

審査の結果の要旨

氏名 近藤 啓太

本論文は、G 蛋白質共役型受容体の一種であるアデノシン A_{2A} 受容体を研究対象とし、その活性がアロステリックモジュレーターによって制御される機構について研究したものである。論文は全六章から構成されている。第一章では研究の背景と目的を述べ、第二章で方法と材料、第三章で結果、第四章で考察、第五章で総括、そして第六章で参考文献について記述している。

第一章において、 A_{2A} 受容体の生理機能や、パーキンソン病や関節リウマチなどの疾患に対する薬物標的としての重要性が述べられている。関連する重要な先行研究として、アゴニストまたは逆アゴニストが結合した A_{2A} 受容体の結晶構造を挙げている。また、新しいクラスのリガンドであるアロステリックモジュレーターの有用性について述べている。そして、アロステリックモジュレーターの理論的な創出のために重要な情報、具体的には結合部位や構造変化様式に関する知見がほとんど得られていないことを問題としている。そこで、研究の目的として、アロステリックモジュレーターが A_{2A} 受容体の活性を変化させる機構を解明することを設定していた。

第二章では、本論文で用いられた材料の調製法や操作手順、解析法について記述されていた。なお、 A_{2A} 受容体のアロステリックモジュレーターとして、アミロライドとその誘導体 HMA が用いられた。

第三章では、第二章の方法によって得られた結果について述べている。本章は主に三つの内容から成っている。一つ目は、 A_{2A} 受容体のアミロライドの結合部位の同定である。まず、アミロライド存在下の A_{2A} 受容体の構造変化を NMR 法で直接観測することによって、 A_{2A} 受容体に対してアミロライドが実際に結合することを示していた。次に、NMR 解析と変異体解析を組み合わせ、アミロライドの結合部位を提示した。さらに、 A_{2A} 受容体とアミロライドのドッキング解析によって、同定された結合部位にアミロライドが結合することが空間的に可能であることを確認していた。

二つ目の内容は、アミロライド存在下での A_{2A} 受容体の活性変化の定量である。まず、cAMP 産生アッセイによって、アミロライドを作用させたとき A_{2A} 受容体のシグナル伝達活性が抑制されることが示されていた。また、リガンド解離アッセイを行ったところ、アミロライド存在下では A_{2A} 受容体からのアゴニストの解離は遅くなり、一方、逆アゴニストの解離は速くなることが観測された。

第三章の主な内容の三つ目は、NMR 法を用いた A_{2A} 受容体の構造変化の解析である。まず、 A_{2A} 受容体のシグナル伝達活性に重要な細胞内側領域にある M211 をプローブとした NMR 解析が行われた。その結果、細胞内側領域が活性化コンフォメーション

ンと不活性コンフォメーションの平衡状態にあり、その量比がリガンド依存的に変化することが明らかにされた。また、その活性化コンフォメーションの存在割合とシグナル伝達強度に高い相関があることが示された。加えて、アミロライド存在下ではその平衡が不活性側にシフトすることが観測された。続いて、 A_{2A} 受容体のリガンド結合部位とアミロライド結合部位の周辺にある W129 をプローブとした NMR 解析も行われた。その結果、W129 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構造平衡状態にあり、逆アゴニストとアミロライド誘導体 HMA の共存下では、構造平衡が活性化状態側にシフトすることが示された。

第四章では、前章の結果をもとにして、アミロライドが A_{2A} 受容体の活性を制御する機構について考察している。まず、 A_{2A} 受容体の細胞内側領域は構造平衡状態にあり、その活性化コンフォメーションの量比がシグナル伝達活性を規定することが論じられた。アミロライド存在下では、アゴニストも結合しているにもかかわらず細胞内側領域の構造平衡が不活性側にシフトするために、シグナル伝達活性が抑制されると考察している。

一方、オルソステリック部位周辺は、アゴニストの結合に有利なコンフォメーションと、逆アゴニストの結合に有利なコンフォメーションの間の構造平衡にあることが考察された。アミロライドが結合することで、逆アゴニストがすでに結合している状態であっても、構造平衡が前者の側にシフトすることが提唱された。

最後に、上記の NMR 解析や A_{2A} 受容体の結晶構造解析の知見を総合して、アミロライドはアゴニスト結合状態 A_{2A} 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状態になるように平衡をシフトさせると結論した。

本論文は、 A_{2A} 受容体とアミロライドの結合様式、結合に伴う A_{2A} 受容体の構造変化、および活性変化のそれぞれを詳細に解析している。これにより、これまでほとんど解明されていなかった A_{2A} 受容体のアロステリック制御に対して新たな構造生物学的知見を与えたことは高く評価できる。特に、従来の A_{2A} 受容体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が、本論文ではその動的構造の変化に着目することで、従来とは異なる観点からシグナル伝達機構を説明している点は大きな成果である。したがって、本論文が博士（薬科学）の学位を授与するのにふさわしいものであると認定する。