

(論文内容の要旨)

細胞膜上の受容体はリガンド刺激を受けると其のコンフォメーション変化を細胞内情報伝達蛋白質の G 蛋白質に伝達し、G 蛋白質では GDP-GTP 交換機能が活性化され、細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーである c-AMP 等の産生を誘導するエフェクター蛋白質を活性化する。G 蛋白質共役型細胞膜受容体の大多数は七回膜貫通型構造で、細胞内に 3 つのループ構造をもつ。一部の G 蛋白質共役型受容体はリガンドによる刺激を受け、G 蛋白質と共役する際、細胞内第 3 ループ intracellular third loop (IC3) 部位が直接 G 蛋白質を活性化することが予測されている。しかしながら、それらの受容体のいずれにおいても第 3 ループ部位に共通したアミノ酸一次配列はない。

本研究では七回膜貫通型 G 蛋白質共役受容体の IC3 部位に相当するペプチドを f-moc 法により化学合成し、*in vitro* において受容体 IC3 ペプチドが直接 G 蛋白質を活性化するかどうかを検討した。更に受容体 IC3 ペプチドの溶液中の立体構造を 2D-NMR によって解析し、受容体 IC3 ペプチドの立体構造と G 蛋白質活性化の相関を検討、細胞膜受容体による G 蛋白質活性化のメカニズムを立体構造の観点から解明しようと試みた。本研究で検討した七回膜貫通型 G 蛋白質共役受容体は炎症や痛みに関与するプロスタグランジン mEP3 α 受容体、寿命に関与するといわれるショウジョウバエの *methuselah* 遺伝子のヒトホモログである APG1 受容体、鎮静作用に関連するヒトの GABA_B 受容体の 3 種である。化学合成した受容体 IC3 ペプチドのアミノ酸配列はそれぞれ、EP3a: T I K A L V S R C R A K A A V、APG1: R N G K R S N R T L R E E、GABA_B: E T K S V S T E K I N D H R である。

GTP γ ³⁵S を用いた Binding Assay の結果、いずれの受容体 IC3 ペプチドにおいても *in vitro* での G 蛋白質の GDP-GTP 交換反応を確認し、各受容体 IC3 ペプチドの G 蛋白質活性化能を見出した。次に ¹H 2D-NMR を用いて SDS ミセル溶液中における各受容体 IC3 ペプチドの COSY、NOESY スペクトルを測定し、構造計算プログラム CNS を用いて DGSA 法により立体構造を決定した。いずれの受容体 IC3 ペプチドも 14~15 残基と短いペプチドである。にもかかわらず、堅牢なヘリックス構造をもっていた。またいずれの受容体もアミノ酸配列中に 20~30% といった多くの塩基性アミノ酸を含有しているため、ヘリカルな立体構造により塩基性アミノ酸の正電荷をもつ側鎖がペプチドの片側側面に集まり正電荷クラスターを形成していた。G 蛋白質の表面は負電荷を帯びているという X 線結晶解析の報告があり、今回発見した受容体 IC3 ペプチドの正電荷クラスターと G 蛋白質表面との間に静電気が働き、両者が強く相互作用して G 蛋白質の活性化が引き起こされるものと考えられる。また各受容体 IC3 ペプチドの G 蛋白質活性化能と立体構造を比較検討してみると、立体構造中に占めるヘリカルな立体構造部位の割合が大きい受容体 IC3 ペプチドほど、G 蛋白質活性化能が強いことが見出された。

受容体 IC3 部位の *in vitro* における G 蛋白質活性化と立体構造は確認したが、細胞内において受容体が G 蛋白質を活性化し続ける事は想像し難い。また、これまでに変異プロスタグランジン EP3 受容体を用いた構造—活性研究より、C 末端部位が G 蛋白質

活性化に重要であることが明らかとなっている。本研究の結果から、C末端部位等の細胞内の他の受容体部位が普段 IC3 部位によるG蛋白質の活性化を立体的に阻害しており、受容体がリガンド刺激を受けると立体構造が変化し、IC3 部位が細胞内領域に露呈してG蛋白質を活性化するというメカニズムが想定できる。

G蛋白質共役受容体は疾病発症、治療に関連する分子である事から、本研究で明らかにした受容体 IC3 ペプチドを構造機能モデルとして更なる分子設計を重ねることで医薬品開発に大いに役立つと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、G 蛋白質共役型七回膜貫通型受容体(GPCR)に属するプロスタグランジン EP3 α 受容体、APG1 受容体、GABA_B 受容体の細胞内第3ループ(IC3)部位に相当する合成ペプチドのG 蛋白質活性化機能およびSDS溶液中における立体構造を検討したものである。細胞膜上の受容体はリガンド刺激を受けるとG 蛋白質に作用し、G 蛋白質のGDP-GTP 交換機能が活性化される。G 蛋白質は細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーである c-AMP 等の産生を誘導するエフェクター蛋白質を活性化する。GPCR の大多数は七回膜貫通型構造で、細胞内に3つのループ構造をもつ。一部のGPCR はリガンドによる刺激を受け、G 蛋白質と共役する際、IC3 部位が直接 G 蛋白質を活性化することが予測されている。しかしながら、それらの受容体のいずれにおいても第3ループ部位に共通したアミノ酸一次配列はない。

本論文においてGTP γ ³⁵Sを用いたBinding Assayの結果、いずれの受容体IC3ペプチドにおいても*in vitro*でのG 蛋白質のGDP-GTP 交換反応を確認し、各受容体IC3ペプチドのG 蛋白質活性化能が見出された。

次に¹H 2D-NMRを用いてSDSミセル溶液中における各受容体IC3ペプチドの立体構造が決定された。2007年にアドレナリン β_2 受容体の立体構造が解かれたが、C末ループは削除され、活性化に重要なIC3部位はリゾチームに置換されたり、中央部分の構造が決定されておらず、受容体分子全体像の結晶構造が完全に解かれたとはいえない。またアドレナリン受容体全体像の中で解かれたIC3部位のC末端の一部の構造とC末端側のIC3ペプチド β III-2の立体構造を比較すると、両者とも同じヘリカル構造を有しており、ペプチドと実際の構造とでそれほど乖離するものではない。したがって受容体ペプチドの立体構造解析は受容体構造機能解明において非常に意義のあるものと考えられる。

いずれの受容体IC3ペプチドも14~15残基と短いペプチドである。にもかかわらず、堅牢なヘリックス構造をもっていた。またいずれの受容体もアミノ酸配列中に20~30%といった多くの塩基性アミノ酸を含有しているため、ヘリカルな立体構造により塩基性アミノ酸の正電荷をもつ側鎖がペプチドの片側側面に集まり正電荷クラスターを形成していた。GPCRと同等のG 蛋白質活性をもつMastoparan-XのSDS溶液中における立体構造も同様のヘリックス構造と正電荷クラスターを形成しており、またG 蛋白質を含んだ溶液中においても同様の立体構造を保持しているため、これらの立体構造上の特性がG 蛋白質の活性化に非常に関係しているものと考えられる。G 蛋白質の表面は負電荷を帯びているというX線結晶解析の報告があり、今回発見した受容体IC3ペプチドの正電荷クラスターとG 蛋白質表面との間に静電気力が働き、両者が強く相互作用してG 蛋白質の活性化が引き起こされるものと考えられる。

受容体IC3部位の*in vitro*におけるG 蛋白質活性化と立体構造は確認された

が、細胞内において受容体が G 蛋白質を活性化し続ける事は想像し難い。また、これまでに変異プロスタグランジン EP3 β 受容体を用いた構造活性研究より、C 末端部位が G 蛋白質活性化に重要であることが明らかとなっている。本論文の結果から、C 末端部位等の細胞内の他の受容体部位が普段 IC3 部位による G 蛋白質の活性化を立体的に阻害しており、受容体がりガンド刺激を受けると立体構造が変化し、IC3 部位が細胞内領域に露呈して G 蛋白質を活性化するというメカニズムが想定できる。

以上が本論文の内容であった。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 20 年 5 月 1 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。