頂いた水村拓也修士に深く感謝致します。

そして、大学院での研究と勉学に打ち込むにあたり、経済面や精神面で常に私を支えてくださった両親、妹、友人たちに心より感謝を申し上げます。