

氏名	おく だ あゆむ 奥 田 歩
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第482号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	ヒト・ $\beta 2$ アドレナリンレセプター細胞内第三ループに関する溶液内立体分子構造の研究
論文調査委員	(主査) 教授 多賀 徹 教授 半田 哲郎 教授 中川 照真

論文内容の要旨

気管支平滑筋に存在する $\beta 2$ アドレナリンレセプターの作用機構の研究は喘息治療薬の作用を解明する上で重要である。 $\beta 2$ レセプターの細胞内第三ループ15残基に相当する合成ペプチド ($\beta III-2$:RRSSKFCLKEKKALK) は、生体膜の介在なしに G 蛋白質を直接活性化し、 $\beta III-2$ の N 末側10残基 (N10:RRSSKFCLKE) だけでも $\beta III-2$ と同様に G 蛋白質を活性化することが知られている。これに対し、C 末側10残基 (C10:FCLKEKKALK) には活性がない。また、 $\beta III-2$ は G 蛋白質の中で主として G_s を活性化し、喘息の原因となる G_i 蛋白質の活性は低い。一方、4 残基目のセリンがリン酸化されたペプチドは G_s より G_i を活性化することが知られており、喘息治療薬を長期連用するとフィードバックメカニズムによりリン酸化が起こり、活性が逆転することが喘息の治療を困難にしていると考えられている。本研究では、これらのペプチドの構造と活性との関係を調べる目的で、溶液中での $\beta III-2$ と関連ペプチドの立体構造研究を行った。

第一章 $\beta III-2$ の溶液内立体分子構造の解析

$\beta III-2$ の CD スペクトル解析を行ったところ、このペプチドは水溶液中ではランダム構造をとっているが、溶液に TFE を加えるにつれてヘリックス構造をとることが分かった。このヘリックス形成は TFE の濃度のみ依存し、pH や $\beta III-2$ の濃度の変化によってはほとんど影響を受けない。また、ポリグルタミン酸の添加によってもヘリックス構造が誘導されることが分かった。さらに詳細な構造を調べるため、このペプチドの二次元 NMR を測定し、得られた距離情報を元に溶液内分子立体構造を決定した。得られた構造の特徴として N 末側が比較的フレキシブルで C 末側がヘリックス様のコアを形成することが分かった。また、この C 末コア部の表面電荷を計算したところ、この部位で正電荷のクラスターを形成している事が分かった。G 蛋白質のレセプターと結合すると考えられている部位は負電荷を帯びており、これらの部位の間の静電的相互作用が G 蛋白質の活性化に重要であることが明らかとなった。

第二章 $\beta III-2$ 部分ペプチドの溶液内立体分子構造の解析

$\beta III-2$ 部分ペプチドである N 末側10残基 (N10:RRSSKFCLKE) と C 末側10残基 (C10:FCLKEKKALK) のそれぞれの二次元 NMR 測定を行い、得られた距離情報を元にこれらペプチドの溶液内立体分子構造を決定した。G 蛋白質に対する活性化能を持たない C10 の場合は自己及び隣接残基の NOE のみが観測され、C10 はランダムコイル構造をとっていた。一方、G 蛋白質活性化能を持つ N10 の場合にはヘリックスに特徴的な NOE が観測され、この NOE 距離データを元にコンピューター計算により構造を求めたところ、N10 は $\beta III-2$ の構造に近いヘリックス構造をとっていることが分かった。また、この分子の表面電荷を計算したところ、 $\beta III-2$ と同じく正電荷のクラスターを形成することが分かった。よって、このヘリックス形成はアミノ酸配列に特異的であり、ヘリックス構造を取ることによる正電荷クラスター形成が G 蛋白質の活性化に必要であると考えられる。

第三章 リン酸化された $\beta III-2$ の溶液内立体分子構造の解析

CD スペクトルの測定の結果、リン酸化された $\beta III-2$ ($\beta III-2-P$) はリン酸化されていない $\beta III-2$ に非常に近いスペク

トルを示した。そこで、より詳細な構造を比較検討するために β III-2-Pの二次元NMRを測定した。観測されたNOEはヘリックスに特徴的ではあるが、 β III-2のNOEとは異なっており、この距離情報を元に構造計算を行った結果得られた β III-2-Pの構造は、リン酸化されていない β III-2の構造とは鎖状立体構造において大きく異なっている事が分かった。よってリン酸化による電気的な相互作用の他にペプチドの構造の違いがこのペプチドの G_i と G_s に対する活性化の違いに大きく影響を与えていると考えられる。

以上、ヒト β 2アドレナリンレセプターG蛋白質活性化部位の溶液内立体分子構造について詳細な知見が得られた。これらの知見は、喘息疾患に対する新規治療薬開発に対する有用な情報を提供すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

気管支平滑筋に存在する β 2アドレナリンレセプターの作用機構の研究は喘息治療薬の作用を解明する上で重要である。 β 2レセプターの細胞内第三ループ15残基に相当するペプチド(β III-2:RRSKFCLKEKALK)は、生体膜の介在なしにG蛋白質を直接活性化することが知られており、 β III-2のC末側10残基には活性が無いが、N末側10残基(N10:RRSKFCLKE)にはそれだけでも β III-2と同様にG蛋白質を活性化することが知られている。また、 β III-2はG蛋白質の中で主として G_s 蛋白質を活性化し、喘息の原因となる G_i 蛋白質の活性は低い。一方、4残基目のセリンがリン酸化されたペプチドは G_s 蛋白質より G_i 蛋白質を活性化することが知られており、喘息治療薬を長期連用するとフィードバックメカニズムによりリン酸化が起これ、活性が逆転することが喘息の治療を困難にしていると考えられている。本論文は、これらのペプチドの構造と活性との関係を調べる目的で溶液中での β III-2とその関連ペプチドについての分子立体構造の研究を行ったものである。

β III-2のCDスペクトル解析の結果、このペプチドは水溶液中ではランダム構造をとっているが、溶液にTFEを加えるにつれてヘリックス構造をとり、このヘリックス形成はTFEの濃度のみ依存し、pHや β III-2の濃度の変化によってはほとんど影響を受けないことが解った。また、このヘリックス構造はポリグルタミン酸の添加によっても誘導されることが解った。さらに、このペプチドについて二次元NMR解析を行い、溶液内分子立体構造を決定したところ、得られた構造はN末側は比較的フレキシブルなのに対して、C末側ではヘリックス様のコアを形成しており、このC末コア部の表面部位で正電荷のクラスターを形成していることが明らかとなった。G蛋白質がレセプターと結合すると考えられている部位は負電荷を帯びており、この部位との静電的相互作用がG蛋白質の活性化に重要であることが明らかとなった。

さらに、 β III-2部分ペプチドであるN末側10残基(N10:RRSKFCLKE)とC末側10残基(C10:FCLKEKALK)のそれぞれについても二次元NMR解析を行い、これらペプチドの溶液内立体分子構造を決定したところ、G蛋白質に対し活性化能を持たないC10はランダムコイル構造をとっていたが、G蛋白質活性化能を持つN10ではヘリックスに特徴的なNOEが観測され、このNOE距離データを元にコンピューター計算により構造を求めた結果、N10は β III-2の構造に近いヘリックス構造をとっていることが解った。また、この分子の表面電荷を計算したところ、 β III-2と同じく正電荷のクラスターを形成していた。したがって、このヘリックス形成はアミノ酸配列に特異的であり、ヘリックス構造を取ることによる正電荷クラスターの形成がG蛋白質の活性化に必要なことが明らかになった。

次に、ペプチド鎖のリン酸化による効果を調べるため、リン酸化された β III-2のCDスペクトルを測定し、溶液内立体分子構造について検討した。測定の結果は、リン酸化された β III-2(β III-2-P)はリン酸化されていない β III-2に非常に近いスペクトルを示した。そこでより詳細な構造の比較検討を二次元NMR測定によりおこなったが、 β III-2-Pについて観測されたNOEはヘリックスに特徴的ではあるが、 β III-2のNOEとは異なっており、距離情報を元に構造計算をした結果、得られた β III-2-Pの構造は、リン酸化されていない β III-2の構造とは鎖状立体構造において大きく異なっていた。したがって、ペプチドのリン酸化はリン酸電荷による電気的な相互作用の違いの他にペプチドの構造の違いを引き起こし、これらの違いはこのペプチドの G_i と G_s に対する活性化の違いに大きく影響を与えるものと考えられる。以上のように、本研究は、ヒト β 2アドレナリンレセプターG蛋白質活性化部位の溶液内分子立体構造を明らかにし、喘息疾患治療薬等のレセプターとG蛋白質との相互作用機構に関わる詳細で明確な物理化学的重要知見を提示したものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値有るものと認める。

更に平成14年2月27日論文内容とそれに関する口頭試問を行った結果合格と認めた。