

論文の内容の要旨

論文題目 G蛋白質 α サブユニットによるシグナル伝達制御機構の構造基盤の解明

氏名 間瀬 瑤子

【背景】

3量体G蛋白質は、G蛋白質共役型受容体(GPCR)に共役し、GPCRへの刺激を細胞内へと伝達する。このG蛋白質シグナリングは、細胞分化等に関与する重要なシグナル伝達経路である。

3量体G蛋白質は、 α サブユニット($G\alpha$)および $\beta\gamma$ サブユニット($G\beta\gamma$)から構成され、グアニンヌクレオチドは $G\alpha$ に結合している。GDP結合状態にて $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ は会合し、 $G\alpha\beta\gamma$ 3量体を形成しているが、GPCRへのリガンド刺激に伴い $G\alpha$ にてGDPをGTPへと交換する(GDP/GTP交換)と、GTP結合状態の $G\alpha$ は $G\beta\gamma$ を解離し、それぞれエフェクターに結合して活性を制御する。(A)

$G\alpha$ は、350-450残基からなる、分子量39-52Kの蛋白質であり、i/o, s, q/11, 12/13のファミリーに分類される。GTPaseドメインとヘリカルドメインから構成され、グアニンヌクレオチドは両ドメイン間に存在し、 $G\alpha$ の残基と水素結合等の相互作用を形成している(Fig. 1)。

$G\alpha$ のGDP/GTP交換反応はGPCR存在下にて促進されるが、 $G\alpha$ 単独でも反応が進行する。GDP解離時には $G\alpha$ -GDP間の相互作用を減弱する $G\alpha$ の構造変化を伴うことが想定できることから、 $G\alpha$ 単独でのGDP/GTP交換反応の存在は、

GDP結合状態の $G\alpha$ が、結晶構造に示される安定構造の他に、GDPを解離可能な準安定構造を形成し、その

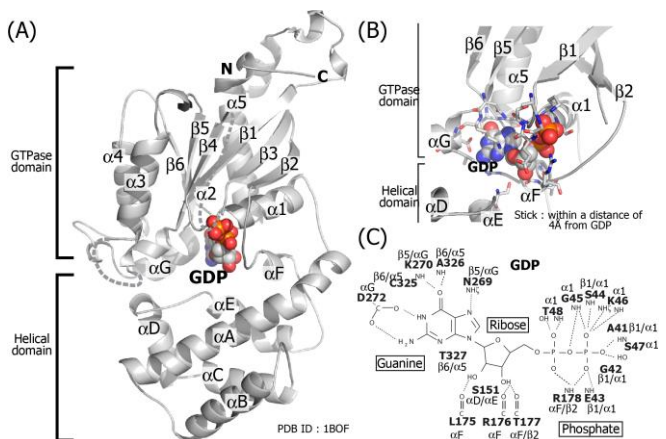


Fig. 1 $G\alpha$ の立体構造
(A) GDP結合状態の $G\alpha$ の立体構造(PDB ID: 1BOF) (B) GDP結合領域の拡大図。GDPと4Å以内の残基をスティック表示した。(C) (B)にてスティック表示した残基とGDPとの位置関係。水素結合を点線にて示した。

構造間の平衡にあることを示唆している。また GDP/GTP 交換速度が増大した変異体が報告されており、その一つに $G\alpha_i$ の T325A 変異体がある。同じ i/o ファミリー ($G\alpha_{i/o}$) の $G\alpha_{i1}$ にて対応する T329A 変異体の結晶構造が解析されているが、野生型との顕著な構造の違いは観測されなかった。T329A の野生型との静的な結晶構造の違いが僅かであったことは、動的な構造平衡が変異によりシフトしていることを強く示唆している。このように GDP/GTP 交換における $G\alpha$ の動的性質の重要性が示唆されているが、その役割は不明である。

また一方で、GTP 結合状態の $G\alpha$ は $G\beta\gamma$ を解離し、各々下流のエフェクターに結合して活性を制御する。G 蛋白質共役型内向き整流性 K^+ チャネル(GIRK)は、GPCR へのリガンド刺激に伴い $G\alpha_{i/o}$ から解離した $G\beta\gamma$ の結合により開口し、リガンド刺激終了に伴い $G\alpha_{i/o}$ が $G\beta\gamma$ を回収することにより閉口する、 $G\beta\gamma$ のエフェクターである。一方で GIRK の閉口は $G\alpha_{i/o}$ 存在下にて促進されることから、 $G\alpha_{i/o}$ も GIRK と直接相互作用することが想定されているが、その相互作用様式は明らかでない。

そこで本研究は、G 蛋白質シグナリングにおける $G\alpha$ の役割の構造基盤を解明するため、(1) GDP/GTP 交換反応における $G\alpha$ の動的構造平衡の役割、(2) $G\alpha_{i/o}$ による GIRK 制御の構造機構、を明らかとすることを目的とした。

【結果】

(1) GDP/GTP 交換反応における $G\alpha$ の動的構造平衡の役割の解明

本研究は、GDP 結合状態の $G\alpha$ を解析対象とし、NMR 法により野生型および T329A の動的構造平衡を解析した。

1. GDP/GTP 交換活性確認および NMR シグナルの帰属の確立

$G\alpha$ は、ヒト由来 $G\alpha_{i3}$ (以下 $G\alpha$)を、大腸菌発現系により調製した。調製した $G\alpha$ の GDP/GTP 交換活性を調べた。GDP/GTP 交換に伴う蛍光強度増大を指標としたアッセイにより、野生型について 30°C にて $5.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の速度定数を得た。この値は、先行研究 ($4.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) とほぼ同等であったことから、調製した $G\alpha$ が正しい GDP/GTP 交換活性を有していることを確認した。T329A は 25°C にて $9.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の値を得た。これを野生型の温度依存性のアレニウスプロットから算出した速度定数と比較することにより、T329A は野生型の約 40 倍に GDP/GTP 交換速度が増大していることが分かった。

次に NMR シグナルの帰属を行った。[$U\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N] $G\alpha$ を用いた三重共鳴測定に基づく主鎖連鎖帰属により、帰属可能な 353 残基中、311 残基の主鎖アミドシグナルの帰属を確立した。また、Ile 側鎖メチルシグナルも観測した。{[$U\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , Ile δ 1-[$^{13}\text{CH}_3$], LeuVal-[$^{13}\text{CH}_3$, $^{12}\text{CD}_3$]} $G\alpha$ を調製し、変異体解析により、Ile 26 残基中、16 残基の帰属を得た。

2. $G\alpha$ における構造平衡の存在の提示と構造平衡が存在する残基の同定

$G\alpha$ の構造平衡の存在を、NMR シグナルの磁場依存性から調べた。ある残基が、化学シフト値が異なる 2 つの構造間を化学交換しているとき、その NMR シグナルは高磁場にて強度が減少する。磁場強度 18.8 T および 11.7 T にて、野生型 $G\alpha$ の NMR スペクトルを測定し、各測定磁場でのシグナル強度 $I_{18.8\text{T}}$ および $I_{11.7\text{T}}$ の比 $R (I_{18.8\text{T}}/I_{11.7\text{T}})$ を算出した。その結果、残基ごとに強度比

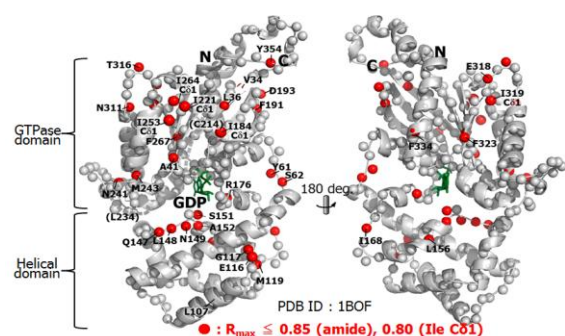


Fig. 2 野生型における構造平衡
野生型において顕著な磁場依存性を示した残基をマッピングした。

が異なっていた。高磁場にて顕著な強度減少を示した残基を Fig. 2 に示す。これらの残基に構造平衡が存在することが明らかとなった。

3. T329A にて野生型と異なる磁場依存性を有する領域の同定

GDP/GTP 交換活性が増大した T329A の磁場依存性を野生型と比較した。

NMR スペクトルの磁場依存性の解析を行ったところ、T329A において野生型よりも磁場依存性が亢進していた。T329A において顕著に磁場依存性が大きい残基を Fig. 3A に示す。これらの残基が集中していた領域は、GTPase ドメインの $\alpha 1$, β シート領域、ドメイン境界面であった(Fig. 3B)。

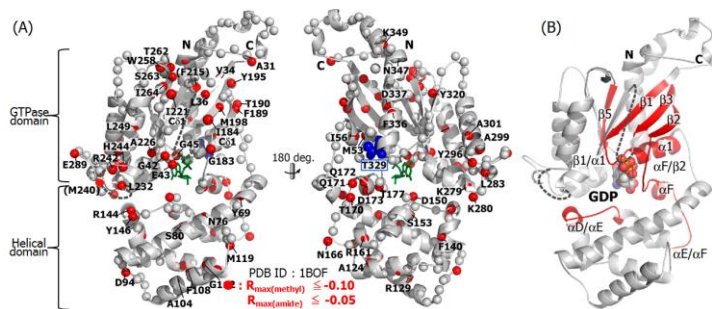


Fig. 3 T329A における磁場依存性の亢進
(A) T329A 変異体において野生型より顕著な磁場依存性を示した残基をマッピングした。T329 を青の球にて示している。(B) 各二次構造セグメントにおいて解析対象とした残基の4割以上が検出された領域を赤にて色づけた。

【考察】

GDP 結合状態の $G\alpha$ には異なる構造間の構造平衡が存在することが示された。GDP/GTP 交換速度が増大した T329A にて磁場依存性が亢進していた領域の構造平衡は、GDP/GTP 交換活性に重要である可能性が高い。

これらの領域のうち、 $\beta 1/\alpha 1$, $\alpha D/\alpha E$, αF , $\alpha F/\beta 2$ は GDP と直接相互作用しており、 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ は、各々から繋がるループにて GDP と直接相互作用している(Fig. 4)。GDP 結合領域および

GDP 結合領域へ繋がる β スtrandが連動して異なる構造と交換していることが、GDP の解離時の構造変化を容易にし、GDP 解離を促進するうえで重要であることが示唆された。また $\beta 1-3$ スtrandは、結晶構造解析より示された GPCR 結合部位と GDP 結合部位をつなぐ領域である。 β スtrandの構造平衡は、GPCR 結合時に β シートおよび連動した GDP 結合領域の構造変化を容易にし、GPCR 存在下の GDP/GTP 交換に寄与している可能性がある。

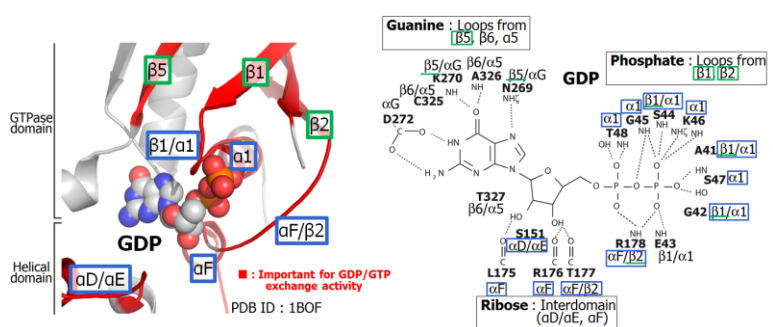


Fig. 4 構造平衡の GDP の解離への寄与
(A) $G\alpha$ の立体構造中の GDP 結合領域を拡大し、GDP/GTP 交換に重要な構造平衡を有する領域を赤にて色づけラベルした。(B) GDP と近傍の GQ_{13} の残基との位置関係。GDP との水素結合を点線にて示した。本研究により同定した領域のうち GDP 結合領域を青枠にて、 β スtrandを緑枠にて示した。

(2) $G\alpha_{i/o}$ による GIRK 制御の構造機構の解明

本研究は、GTP の非加水分解アナログである $GTP\gamma S$ 結合状態の $G\alpha$ と GIRK 細胞内領域 $GIRK_{CP-L}$ (以下 $GIRK$) を解析対象とし、NMR 法により両者の相互作用を解析した。修士課程までに、サンプル調製方法を確立し、転移交差飽和(TCS)実験により $GIRK$ 上の $G\alpha$ 結合領域として αA を同定し、常磁性緩和と促進(PRE)実験により $G\alpha$ の I82 と $GIRK$ の αA が近接することを示していた。

1. $GTP\gamma S$ 結合状態の $G\alpha$ の主鎖アミドシグナルの帰属の確立

[U-²H,¹³C,¹⁵N] Gα を用いた三重共鳴測定に基づく主鎖連鎖帰属により、帰属可能な 353 残基中 334 残基の帰属を確立した。

2. TCS 実験による Gα 上の GIRK 結合残基の同定

[U-²H,¹⁵N] Gα と非標識 GIRK を用いた TCS 実験の結果、検出された残基は α2 と α3 にて連続面を形成していたことから、この領域が Gα 上の GIRK 結合領域であることが示された(Fig. 5A)。

3. TCS 実験による GIRK 上の Gα 結合残基の同定

修士課程にて行った実験条件を改善し、[U-²H,¹⁵N] Gα と非標識 GIRK を用いた TCS 実験を行った。その結果 αA を含む C 末端領域が検出されたことから、この領域が Gα 結合部位であることを確認した(Fig. 5B)。

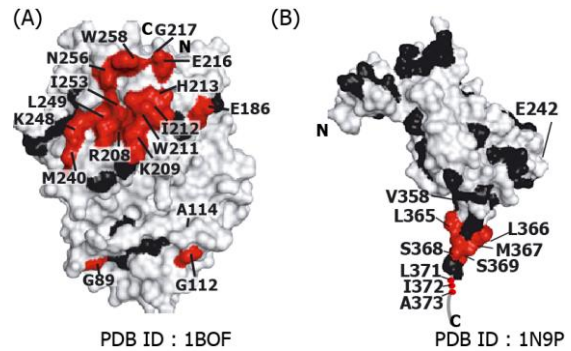


Fig. 5 TCS 実験により同定した結合残基
(A) Gα の立体構造 (表面表示) 上に GIRK 結合残基をマッピングした。(B) GIRK の一つのサブユニット(表面表示)上に Gα 結合残基をマッピングした。ともに黒は解析対象外を示す。

【考察】

本研究により、Gα と GIRK の相互作用様式をアミノ酸残基レベルにて解明した。TCS 実験にて同定した結合残基を用い、HADDOCK により Gα と GIRK 細胞内領域との複

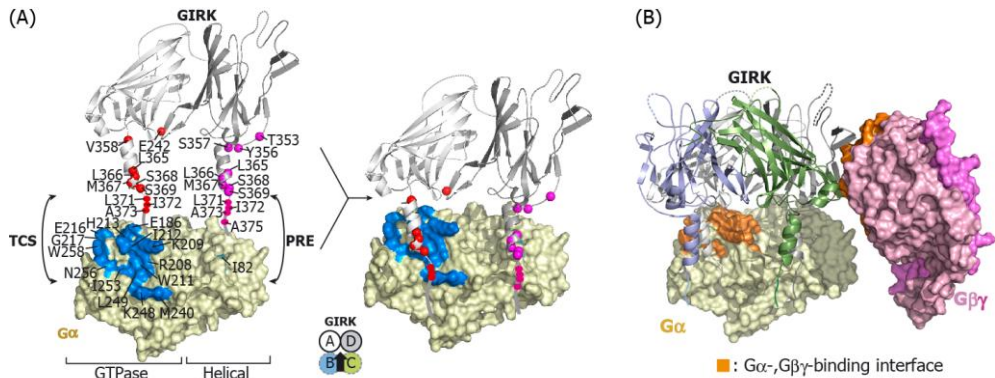


Fig. 6 Gα による GIRK 制御の構造基盤

(A)(左)Gα および GIRK の隣り合う二つのサブユニット上に TCS 実験結果をそれぞれ青と赤、PRE 実験結果をそれぞれ緑とマゼンタにてマッピングした。(右)Gα-GIRK 細胞内領域複合体モデル。(B)Gα-GIRK-Gβγ 3 者複合体モデル。Gα, Gβγ 上のそれぞれの相互作用残基を橙にて色づけた。

合体モデル構造を構築した(Fig. 6A)。Gα は GTPase ドメインにて GIRK の C 末端領域に結合し、ヘリカルドメインが GIRK の隣のサブユニットの C 末端に近接する様式にて両者が結合する。これは PRE 実験結果を満たしていた。また GIRK 上の Gα 結合部位は、以前我々が明らかとした Gβγ 結合部位と重複しないことから、Gα と Gβγ は同時に GIRK に結合可能であることが分かった。GIRK 活性化時に、Fig. 6B に示すような Gα-GIRK-Gβγ 複合体が形成されることが、GPCR 刺激終了時の Gα による Gβγ の素早い回収を可能とし、迅速な GIRK の閉口を達成する構造基盤であると提唱する。

【総括】

Gα を NMR 法により解析し、GDP 結合状態の Gα の動的構造平衡が GDP/GTP 交換反応の制御に寄与するとともに、GTP 結合状態の Gα は、Gβγ のエフェクターと相互作用することにより、シグナル伝達を適切に制御していることを示した。以上は、G 蛋白質シグナリングにおいて Gα が担う役割の構造基盤を与えるものである。