

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770076

研究課題名(和文) グルタミン酸受容体の信号伝達機構を原子レベルで理解する

研究課題名(英文) Understanding of Signal Transduction Mechanism of Glutamate Receptor at Atomic Resolution

研究代表者

海野 昌喜 (UNNO MASAKI)

茨城大学・フロンティア応用原子科学研究センター・准教授

研究者番号：10359549

研究成果の概要(和文)：グルタミン酸受容体 GluK1, GluK2 と化合物・ダイシハーベイン類縁体の相互作用様式を理解するため、それらの複合体のX線結晶構造解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the interaction ways between the glutamate receptors (GluK1, GluK2) and the dysiherbaine analogues, we determined the X-ray structure of these protein-ligand complexes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、グルタミン酸受容体、生体機能分子、薬物設計

1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) は、脳の中樞神経系に存在し、早い興奮性の神経伝達を担っている膜蛋白質である。この蛋白質はグルタミン酸を受容することで、自身で形成するイオンチャンネルを開口し、 Na^+ 、 K^+ などの陽イオンを透過する。iGluR は神経回路の形成や、記憶・学習の基

盤となるシナプス可塑性に関与していることが知られている。また、医学の発展した現代においても社会問題にさえなっているアルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症などの精神・神経疾患には、この蛋白質の機能不全が関与することも分かっている。

iGluR は、アミノ酸配列の類似性と薬理学

的な性質から、いくつかのサブタイプに分類される。そのうち **GluR5**, **GluR6**, **GluR7** (注: 現在は **GluK1**, **GluK2**, **GluK3** と表記される。) はカイニン酸との親和性が高いことから、カイニン酸型グルタミン酸受容体として分類される。これらは、そのグループ内や他グループの別の **iGluR** とヘテロ四量体を形成することが報告されている。

iGluR を制御する薬剤の開発は、医学・薬学・有機化学の分野から最も注目を集めている研究課題の一つであった。そのような中、海綿 *Dysidea herbacea* から単離・精製されたダイシハーベインというアミノ酸は、**GluK1** と **GluK2** に非常に強く結合し、それらを大きく活性化する生体機能分子であることが分かった。研究開始時、電気生理学者や有機化学者の研究により、その構造類縁体で **GluK1** のみを選択的に不活性化する化合物も設計・合成されていた。

しかし、それまでは、現象を見ているだけで、その作用機構はわからなかった。そこで我々は、原子レベル分解能の構造解析を行い、リガンド結合様式と活性化（不活性化）の機構を明らかにしようと考えた。まず我々は、ヒトの脳由来の **GluK1** のリガンド結合ドメインを発現、精製、結晶化し、グルタミン酸結合型の結晶構造を 2.0Å 分解能で明らかにした。また、ダイシハーベインやその構造類縁体であるネオダイシハーベイン結合型の結晶化方法も確立していた。この研究は、新規薬剤の開発に大きく貢献すると思われ、さらに選択性の高い化合物の開発には、**GluK2**, **GluK3** のリガンド結合部位の構造を原子レベル分解能で知る必要があった。

2. 研究の目的

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の情報伝達機構、生体機能分子であるダイシ

ハーベイン構造類縁体の作用機構・サブタイプ選択性、を原子レベルの構造から明らかにすることである。

3. 研究の方法

まず我々は **GluK1** の発現系の構築を行った。**pET28a** に **GluK1** のリガンド結合部位 (**S1** 領域、**S2** 領域 (互いに 110 残基ほど離れている。)) の cDNA を組み込み、大腸菌 **BL21(DE3)** を用いて発現させたところ、ほとんどすべての目的蛋白質はインクルージョンボディに入ってしまう、その後の精製を行っていくことができなくなった。そこで、ベクターを低温での発現が可能な **pCold** に変換し、また分子シャペロンである **GroEL**, **ES** と共に共発現させたところ、上清に蛋白質を得ることができた。この発現系の構築により、高純度精製が可能になり、結晶化を行うことができた。

GluK2 については、ベクターは **pET28a** を用いた。おそらく **GluK1** についても **GroEL**, **ES** と共発現させることが重要であり、**pCold** ベクターを用いる必要はなかったのかもしれない。

結晶化は既に報告されているグルタミン酸結合型 **GluK1**, **GluK2** の結晶化条件を参考に行った。条件は非常にたくさんの条件を検索した。**GluK2** に関しては、ネオダイシハーベイン結合型の結晶がなかなか得られなかったため、**Additive Screen** (**Hampton Research** 社)による、添加剤のスクリーニングを行い、グルタチオンを含んだ条件で回折実験を行うのが可能な結晶を得ることができた。

リガンド結合型の結晶は、共結晶化によって得た。ソーキング法によっては、精製中に蛋白に結合してくるグルタミン酸と置き換えることができず、共結晶化を行ったところ、多くのリガンド (ダイシハーベイン構造類縁体) の結合した **GluK1** の構造を得ることがで

きた。GluK2 に関しては、ダイシハーベイン、ネオダイシハーベインのみ結合状態を得ることができた。

回折強度収集実験は SPring-8 や Photon Factory といった放射光施設で行った。

4. 研究成果

GluK1 とダイシハーベイン、ネオダイシハーベインなど 6 種類のダイシハーベイン構造類縁体との複合体の 1.5 Å 分解能の X 線結晶構造解析を行い、それらの結合様式を原子レベルで解明した。詳細な解析により、化合物自体の分子内水素結合の有無などにより、6 種類の化合物自体の構造に違いがあり、結合様式も異なっていた。それらの原子レベルの構造情報から、新規化合物二種類が合成された。その後、その二種類の新規化合物と GluK1 の複合体の結晶構造解析も行った。

次に、GluK1 と GluK2 による化合物の選択性を詳細に検討するために、我々は GluK2 とダイシハーベイン、ネオダイシハーベイン二種類の化合物との複合体構造を同様の方法を用いて解析した。GluK2 の構造解析の結果から、GluK1 との数残基のアミノ酸の違いがどのように選択性を決めているか、ということが分かってきた。まず、GluK1 リガンド結合部位のセリンが GluK2 ではアスパラギンである違いにより、化合物が結合する際に立体障害が起こっていることが明らかになった。さらに、ダイシハーベイン構造類縁体のグルタミン酸骨格と相互作用する蛋白側のアミノ酸が GluK1 と GluK2 ではトレオニンとアラニンという違いがあることから、水素結合様式に変化が生じ、結合した化合物の位置と向きが若干変化していた。その結果、溶媒領域を含む周囲と化合物の相互作用様式も変化し、GluK2 では、GluK1 の場合より、化合物の二環状構造側の置換基の重要性が増

しているのだということが示唆された。

これらの立体構造情報から、さらに新しい化合物の構造を提案することが可能となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① "Dioxygen activation for self-degradation of heme: Reaction mechanism and regulation of heme oxygenase."

T. Matsui, M. Iwasaki, R. Sugiyama, M. Unno, M. Ikeda-Saito

Inorg. Chem. (2010), 49 (8), 3602-3609 (査読有)

② "Heme oxygenase reveals its strategy for catalyzing three successive oxygenation reactions."

Matsui T, Unno M, Ikeda-Saito M.

Acc Chem Res. (2010) 43 (2), 240-247 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① “カイニン酸受容体アイソフォームのリガンド認識機構と選択的薬剤設計”

海野昌喜

茨城県中性子利用促進研究会 生命物質構造解析研究会

装薬標的タンパク質の構造解析分科会・電子伝達タンパク質の構造解析分科会

「第一回合同公開研究会」, 2010.1.15, 東京

② “構造を基にしたグルタミン酸受容体 GluR5, GluR6 選択的化合物の設計”

海野昌喜, 篠原正将, 高山昂一郎, 渡邊朋子, 田中秀治, 酒井隆一, 佐々木誠, 齋藤正男
2009 年日本結晶学会年会, 2009.12.5, 兵庫

③ “構造を基にしたグルタミン酸受容体 GluR5 選択的化合物の設計”

海野昌喜, 篠原正将, 高山昂一郎, 渡邊朋子,

田中秀治, 酒井隆一, 佐々木誠, 齋藤正男
日本化学会関東支部茨城地区研究交流会,
2009.11.6, 茨城

④ “構造を基にしたグルタミン酸受容体
GluR5 選択的化合物の設計”

海野昌喜, 篠原正将, 高山昂一郎, 渡邊朋子,
田中秀治, 酒井隆一, 佐々木誠, 齋藤正男
第 82 回 日本生化学会大会, 2009.10.22, 兵
庫

⑤ "Structure and Catalytic Mechanism of Heme
Oxygenase"

Masaki Unno, Toshitaka Matui, Masao
Ikeda-Saito

The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry
Conference, 2009.7.30, Nagoya

[図書] (計 1 件)

① "Nanohybridization of
Organic-Inorganic Materials"
Springer, - Characterization of Metal
Proteins - , pp.193-217 (2009)
Unno, M. and Ikeda-Saito, M.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野 昌喜 (UNNO Masaki)
茨城大学・フロンティア応用原子科学研究
センター・准教授
研究者番号：10359549