

論文の内容の要旨

論文題目 β アドレナリン受容体における選択的アゴニストの結合部位の解析と
変異型受容体の生化学的特徴の検討

氏 名 磯ヶ谷 昌文

β アドレナリン受容体 (β 受容体) サブタイプは, Landら (1967) により β 受容体アゴニストの効力順により β_1 と β_2 の2種類のサブタイプに分類された。それ以来, それぞれのサブタイプに選択的なアゴニスト, アンタゴニストが開発され, β 受容体には, β_1 と β_2 の2つのサブタイプが存在することが確立された。近年, 分子生物学的手法により β 受容体は β_1 , β_2 のほか β_3 のサブタイプも存在することが示され, いずれもGタンパク質に共役する7回膜貫通型受容体であることが明らかにされている。

本研究の目的は, β アドレナリン受容体アゴニストを用いて, アゴニストと受容体の相互作用を分子薬理学的手法を用いて明らかにすることである。まず, β_1 と β_2 受容体に選択的なアゴニストを用いて, アゴニストの結合に関与する受容体部位を明らかにした。これまで, β 受容体における化合物と受容体との相互作用については, 受容体選択性のない化合物である isoproterenolを用いて解析が進められ, 結合部位は, 細胞膜貫通領域内に存在することが示された。しかしながら, β_1 と β_2 選択性に関わる受容体部位については何ら解析されてこなかった。そこで, キメラ受容体および変異型受容体を作製し, 選択的なアゴニストを用い, 選択性に関わる受容体部位を決定した。次に, 肥満と関連する多型が存在することが報告されて

いる β_3 受容体の多型が持つ意味を明らかにするため、アゴニストの作用を中心に検討した。

まず、 β_2 受容体アゴニストの選択性に寄与する結合部位について、キメラおよび変異型受容体を作製し、解析した。Isoproterenolによる解析の結果から、受容体選択性に関わる領域を細胞膜貫通（トランスメンブラン：TM）領域の第1，第2および第7番目であると想定し、 β_2 受容体の第1，第2および第7番目のTM領域を各々 β_1 受容体の相当する領域に置換したキメラと β_1 受容体の第1，第2および第7番目の各TM領域を各々 β_2 受容体の相当する領域に置換したキメラを作製し、各アゴニストに対する親和性を検討した。 β_2 受容体選択的なアゴニストとして、salbutamol, formoterol, procaterolおよびsalmeterolを用いた。Salbutamolは、他の3つのアゴニストと比べて β_2 受容体選択性の低い化合物である。この化合物においては、第2番目および7番目のTM領域の両方を換えることで、親和性の減少および増加が起こることから、salbutamolの場合は、第2番目と7番目のTM領域が主に受容体選択性に関与する領域であることが示された。Formoterolとprocaterolは β_2 受容体に高親和性の化合物である。これらのアゴニストはsalbutamolの場合と同じように、第2番目と7番目のTM領域の両方を換えることで親和性の減少および回復がみとめられた。このことから、formoterolとprocaterolの高親和性の結合に第2番目と7番目のTM領域が関与していることが示された。Salmeterolは β_2 受容体に対して非常に高い選択性を示す化合物である。Salmeterolの親和性は、第7番目のTM領域を β_1 受容体のTM領域に換えることで著しく減少し、また β_1 受容体の第7番目のTM領域に β_2 受容体の相当する領域を挿入することにより親和性の上昇が見られた。このことから、salmeterolのサブタイプ選択的な結合は第7番目のTM領域であることが示された。以上の結果から、 β_2 受容体に選択的なアゴニストの結合に関与する受容体側の領域は、第2番目と7番目のTM領域であることが示された。特にsalmeterolの場合には、第7番目のTM領域が選択性に強く関与していることが示された。

前述のように、 β_2 受容体アゴニストの高親和性結合に第2番目と7番目のTM領域が関与することが示されたので、さらにこれらのTM領域中のどのアミノ酸が選択性発現に必要なかを調べるため、 β_1 および β_2 受容体の間で異なるアミノ酸を1つずつアラニンに置き換えた変異型 β_2 受容体を作製してアゴニストの親和性を検討した。第7番目のTM領域では β_2 と β_1 とで異なる10個のアミノ酸をアラニンに置き換えた変異体を作製した。この変異体を用いてformoterolとprocaterolの親和性を検討した結果、Tyr³⁰⁸をアラニンに換えた変異体で著しく親和性が低下した。Salmeterolの場合も同様に、Tyr³⁰⁸をアラニンに換えた変異体で著しく親和性が低下した。第2番目のTM領域では β_2 と β_1 受容体で異なる8個のアラニン置換変異体を作製した。8個の変異体の中でH93A β_2 受容体のみがprocaterolに対し有意な親和性の低下を示したが、formoterolにおいては有意な親和性の低下は認められなかった。第2番目のTM領域においては全体として選択的結合に関与している可能性が考えられた。以上の結果か

ら、 β_2 受容体に選択的なアゴニストの結合には、第7番目のTM領域にあるTyr³⁰⁸が重要な役割を果たしていることを明らかにした。キメラ受容体を用いた実験から、第2番目のTM領域がアゴニストの選択性に関与している可能性が示唆されたが、特定のアミノ酸を同定することはできなかった。

次に、前述にて作成した β_1 および β_2 キメラ受容体を用いて、 β_1 選択的アゴニストの受容体選択性を決める結合部位について解析した。 β_1 選択的アゴニストとして T-0509, denopamine, xamoterolを用いた。その結果、 β_1 受容体の第2番目のTM領域を β_2 受容体の相当する領域に換えたキメラにおいてこれらの β_1 アゴニストの親和性は低下した。 β_2 受容体の第2番目のTM領域に β_1 受容体の相当する領域を挿入したキメラにおいてはアゴニストに対する親和性は野生型 β_1 受容体に対するのとほぼ同じ値にまで増加した。以上の結果から、 β_1 受容体選択的アゴニストの選択性に関与する部位は、TM2領域に存在することが示された。 β_1 受容体アゴニストの親和性結合に第2番目のTM領域が関与することが示されたので、 β_1 および β_2 受容体の間で異なるアミノ酸を1つずつ8箇所アラニンに換えた β_1 受容体変異体を作製してアゴニストの親和性を検討した。その結果、T-0509とdenopamineの親和性は Leu¹¹⁰, Thr¹¹⁷を各々アラニンに置換した変異体において有意に減少した。これらの結果から、 β_1 受容体選択性は、第2番目のTM領域にあるLeu¹¹⁰, Thr¹¹⁷が寄与していることが明らかとなった。

β_3 受容体には、肥満、糖尿病に関係すると考えられている多型 (Trp64Arg) が受容体に存在することが知られている。しかしながら、何故そのような多型が存在するかについては未だ不明な点が多い。そこで、多型に相当する変異を導入した変異型受容体に対するアゴニストの作用を結合親和性およびアデニル酸シクラーゼ活性化の観点から検討し、多型の生理的意味の解明を試みた。変異型受容体は野生型受容体をもとにPCRにより作成し、COS-7細胞あるいはJEG-3細胞にトランスフェクトした。リガンドの結合実験の結果、アゴニストの変異型受容体に対する結合親和性が、野生型受容体に対するより低い場合があったが、わずかな差であった。このことから、アゴニストの結合親和性は変異型受容体と野生型受容体でほぼ同等であることが示された。次に、アゴニスト刺激による変異型受容体のGタンパク質活性化について調べた。Gi, Goタンパク質については、受容体と共発現させ、百日咳毒素処置下で検討した。その結果、変異型受容体のアゴニスト刺激によるcAMP産生量は、野生型受容体を刺激した場合と違いはみられなかった。このことから、Gタンパク質の活性化能についても差がないことが示された。変異型受容体をいくつかのアデニル酸シクラーゼ(AC)と共発現させ、cAMP産生量を検討した。その結果、変異型受容体をACIII型と共発現させると、アゴニスト刺激により蓄積されるcAMP量が野生型に比べて増加することが示された。このことから、ACIII型が誘導されるような条件において、変異型受容体では、アゴニスト刺激による作用が増強される可能性

が示された。

以上のように、 β 受容体のアゴニストの結合部位の解析において、 β_2 受容体アゴニストの受容体選択的な結合は、第7番目のTM領域にあるTyr³⁰⁸が寄与することを明らかにした。

β_1 受容体アゴニストの受容体選択的結合は、第2番目のTM領域にあるLeu¹¹⁰、Thr¹¹⁷が寄与することを明らかにした。本研究の内容は、 β アドレナリン受容体アゴニストのサブタイプ選択性に関する受容体構造の研究に関して、1つの解答を提示するとともに、今後の研究に関して重要な情報を提供した。一方、 β_3 受容体の変異型受容体においては、アデニル酸シクラーゼ(AC)のうち、ACIII型との共発現により、アゴニスト刺激による作用が野生型と異なることを初めて見いだすことができた。

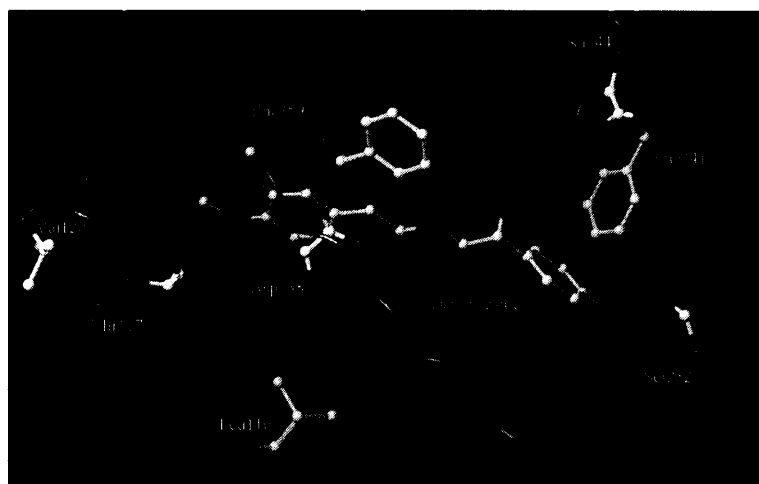
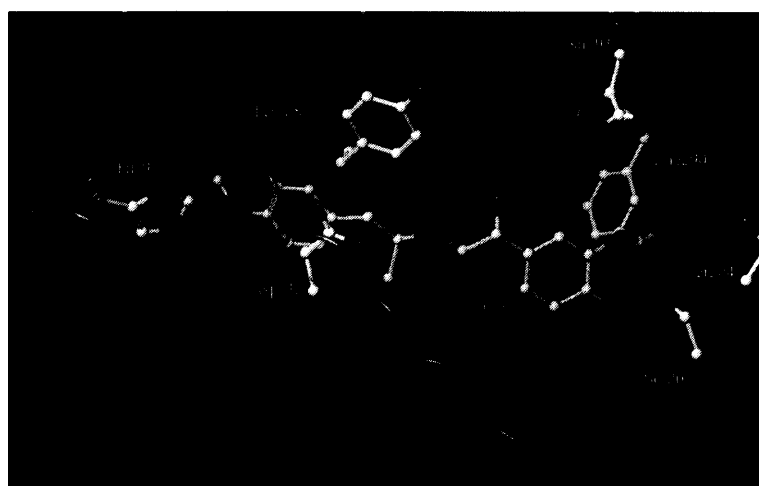


図. 本実験より推測される β アドレナリンアゴニストと β 受容体との結合様式

上段は、 β_2 アゴニストのformoterolと β_2 受容体、下段は、 β_1 アゴニストのdenopamineと β_1 受容体との結合様式を示している。