

## 論文内容の要旨

論文題目                    ムスカリン受容体に結合したリガンドの構造

氏名                         古川 浩康

アセチルコリンは神経伝達物質として同定された最初の物質であり、中枢神経、および末梢神経で二種類のアセチルコリン受容体（ニコチン性とムスカリン性）に作用し、生理活性を引き起こす。

受容体に結合していないアセチルコリンの構造は X 線結晶構造解析により 1966 年に Pauling らにより解明された。その構造は N-C $\alpha$ -C $\beta$ -O の二面角が約 60° をとる *gauche* 型であった。ニコチン性アセチルコリン受容体に結合したアセチルコリンは *trans* 型の立体配座をとっていることが、Transferred Nuclear Overhauser Effect (TRNOE) 測定とエネルギー計算から予測された。またムスカリン作用を引き起こすアセチルコリンの構造は、回腸の筋収縮などを指標にした立体配座を固定したアセチルコリンのアナログ化合物の作用実験から *trans* であることが予測されている。ところが、G タンパク質共役受容体であるムスカリン性アセチルコリン受容体に結合したアセチルコリンの構造を直接的に証明した例が無い。そこで、我々は、TRNOE 測定によりムスカリン受容体と結合したアセチルコリンのアナログ化合物である(S)-メタコリンと(+)-ムスカリンの立体構造を決定した。

TRNOE 法は巨大なタンパク質 (MW  $\gg$  1,000 Da) に結合した小さなリガンド (MW  $\ll$  1,000 Da) の構造解析に広く用いられており、定量的な立体構造解析には速い解離速度を必要

とする。アセチルコリンは、受容体との結合親和性がそれほど高くなく ( $K_d = 10^{-5} \sim 10^{-4}$  M)、TRNOE の測定に適した解離速度を持つが、その 2 組のメチレン基のそれぞれ 2 個のプロトンの NMR シグナルが分離せず、NMR を用いたコンフォメーション解析には適さない。一方、アセチルコリンのメチル化体である、(S)-メタコリンは、アセチルコリンと同等の解離速度及び G タンパク質活性化能を保持し、それぞれのプロトンが独立した NMR シグナルを与えるため、NMR / TRNOE を用いた立体配座解析に適している。そこで、我々は、まず、受容体と結合した(S)-メタコリンの立体構造、特に  $C\alpha$ - $C\beta$  間の内部回転角を TRNOE を用いて解析することにした。

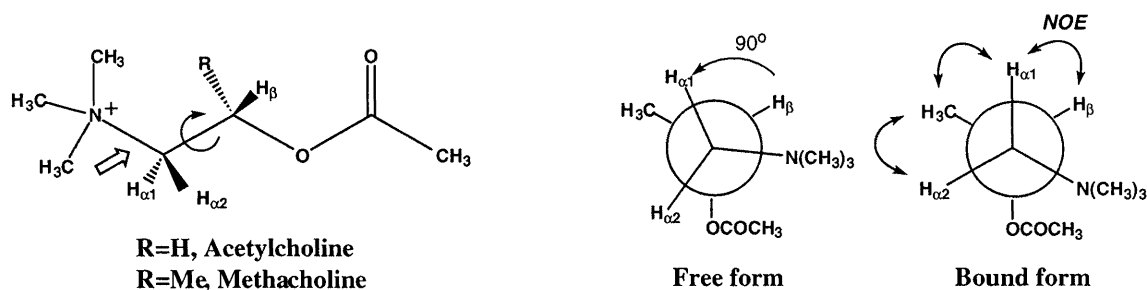
TRNOE 測定に用いたムスカリン受容体  $M_2$  サブタイプには、1) N 末端の糖鎖付加部位の除去、2) 加水分解を受け易い第 3 細胞内ループ中央部の除去、3) C 末端へのヒスチジンタグ(hexahistidine tag)の付加、の 3 点につき変異を加えた。ムスカリン受容体は生体内の組織・器官に微量にしか発現していないので、我々は、Sf9/baculovirus の系を用いて受容体の大量発現を行った。ウイルスの感染多重度、感染時間、培地中の糖、溶存酸素の濃度を調節することにより、定常的にリットルあたり 1 mg のムスカリン受容体を得る事ができた。精製は ABT-agarose affinity column、ヒドロキシルアパタイト、ゲル濾過カラムを用いて行った。最終的に 50  $\mu$ M のムスカリン受容体、その 30 倍濃度である 1.5 mM の(S)-メタコリン、そして 1.5 mg/ml のアゾレクチンを含んだ溶液を調製した。

NMR 試料溶液の NOESY (TRNOE) スペクトルの測定は、Bruker 社の ARX600 MHz NMR 装置で行った。NOESY スペクトル上にある TRNOE クロスピークは、空間的に近い距離 ( $< 5$  Å) にある  $^1\text{H}$  (プロトン) 同士を見い出している。また、それぞれの TRNOE シグナルの強度は、対応するプロトン間の距離の 6 乗分の 1 と比例関係にあることから、TRNOE を検出することで、その立体構造を求めることができる。そこで、まず、上記で調製した試料溶液で TRNOE を測定した。

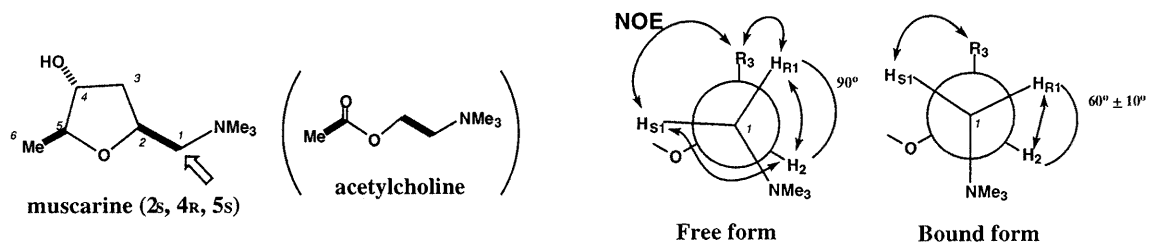
スペクトル上には、受容体 (タンパク質) の broad な負の NOE とともに、受容体結合時の (S)-メタコリンの TRNOE (強い負の NOE) が観測された。次に、同じ試料溶液に親和性がより強い atropine (antagonist) を追加すると、(S)-メタコリンの TRNOE クロスピークは、受容体への競合的阻害によりほとんど消失した。これは、TRNOE ピークが受容体のリガンド結合部位に結合した(S)-メタコリンの立体構造を反映していることを示している。従って、両者の差スペクトルが結合状態の立体構造を定量的に反映する真の TRNOE クロスピークを与えることになる。そこで、その差スペクトルから TRNOE クロスピークを抽出し、それらの相対的な NOE 強度を比較することで、(S)-メタコリンの立体構造を検討した。得られた NOE 強度にはいくつか矛盾するものがあった。つまり、 $H\beta / H\alpha_2$  間の NOE 強度は、 $H\beta / H\alpha_1$  間の NOE 強度とほぼ同等であり、かつ、 $\beta\text{Me} / H\alpha_2$  間の NOE 強度と  $\beta\text{Me} / H\alpha_1$  間の NOE 強度も

ほぼ同等であった。そのような立体配座は存在していないことから、spin diffusion 由来の間接的 NOE がスペクトルに影響を与えていることが示唆された。そこで、その spin diffusion 由来の間接的 NOE を除去する目的で、NOE の混合時間 (mixing time) をより短くして TRNOE の測定を行った。また、trROESY スペクトル上で、間接的な trROE は正 (対角ピークと同じ方向) となることから、試料溶液の trROESY スペクトルを測定し、間接的 trROE の検出を行った。

混合時間を 150 ミリ秒から 50 ミリ秒に短くして TRNOE を測定することで、 $H\beta / H\alpha_2$  間の NOE 強度は、 $H\beta / H\alpha_1$  間の NOE 強度よりかなり小さくなった。また、trROESY スペクトルを測定すると、 $H\beta / H\alpha_2$  間の trROE は対角ピークと同じ方向に出ることから、この NOE は spin diffusion 由来の間接的 NOE であることがわかった。更に詳細な TRNOE スペクトル (mixing time = 50 ms) の解析から、 $H\beta / H\alpha_2$  間の NOE 強度が  $H\beta / H\alpha_1$  間の NOE 強度に比べ弱いこと、 $\beta\text{Me} / H\alpha_2$  間の NOE 強度と  $\beta\text{Me} / H\alpha_1$  間の NOE 強度がほぼ同等であることが分かり、ムスカリン受容体結合時の (S)-メタコリンの立体配座は、二面角  $N-C\alpha-C\beta-O$  が約  $60^\circ$  の *gauche* 型であると決定した。この立体配座は、溶液中の (S)-メタコリンの立体配座 (二面角  $N-C\alpha-C\beta-O$  が  $90^\circ$ ) が約  $30^\circ$  回転したものであった。



次に、ムスカリン受容体に結合した (S)-メタコリンの立体構造を確認するため、(+)-ムスカリン (2S, 3R, 5S) の受容体結合時の立体配座解析を行った。ムスカリンは、受容体との親和性および解離定数がアセチルコリンや (S)-メタコリンと同程度である。また、化学構造はアセチルコリンとよく似ているが、より rigid であることから、得られる TRNOE の情報は多い。そこで、(S)-メタコリンと同様の測定を行い、ムスカリンの水溶液中および受容体結合時の立体構造を求めた。溶液中のムスカリンの立体配座は、二面角  $N-C\alpha-C\beta-O$  が約  $90^\circ$  の *gauche* 型に近い配座であるという結果を得た。また、ムスカリン受容体結合時は、二面角  $N-C\alpha-C\beta-O$  が約  $60^\circ \pm 10^\circ$  の *gauche* 型であることが予想され、(S)-メタコリンの時と同様、溶液中の (+)-ムスカリン (2S, 3R, 5S) の立体配座 (二面角  $N-C\alpha-C\beta-O$  が  $90^\circ$ ) が約  $30^\circ$  回転したものであった。



以上の結果から、(S)-メタコリンと(+)-ムスカリン (2<sub>S</sub>, 3<sub>R</sub>, 5<sub>S</sub>)の二面角 N-C $\alpha$ -C $\beta$ -O は、受容体に結合することにより、溶液中の 90° から約 60° に移行することがわかった。結合型のリガンドの立体配座はムスカリン作用を引き起こすと予測されている *trans* 型のものとは異なる事がわかった。