

# 論文審査の結果の要旨

氏名 古川浩康

本論文は 7 回膜貫通型 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（ムスカリン受容体）に結合したムスカリンリガンドの NMR 構造を NMR を用いて調べたものである。

アセチルコリン ( $\text{CH}_3\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) は神経伝達物質として同定された最初の物質である。アセチルコリンの結晶構造は 1960 年代 X 線構造解析により決定され、N-C-C-O の二面角が *gauche* 型をとる事がわかっている。一方、この C-C 結合の分子内回転を抑制したアセチルコリンアナログを用いた実験から、ムスカリン受容体に作用するリガンドは *trans* 型の構造を持つことが推測された。これから、ムスカリン受容体に結合したアセチルコリンは *trans* 型を取るものと考えられてきたが、その直接的証拠はなかった。本論文では、TRNOE (Transferred Nuclear Overhauser Effect)法を用いて、ムスカリン受容体  $M_2$  サブタイプに結合したムスカリン性リガンド、メタコリンとムスカリンの構造を決定したものである。

アセチルコリンは NMR スペクトル上で 4 つのメチレンプロトンのシグナルが分離せず、NMR 情報のみから構造を決定する事ができない。そこで、NMR スペクトル上でシグナルが分離するメタコリン ( $\beta$ メチルアセチルコリン) とムスカリンが選ばれた。また、TRNOE の測定には受容体との結合親和性があり高い必要がある ( $K_d = 10^{-5}\sim 10^{-4}$ )。メタコリンとムスカリンについて、受容体への結合活性を調べ、解離定数が TRNOE の測定可能範囲に納まっている事が確認された。また、受容体本来の活性である G タンパク質の活性化をアセチルコリンと同等に誘導する事も確認された。

TRNOE の測定を行うには 50  $\mu\text{M}$  程度の濃度の受容体が必要である。ムスカリン受容体のような膜タンパク質は一般に大量発現が困難である。種々の発現系を検討した結果、昆虫培養細胞 Sf9 と baculovirus を用いた系を改良する事により、1 リットルの培養液中に約 1 mg のムスカリン受容体を定常的に発現させることが可能になった。ムスカリン受容体を発現する膜画分を単離し、ジギトニンにより可溶化し、ABT(Aminobenzotropine) を用いた ligand affinity column

で受容体を精製した。さらに、NMR 上におけるジギトニン由来の非特異的シグナルの消去のため、コール酸ナトリウムによるジギトニンの置換を行った。

上記の様に精製したムスカリン受容体に 30 倍量（モル比）のリガンドを混合して測定を行い、TRNOE のシグナルを二次元スペクトル上で得た。また、ROESY (Rotating-frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)の測定を行い、間接的 NOE の寄与を調べた。それらの結果から、ムスカリン受容体に結合したメタコリンの構造は N-C-C-O の二面角が  $60^\circ$  の *gauche* 型である事がわかった。また、ムスカリン受容体に結合したムスカリンの構造もメタコリンと同様の測定を行う事により、*gauche* である事がわかった。これは、*trans* という当初の予想とはまったく異なる結果であった。

2つの点が考察された。1つは、回転が制限された化合物の2つの異性体は、アセチルコリン、メタコリン、ムスカリンなど回転自由度を持つ化合物の *trans* 型と *gauche* 型に必ずしも対応しない可能性である。他の1つは、受容体に結合したムスカリン性リガンドは *gauche* 型と *trans* 型両方の構造を取る可能性である。Gタンパク質と再構成したムスカリン受容体はアゴニストに対し高親和性と低親和性を示す。GTP または GDP 存在時には低親和性で、グアニンヌクレオチド不在下では高親和性である。Gタンパク質の結合しない受容体が低親和性、グアニンヌクレオチドフリーのGタンパク質と受容体の複合体が高親和性と考えられる。

今回の *gauche* 型という結果は、Gタンパク質フリーの受容体と結合したリガンドの構造である。Gタンパク質・受容体複合体に結合したリガンドは *trans* 型を取るという可能性が考えられる。グアニンヌクレオチドフリーGタンパク質とアゴニスト結合受容体の複合体は、受容体がGタンパク質に作用する際の遷移状態と考えられる。リガンドが *gauche* から *trans* に構造変化すると同時に受容体の構造変化が起こるという仮説が考えられる。

以上本論文は、ムスカリン受容体とリガンドの相互作用について、リガンドの構造という観点から新しい知見を提供すると共に、検証可能な新たな作業仮説を提案している。また、本申請は、論文提出者が主体となって実験及び解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分なものと判断される。よって、博士（理学）の学位に値するものと認められる。