

学 位 論 文 題 名

Theoretical study on the dynamics of ligand recognition
and activation of the glutamate receptor(グルタミン酸受容体のリガンド認識および
活性化のダイナミクスに関する理論的研究)

学位論文内容の要旨

化学シナプスにおける神経伝達は、神経伝達物質とよばれる化学物質によって行われている。シナプス前細胞から放出される神経伝達物質は、シナプス後細胞の細胞膜に存在する受容体に特異的に結合し、受容体に構造変化を引き起こす。受容体の構造変化はシナプス後細胞におけるシグナル伝達経路の引き金となっている。神経伝達物質やアゴニストの作用とは異なり、アンタゴニストは受容体に特異的に結合するにもかかわらず、受容体を活性化しない。受容体のリガンド認識やアゴニストによる活性化のダイナミクスは、神経科学分野における重要課題であるが、受容体の三次元構造の知見が十分でなかったために、これまで明らかにされてこなかった。このような状況の中で、近年、イオンチャネル型グルタミン酸受容体のリガンド結合ドメインの結晶構造が高分解能で明らかにされた。この結晶構造データを用いることで、リガンドと受容体との間の相互作用や受容体の構造変化のダイナミクスを、コンピュータ上で解析することが可能となった。

そこで本研究では、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の結晶構造を用い、この受容体のリガンド認識および活性化のダイナミクスを理論的に解析した。

イオンチャネル型グルタミン酸受容体は、脳の大部分の興奮性シナプス伝達をになっており、学習・記憶といった脳の高次機能への関与が示されているリガンド誘導型カチオンチャネルである。同種または異種のサブユニットが会合した四量体として存在し、各サブユニットそれぞれがリガンド結合ドメインを持っている。リガンド結合ドメインは双葉型の構造(ローブ1, ローブ2)をしており、リガンド結合部位は、2つローブの裂け目に存在する。

グルタミン酸受容体のリガンドの三次元構造は、3種のアゴニスト(グルタミン酸, AMPA, カイニン酸)および5種のアンタゴニスト(DNQX, APVなど)のみが受容体に結合した状態で明らかにされている。そこで、第1章においては、受容体から解離して水中にある状態のグルタミン酸の構造を、量子化学計算によって調べた。その結果、グルタミン酸は、安定構造として、炭素骨格が伸びた形と丸まった形の2つの構造を持っていることがわかった。また、これら2つの構造間のエネルギー障壁は小さく、グルタミン酸はこれら2つの構造間を遷移していることがわかった。受容体に結合した状態のグルタミン酸の構造は、2つの安定構造間の遷移の途中に現れる形であった。併せて第1章においては、 γ -アミノ酪酸(GABA)の構造を明らかにし、グルタミン酸とGABAの物理化学的性質を、量子化学的計算によって調べた。GABAは抑制性の神経伝達物質であるが、GABAはグルタミン酸と比べてカルボキシル基が1つ少ないだけである。したがって、グルタミン酸とGABAとの間で構造や

物理化学的性質を比較することにより、グルタミン酸受容体のリガンド認識に必要とされるリガンドの特性が明らかとなることが期待された。比較の結果、両分子の静電ポテンシャルに顕著な違いが見られた。グルタミン酸の静電ポテンシャルは主に負の領域で占められるのに対して、GABAのそれは正の領域と負の領域に二分されていた。

第2章においては、グルタミン酸受容体のアゴニスト5種およびアンタゴニスト3種の静電ポテンシャル、および受容体リガンド結合ドメインの静電ポテンシャルを量子化学計算によって調べた。その結果、全てのリガンドは、分子の両端に負の静電ポテンシャルを形成していることがわかった。一方、受容体リガンド結合部位は、ローブ1にあるArg485を中心に正の静電ポテンシャルを形成していた。ローブ2にあるGlu657近傍にのみ局所的に負の静電ポテンシャルが見られた。これらのリガンド・受容体間の静電ポテンシャルの相補性から、グルタミン酸受容体のリガンド認識には、遠距離力である静電気力が中心的な働きをしていることが明らかにされた。また、リガンドの結合はまずローブ1のArg485への結合から始まることも示唆された。ローブ1のArg485への結合から始まるリガンド結合過程は、結晶構造解析のデータからも示唆されているものであった。また、グルタミン酸および受容体リガンド結合ドメインの最高占有軌道と最低非占有軌道を計算した結果、両分子間で電荷移動が起こらないことが明らかにされた。

第3章においては、受容体活性化のメカニズムの解明のために、リガンドおよび受容体の基準振動を調べた。アゴニストもアンタゴニストも静電相互作用によって受容体に結合するものの、アゴニストのみが受容体を活性化できることを考えると、アゴニストの静電気力では受容体の活性化を説明できない。近年の計算機シミュレーションにより、タンパク質の構造変化には、その振動状態が重要であることが明らかにされている。アゴニストの特異的な振動モードが、受容体の振動励起、引いては構造変化に重要な役割を果たしていると考えられる。アゴニストとアンタゴニストの基準振動モードを比較した結果、アゴニストが共通に持っておりアンタゴニストは持っていない振動モードが、受容体と水素結合を介して振動相互作用することをつきとめた。それらアゴニスト特異的な振動相互作用のうちの1つは、アゴニストのカルボキシル基の対称伸縮振動とArg485のグアニジニウム基の変角振動との間で起こっていた。

第4章においては、これら2つの振動モードがアゴニストとArg485との間の衝突によって振動励起する確率を量子力学的に計算した。時間に依存した一次摂動論を用いて計算した結果、サブピコ秒の時間オーダーでこれら2つの振動モードは励起することがわかった。この振動励起のエネルギー源は、静電相互作用によって加速されたアゴニストの運動エネルギーであった。

最後に第5章においては、受容体リガンド結合ドメインにおけるArg485の振動励起エネルギーの移動過程を、分子動力学シミュレーションによって調べた。Arg485の振動励起エネルギーは、0.5ピコ秒以内にLys730へと移動し、続いてJヘリックスへと移動した。その結果、約3ピコ秒でJヘリックスの原子にサブÅの変位が見られた。Jヘリックスは、サブユニット間の結合部位に位置している。サブユニット間の結合部位に起こる原子変位は、サブユニット間の会合に摂動を与える効果があると考えられる。グルタミン酸受容体と同じイオンチャネル型の神経伝達物質受容体であるニコチン受容体では、リガンド結合ドメインはサブユニット間の相互作用によって歪んでおり、アゴニストの結合によりリガンド結合ドメインの構造が緩和すること、またこの構造緩和はサブユニットの回転を導き、イオンチャネルの開口を促すことがすでに示されている。グルタミン酸受容体に見られたArg485の振動励起の結果起こるサブユニット間の結合部位の原子変位も、ニコチン受容体と同様に構造緩和を導き、サブユニットの回転によってイオンチャネルを開口へと導くのであろう。

以上の一連の研究結果は、神経科学分野において重要課題である受容体のリガンド認識および活性化のダイナミクスの解明に大きな貢献を果たすものである。

学位論文審査の要旨

主査	助教授	伊藤悦朗
副査	教授	浦野明央
副査	教授	小池達郎
副査	教授	高畑雅一
副査	教授	田中 勲

学位論文題名

Theoretical study on the dynamics of ligand recognition and activation of the glutamate receptor

(グルタミン酸受容体のリガンド認識および
活性化のダイナミクスに関する理論的研究)

シナプス前細胞から放出される神経伝達物質は、シナプス後細胞の細胞膜に存在する受容体に特異的に結合し、受容体に構造変化を引き起こす。受容体の構造変化はシナプス後細胞におけるシグナル伝達経路の引き金となっている。神経伝達物質やアゴニストの作用とは異なり、アンタゴニストは受容体に特異的に結合するにもかかわらず、受容体を活性化しない。受容体のリガンド認識やアゴニストによる活性化のダイナミクスは、神経科学分野における重要課題であるが、受容体の三次元構造の知見が十分でなかったために、これまで明らかにされてこなかった。このような状況の中で、近年、イオンチャネル型グルタミン酸受容体のリガンド結合ドメインの結晶構造が高分解能で明らかにされた。この結晶構造データを用いることで、リガンドと受容体との間の相互作用や受容体の構造変化のダイナミクスを、コンピュータ上で解析することが可能となった。

そこで本研究では、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の結晶構造を用い、この受容体のリガンド認識および活性化のダイナミクスを理論的に解析した。

グルタミン酸受容体のリガンドの三次元構造は、3種のアゴニストおよび5種のアンタゴニストのみが受容体に結合した状態で明らかにされている。そこで、第1章においては、受容体から解離して水中にある状態のグルタミン酸の構造を、量子化学計算によって調べた。その結果、グルタミン酸は、炭素骨格が伸びた形と丸まった形の2つの安定構造を持っており、それら2つの構造間を遷移していることがわかった。受容体に結合した状態のグルタミン酸の構造は、2つの安定構造間の遷移の途中に現れる形であった。併せて第1章においては、抑制性の

神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) の構造を明らかにし、グルタミン酸とGABAの物理化学的性質を、量子化学的計算によって調べた。GABAはグルタミン酸と比べてカルボキシル基が1つ少ないだけである。グルタミン酸とGABAとを比較することにより、リガンド認識に必要とされるリガンドの特性が明らかとなることが期待され、実際に、両分子の静電ポテンシャルに顕著な違いが見られた。

第2章においては、グルタミン酸受容体のアゴニスト5種およびアンタゴニスト3種の静電ポテンシャル、および受容体リガンド結合ドメインの静電ポテンシャルを、量子化学計算によって調べた。全てのリガンドは、分子の両端に負の静電ポテンシャルを形成している一方、受容体リガンド結合部位は、Arg485を中心に正の静電ポテンシャルを形成していた。これらのリガンド・受容体間の静電ポテンシャルの相補性から、グルタミン酸受容体のリガンド認識には、遠距離力である静電気力が中心的な働きをしていることが明らかにされた。また、リガンドの結合はまずArg485への結合から始まることも示唆された。また、グルタミン酸および受容体リガンド結合ドメインの最高占有軌道と最低非占有軌道を計算した結果、両分子間で電荷移動が起こらないことが明らかにされた。

第3章においては、受容体活性化のメカニズムの解明のために、リガンドおよび受容体の基準振動を調べた。アゴニストとアンタゴニストの基準振動モードを比較した結果、アゴニストが共通に持っているもののアンタゴニストは持っていない振動モードが、受容体と水素結合を介して振動相互作用することをつきとめた。それらアゴニスト特異的な振動相互作用のうちの1つは、アゴニストのカルボキシル基の対称伸縮振動とArg485のグアニジニウム基の変角振動との間で起こっていた。

第4章においては、これら2つの振動モードがアゴニストとArg485との間の衝突によって振動励起する確率を量子力学的に計算した。その結果、サブピコ秒の時間オーダーでこれら2つの振動モードは励起することがわかった。この振動励起のエネルギー源は、静電相互作用によって加速されたアゴニストの運動エネルギーであった。

最後に第5章においては、受容体リガンド結合ドメインにおけるArg485の振動励起エネルギーの移動過程を、分子動力学シミュレーションによって調べた。Arg485の振動励起エネルギーはJヘリックスへと移動し、約3ピコ秒でJヘリックスの原子にサブÅの変位が起こることがわかった。Jヘリックスは、サブユニット間の結合部位に位置している。サブユニット間の結合部位に起こる原子変位は、サブユニット間の会合に摂動を与え、イオンチャネルを開口へと導くのであろう。

これを要するに、以上の一連の研究結果は、神経科学分野において重要課題である受容体のリガンド認識および活性化のダイナミクスの解明に大きな貢献を果たすものである。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。