九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

The Study on the Molecular Mechanisms of GPCR Receptor Activation in the Nociceptin-ORL1 Ligand-Receptor System

西村, 裕一

https://hdl.handle.net/2324/1441032

出版情報：九州大学, 2013, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

The Study on the Molecular Mechanisms of GPCR Receptor Activation
in the Nociceptin–ORL1 Ligand–Receptor System
（ノシセプチン ORL1 疼痛受容体の活性化分子機構に関する研究）

西村　裕一

論文内容の要旨

生物がその生命を維持するためには周囲の環境に適応することが必要であり、体内の個々の細胞であっても、体内環境に適応しなければならない。このため生物には、外界や体内の環境の変化を情報として伝達する機構が備わっている。この機構は「シグナル伝達機構」と呼ばれ、シグナル分子を介した一連の化学反応によって、細胞間、細胞内で情報が伝達される。シグナル伝達は、情報を「受容体」と呼ばれるタンパク質が受け取ることから始まる。細胞外からの情報は、細胞膜受容体が受容し、細胞内へとシグナルを伝達する。細胞膜受容体には、G タンパク質共役受容体（GPCR）、受容体型チロシンキナーゼ、イオンチャネル共役型受容体の 3 種類が存在するが、このなかでも、GPCR は、ヒトで 1,000 種類以上も存在する最も大きなタンパク質スーパーファミリーである。GPCR は、その構造的な特徴として、細胞膜を 7 回貫通する特有の構造をもち、共通した機能として、情報をリガンドとして受け取ると活性化し、細胞内に存在するヘテロ三量体 G タンパク質をリクルート、活性化することでシグナルを細胞内へと伝達する。G タンパク質は、細胞内の多くのイベントを制御しているため、GPCR を介したシグナルは、様々な生理作用や疾患に関与する。このため、GPCR は創薬の中心的なターゲットである。こうした背景から、GPCR の活性化機構について、活発な研究がなされてきた。しかしながら、受容体活性化の本質である「リガンド結合に伴う受容体の構造変化」について、リガンドがどのように結合し、受容体が活性化状態にどのようにして構造変化するのか、今日までその解明には至っていない。

一般的なタンパク質研究において、X 線結晶構造解析による構造決定は、そのタンパク質の構造と機能の相関関係を知るために有用な手法である。近年まで、ロドプシンの構造が GPCR の結晶構造として唯一であったが、2007 年に β_2 アドレナリン受容体の結晶構造が明らかになったことを皮切りに、GPCR 結晶化の方法論が確立され、数々の GPCR の結晶構造が報告されてきた。しかしながら、こうした結晶構造は多様な受容体構造アンサンブルの中にある 1 つの構造に過ぎず、その活性化機構の解明には、より詳細な構造活性相関解析が必要不可欠と認識されている。そこで本博士研究では、GPCR の活性化機構の解明のため、網羅的かつ合目的な構造活性相関解析を実施することにした。研究のターゲットである ORL1 受容体は、オピオイド受容体と一次構造における相同性が高いにも関わらず、オピオイド受容体の鎮痛作用とは全く逆の疼痛作用をもたらす。一方、記憶や学習の阻害といった生理作用にも関与しており、創薬の観点からも注目される GPCR の 1 つである。本博士論文では、以下のような章立てに従って、研究の経緯および結果を記述した。

第一章では、GPCR の構造と機能に関して、一般的な最新の知見について述べ、研究ターゲットとする ORL1 受容体の活性化機構解明の意義などを含めて、研究背景について論述した。

第二章では、ORL1 受容体の構造活性相関研究をするに当たり、強力な分子ツールとして探索された薬理学的分子シャペロン・Trap-101 の有効性を検証する統括的な研究を実施した。薬理学的分子シャペロンとは、タンパク質のフォールディングや輸送をレスキューする有機小分子化合物である。ORL1 受容体に細胞内で結合し、その構造を安定化する化合物として、ORL1 受容体アンタゴニスト・Trap-101 をシャペロン分子とし同定し、シャペロン効果を評価した。その結果、Asn66Ala 変異体は、通常ではミスフォールディングによって細胞内に貯留してしまうのに対し、Trap-101 で細胞を処理した場合、そのフォールディングおよび輸送がレスキューされ、野生型と同様の受容体発現を示すことが明らかとなった。さらに、Trap-101 を用いることによって、ORL1 受容体の Asp94 と Asn312 の直接の水素結合が、リガンド結合ポケットの構築に必須であることも明らかとした。変異によるミスフォールディングは、タンパク質の機能解析を困難にするが、Trap-101 は、これを解決する強力な分子ツールとなることが示された。

第三章第一節では、ORL1 受容体の機能発現において重要なアミノ酸残基を全て同定するため、大規模な Ala-scanning を実施した。ORL1 受容体は 367 アミノ酸残基から構成されるが、このうち、Ala (30 残基)と Gly (22 残基) を除いた、総計 315 アミノ酸残基についてそれぞれ Ala 変異体を作製し、それらの発現、リガンド結合能、受容体活性化能を評価した。また、必要に応じて、Trap-101 の効果、細胞内での局在を調べた。その結果、受容体発現に重要な 4 残基、ノシセプチンの結合に必須な 9 残基、リガンド結合には関係せず受容体の活性化に必須なアミノ酸 41 残基の同定に成就した。このうち、ノシセプチンの新規な結合サイトとして、Gln104、Asp107、Glu196 を発見した。また、ヘリックス間パッキングに関与する残基の同定に成功した。こうした ORL1 受容体や GPCR の機能一般に関わるアミノ酸残基を網羅的に同定できたことは、本研究最大の成果の一つである。

第三章第二、第三節では、一般的なタンパク質の機能において、重要な役割を担うことが多い Trp 残基と Cys 残基に着目し、ORL1 受容体におけるそれぞれの機能的な役割について精査した。第二節では、Trp 残基に着目し、Trap-101 の効果や、Ala 以外の変異受容体を評価するなど、機能解明のための合目的な研究を行った。その結果、Trp113 残基がノシセプチン結合およびそれに伴う受容体活性化に必須なアミノ酸残基であることを初めて明らかとした。第三節では、Cys 残基の役割の１つとして、パルミトイル化 Cys に着目し、これの同定を試みた。そして、ORL1 受容体の新規な受容体パルミトイル化サイトとして、Cys150 と Cys357 が初めて同定された。パルミトイル化は、受容体活性化機構においてきわめて重要な構造要因である。

第三章第四節では、ノシセプチン結合から受容体の活性化に至るまでの一連の分子機構を解析した。Ala-scanning の結果、最も重要な残基として Tyr316 を発見した。GPCR 活性化において第 6 膜貫通ドメイン（TM6）が大きく構造変化するが、この Tyr316 は Asp145、Tyr232 と共に TM6 と相互作用し、受容体の不活性化型から活性化型への構造変化に関与することが明らかとなった。また、Val276 および Gln277 が協働することも明らかとなった。これらは、ORL1 受容体の活性化分子機構の新しい局面を解明した。

本研究において、ノシセプチン結合や、ORL1 受容体の活性化に必須な残基が全て同定され、また、受容体活性化における一連の分子機構を明らかにすることができた。１つの GPCR について、ここまで網羅的かつ合目的な研究はなされたことがなく、パルミトイル化 Cys 残基の発見なども含め、GPCR のシグナル伝達機構解明にきわめて重要な知見が得られた。