

NAIST-IS-DD0361028

Doctoral Dissertation

**Prediction of Interfaces for
Oligomerization of Class A G-Protein
Coupled Receptors**

Wataru Nemoto

September 13, 2005

Department of Bioinformatics and Genomics
Graduate School of Information Science
Nara Institute of Science and Technology

A Doctoral Dissertation
submitted to the Graduate School of Information Science,
Nara Institute of Science and Technology
in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Doctor of SCIENCE

Wataru Nemoto

Thesis Committee:

Professor Naotake Ogasawara	(Supervisor)
Professor Toshio Hakoshima	(Member)
Associate Professor Susumu Goto	(Member)
Associate Professor Takeshi Kawabata	(Member)

Class A Gタンパク質共役型受容体がオリゴマー化する際の インターフェイスを予測する手法の開発*

根本航

内容梗概

Gタンパク質共役型受容体 (GPCRs) は、市販薬物の3割以上を占める、創薬における重要な標的の一つである。ホモ/ヘテロのオリゴマーとしても機能し、その際のリガンドの選択性・親和性などがモノマーとは異なるものが多いことから、オリゴマー化メカニズムの解明が重要となってきた。また、相互作用のためのインターフェイスが予測されれば、オリゴマー化を制御する低分子設計の指針となる。そこで、我々は保存残基の分布を利用して、分子表面のどこにインターフェイスが位置するかを予測する手法を開発した。

ロドプシン、D₂ドーパミン受容体、β₂アドレナリン受容体など、インターフェイスが既知のクラスA GPCRsに適用したところ、予測領域は実験で提案されている領域と一致した。このことから、我々が開発した手法はクラスA GPCRs がオリゴマー化する際のインターフェイスを検出する手法として有用であると考えられる。そこで、インターフェイスが未知のクラスA GPCRsへも本方法を適用しインターフェイス予測を行った。分子系統樹のクラスタリングに基づき、機能的に等価であると考えられるサブタイプごとに分け、サブタイプごとのインターフェイスを予測した。その結果、サブファミリー内であってもサブタイプごとにインターフェイスの位置が変化していた。さらに、遺伝性筋間代性痙攣のメカニズムに、D₂ドーパミン受容体がオリゴマー化する際のインターフェイス異常が関与することが示唆された。

キーワード GPCRs, オリゴマー, インターフェイス, タンパク質間相互作用

*奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科情報生命科学専攻学位論文, NAIST-IS-DD0361028, 2005年9月13日.

Prediction of Interfaces for Oligomerization of Class A G-Protein Coupled Receptors*

Wataru Nemoto

Abstract

Accumulated pharmacological and biochemical evidence has indicated that some G-protein-coupled receptors (GPCRs) form homo oligomers, hetero oligomers or both. The GPCRs oligomerizations are considered to be important for proper signal transduction. Furthermore, in some cases, the oligomerization has been suggested to be related to diseases. Therefore, an accurate prediction of the residues involved in oligomerization would further our understanding of signal transduction and the diseases. One of the complications for such a prediction is that the oligomerization interfaces differ with the subtypes, even within the same GPCR subfamily. Focusing on the spatial distribution of residues conserved on the molecular surface in a particular subtype, we developed a new method to predict the interface for the GPCR oligomers, and applied it to several subtypes of known GPCRs to check the sensitivity. Subsequently, we found that predicted interfaces of rhodopsin, D₂ dopamine receptor and β_2 adrenergic receptor agreed with the experimentally suggested interfaces, despite difference in the interface region among the three subtypes. Moreover, a highly conserved residue detected from the D₂ dopamine receptor corresponded to a residue involved in a missense change found in the large family of myoclonus dystonia. Our observation suggests a possibility that the disease is caused by the disorder of the oligomerization, although the molecular mechanism of the disease has not been revealed yet. The benefits and the pitfalls of the new method will be discussed, based on the results of the applications.

Keywords: GPCRs, oligomer, interface, protein-protein interaction

*Doctoral Dissertation, Department of Bioinformatics and Genomics, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-DD0361028, September 13, 2005.

目次	3
緒言	5
GPCR	5
GPCR のオリゴマー化メカニズム	7
研究目的	10
先行研究	11
方法	18
配列情報と立体構造情報	18
予測方法の概要	19
BOX[I]: 相同配列の収集(図 3-1:BOX[I])	20
BOX[II]: マルチプルアラインメント(図 3-1:BOX[II])	20
BOX[III]: 分子系統樹の作成とグルーピング(図 3-1:BOX[III])	20
BOX[IV]: 保存度の算出(図 3-1:BOX[IV])	23
BOX[V]: 3次元座標データの2次元平面への射影(図 3-1:BOX[V])	25
BOX[VI]: 内部残基と外部に露出した残基の同定(図 3-1:BOX[VI])	25
BOX[VII]: インターフェイス候補残基の同定(図 3-1:BOX[VII])	27
BOX[VIII]: <i>ad hoc</i> なスコア関数に基づく保存残基の統計的評価(図 3-1:BOX[VIII])	28
結果	33
サブタイプにおける配列の多様性	33
オプシンファミリーについての予測	35
ドーパミン受容体ファミリー、アドレナリン受容体ファミリー、ムスカリニックアセチルコリン受容体ファミリーについての予測	37
考察	45
インターフェイス予測のための保存度の評価	45
予測精度の評価	46
オプシンファミリー	46
ドーパミン受容体ファミリー	47
アドレナリン受容体ファミリー	49
ムスカリニックアセチルコリン受容体ファミリー	50
サブタイプ内での保存サイトの観察	51
インターフェイスを複数持つタンパク質のインターフェイス予測	56
データベース: G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR INTERACTING PARTNERS -GRIP-	

58

結び	64	
謝辞	67	
参考・引用文献	69	
付録	85	
保存度の分布	85	
アミノ酸組成	85	
膜平面に垂直な軸方向の残基の分布		93
付録表 a~c	97	
業績リスト	100	

緒言

GPCR

G タンパク質共役型受容体 (G-Protein Coupled Receptor: GPCR) は、7 回膜貫通ヘリックスを有する膜タンパク質である。現在市販されている薬物の約 30% [1] は GPCR に結合することからも分かるように、医薬品の標的として最も注目されるタンパク質の一つである。ペプチド、アミン、核酸など生理活性物質の結合が引き起こす GPCR 自身の立体構造変化が、細胞内に位置する 3 量体型 G タンパク質の GDP-GTP 交換反応と共役することで、細胞外からのシグナルが細胞内へ伝達される [2]。例えば、AT₁ アンジオテンシン受容体 (AT₁R) はアンジオテンシン変換酵素の働きによってアンジオテンシン I から作られるアンジオテンシン II (AII) と結合した後、3 量体型 G タンパク質の G_{αq} を介してホスホリパーゼ C を活性化し、イノシトール-1, 4, 5-三リン酸とジアシルグリセロールを産生する。ジアシルグリセロールはプロテインキナーゼの活性化を引き起こし、イノシトール-1, 4, 5-三リン酸は細胞内貯留カルシウムからの Ca²⁺ 放出を誘導する。AII 受容体拮抗薬は、AII の AT₁R への結合を阻害する。その結果、血管壁肥厚作用、動脈硬化作用、血管収縮作用などが妨げられ、特に心筋では、心筋収縮力増強作用、心筋肥大作用などが阻害される [3]。

配列の相同性、7 本の膜貫通領域の特徴、疎水性ヘリックスの存在、また 3 量体型 G タンパク質との相互作用のためのモチーフの存在などを利用することで、ヒトゲノム中に存在する GPCR 遺伝子の *in silico* での予測が行われている。その結果、約 1000 の GPCR がヒトゲノム中にコードされていると予測され [4, 5, 6]、約半数は医薬品の標的となる可能性が高い非感覚受容体であった。そのうち、リガンド既知の受容体は約 250、残りの約 250 は天然リガンド未知のオーファン受容体であった [7]。リガンドの種類が豊富であること、共役する 3 量体型 G タンパク質も多様であることに加え、GPCR を介した個々のシグナルがその下流において様々なシグナル伝達経路とクロスト

ークすることにより、GPCR が関与するネットワークは多様化している。ホモやヘテロのダイマー、さらには、ダイマー以上のオリゴマーの存在も確認されている(以後、ダイマーと記載した場合はダイマーを意味し、オリゴマーと記載した場合はダイマー以上の高分子構造を意味することとする)。例えば、 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) [15-20] や δ -オピオイド受容体 [21-24] をはじめ、多くの GPCR がホモオリゴマーを形成する。一昨年、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いてマウソロドプシンのオリゴマー構造が観察されたこともあり [25, 26]、GPCR がオリゴマーを形成することが広く受け入れられるようになってきている。オリゴマー形成時の機能はモノマーの場合とは異なるとの報告も多い [8-14]。同時に発現するモノマーの組み合わせだけでも膨大な数にのぼるため、GPCR はこれまでに考えられてきた以上に多様なシグナル伝達経路に関与しているものと推察される。さらに、ホモオリゴマーだけでなく、ヘテロオリゴマーについての報告も多い。例えば、 A_{1A} アデノシン受容体 (A_{1A} R) とドーパミン D_1 受容体 (D_1 R) [27]、 A_{1A} R と代謝型グルタミン酸受容体のサブタイプ 1 α (mGluR1 α) [28]、 A_{2A} アデノシン受容体 (A_{2A} R) と D_2 ドーパミン受容体 (D_2 R) [29]、そして A_{2A} R と代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ 5 [30] などが複合体を形成することが報告されている。

また、ヘテロオリゴマー形成がシグナル伝達に与える影響に関する報告も増えてきている。 V_{1a} バソプレッシン受容体 (V_{1a} R) と V_2 バソプレッシン受容体 (V_2 R) をそれぞれ単独で発現させた場合、アゴニストによって活性化された後、 β アレスチンと結合して細胞内へ取り込まれる(エンドサイトーシス)。その後、 V_{1a} R は素早く β アレスチンと解離した後、膜上へ移行し再利用される。一方、 V_2 R は β アレスチンと会合し続け、エンドソームへ取り込まれる。しかし、 V_{1a} R と V_2 R を共発現させた場合は、 V_{1a} R は V_2 R とヘテロダイマーを形成しているため、細胞内に取り込まれた後、 V_2 R と共にエンドソームに移行する [31]。 D_2 R と A_{2A} R は、 A_{2A} R に対するアゴニスト依存的にヘテロダイマーを形成するが、これが D_2 R のアゴニストに対する親和性を低下させ、結果として D_2 R 本来のシグナルを弱める。また、長時間にわたる D_2 R と A_{2A} R のアゴニスト投与により、両者が共に凝集することや、複合

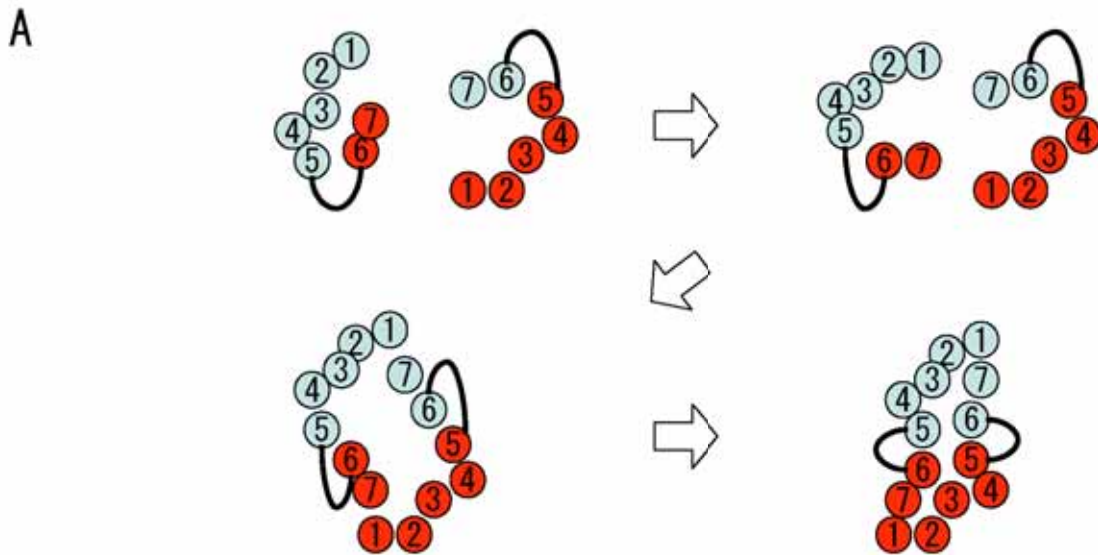
体を形成し共に細胞内へ移行する(インターナリゼーション)ことが報告されている[32, 33]。D₂RはG_iとA_{2A}RはG_sと共役し、これまでもシグナル伝達経路下流において両者は拮抗的に働くことが知られていた。しかし、膜上で直接制御しあうのであれば、GPCRの生化学的機能に対する理解を修正する必要がある。GPCRはイオンチャネル型受容体によるシグナル伝達に比べ遅い情報伝達を担うとされているが、膜上での制御関係の存在は、これまでに考えられてきたよりも早いタイミングでの制御関係の存在を示唆するからである。

さらに、高次機能との関連性が指摘されている複合体の例もある。例えば、AT₁Rとアンジオテンシン受容体IIのヘテロダイマーの発現量が妊娠中の子宮組織中で減少する[34]。また、AT₁RとブラジキニンB₂受容体のヘテロダイマー量が子癩前症患者の血小板で増加することも報告されている[35]。複合体形成時のインターフェイスの位置・性質が解れば、オリゴマー化を制御する薬物設計につながる可能性がある。また、オリゴマー化メカニズム解明のための変異実験の指針にもなるであろう。しかし、膜タンパク質オリゴマーの大量発現系構築だけでなく、複数の膜タンパク質の発現量を同時に調節することが困難なこともあり、インターフェイスの位置・性質を実験により明らかにする試みは滞っている。

GPCRのオリゴマー化メカニズム

GPCRの複合体形成メカニズムは大きく2つに分けることができる。一方は、7本の膜貫通領域の位置関係が大きく変わりモノマー自身の立体構造が大きく変わる“ドメインスワッピング”(図1A)であり、他方はモノマー自身の大きな構造変化を必要としない“ドメインコンタクト”(図1B-D)である[8, 12, 13]。ドメインスワッピングはGouldsonらによって、計算科学的解析と他グループの生化学実験結果をもとに提案された[36, 37]。ドメインスワッピングの際は、まず、モノマー内のヘリックス間で形成されていた分子内結合が切断され、7本のヘリックス自体の構造は維持されたままヘリックス束が開く。次に、分子内結合を形成していた残基対の一方が、別のモノマー内

ドメインスワッピング



ドメインコンタクト

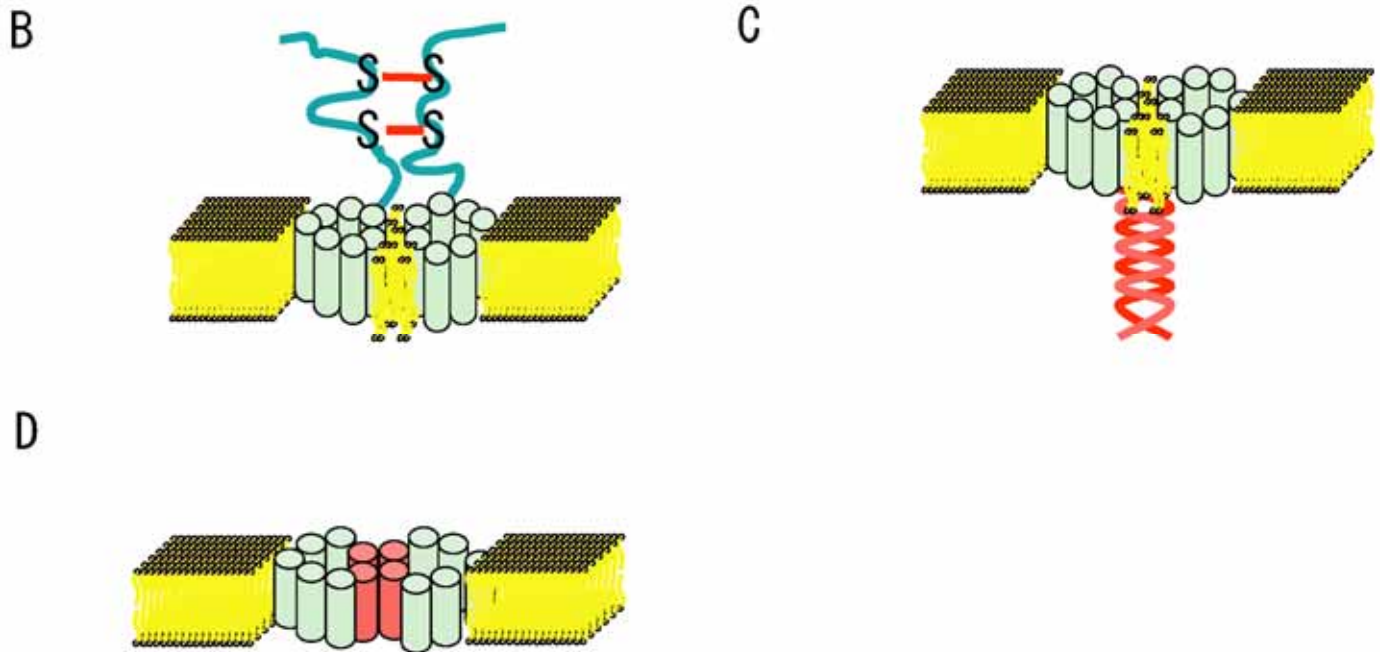


図1. GPCRsどうしの典型的な会合様式

(A) ドメインスワッピングメカニズム: モノマー内のヘリックス間で形成されていた分子内結合が切断され、7本のヘリックス自体の構造は維持されたままヘリックス束が開く。次に、分子内結合を形成していた残基対の一方が、別のモノマー内の対応する同一残基に置き換わる(スワッピング)ことによりダイマーが形成される。(B) ドメインコンタクトメカニズム: タイプI; この例では、アミノ末端に位置するシステインがジスルフィド結合を形成することでダイマーを形成する。(C) ドメインコンタクトメカニズム: タイプII; この例では、カルボキシル末端でコイルドコイル構造を形成しダイマーを形成する。(D) ドメインコンタクトメカニズム: タイプIII; 膜貫通領域を中心とした脂質と接する分子側面をインターフェイスとして会合する。クラスA GPCRの中で最も報告例が多い。

の対応する同一残基に置き換わる(スワッピング)ことにより、ダイマーが形成される。例えば、 α_2 アドレナリン受容体(α_2 AR)の膜貫通領域(TM)1からTM5の末端までと M_3 アセチルコリンレセプター(M_3 R)の第3細胞内ループの始めからTM7までからなるキメラ i、または、 α_2 ARのTM6からTM7までと M_3 RのTM1から第3細胞内ループまでからなるキメラ ii をそれぞれ単独で発現させた場合、アドレナリン、アセチルコリンに対する応答は見られない。しかし、キメラ i と ii を共発現させると応答能が回復する[38]。この応答能の回復はキメラ i と ii がドメインスワッピングによりダイマーを形成することで分子間にリガンド結合サイトが再形成されたためと解釈されている[36, 37]。また、 AT_1 Rのアンジオテンシン結合サイトの一つであるLys¹⁰²(TM3)をAlaに置換した変異体と、同様に結合サイトであるLys¹⁹⁹(TM5)をAlaに置換した変異体は、単独で発現させるとリガンド結合能を持たないが、共発現させるとリガンド結合能が回復する[39]。この実験結果もドメインスワッピングを支持するものとされている。しかし、後述するドメインコンタクトとは異なり、ドメインスワッピングによる会合状態が直接観察されたとの報告は無い。ホモダイマーのドメインスワッピングについては分子内結合が分子間結合に置き換わることで生じるとの説明が可能である。しかし、ヘテロダイマーにおいても分子内結合を形成していた残基のペアが、異なる分子間でも等価なペアに置き換わりうるかどうか議論の余地がある。また、等価な構造の変換という観点からは、オリゴマー化のメカニズムをドメインスワッピングによって説明することは困難である。ドメインスワッピングによって複合体が形成されたことを示唆する実験例は、ドメインコンタクトの報告に比べ少ないこともあり、このメカニズムが一般的なものなのかどうかは今後明らかにされるものと考えられる。

一方、ドメインコンタクトはモノマーの大きな立体構造変化を伴わずにインターフェイスを形成するメカニズムで、3つの例が報告されている[8]。ここではそれをタイプIからタイプIIIとした。タイプI(図1B)[40-42]はN末端どうしの間での結合によりダイマーを形成するタイプである。例えば、代謝型グルタミン酸受容体などクラ

ス C GPCR 内の幾つかの受容体では、N 末端に存在するシステイン残基による分子間ジスルフィド結合によりダイマーを形成すると報告されている。タイプ II (図 1C) [43] は C 末端どうしで形成される結合によりダイマーを形成するタイプである。代謝型 GABA_B 受容体 (GABA_BR) は、コイルドコイル構造によりダイマーを形成すると報告されている。タイプ III は膜貫通領域を中心とした脂質と接する分子表面をインターフェイスとする (図 1D) [18, 44-46]。AFM を用いてマウスロドプシンオリゴマーが観察され [25, 26]、FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) [40] を用いて mGluR のダイマー化が観察されたが、いずれもモノマー自身の構造は保たれており、タイプ III の会合様式だと考えられる。

現在報告されているタイプ I (図 1B) と II (図 1C) については、ジスルフィド結合もコイルドコイル構造も特徴的な一次配列を持つため、配列情報のみでインターフェイスを予測することができ、予測対象としての重要性は低い。また、mGluR のジスルフィド結合や GABA_BR のコイルドコイル構造を破壊しても複合体は形成されるため [41, 47]、タイプ I やタイプ II の様式で会合する分子についても、タイプ III の様式がダイマー形成に関与していると考えられている。また、タイプ III による会合の報告例が最も多く、タイプ III は GPCR 内で最も重要、かつ、広く使用されていると考えられているため、本研究においては、膜貫通領域を中心とした脂質と接する分子表面をインターフェイスとするものを予測の対象とした。

研究目的

本研究では GPCR がオリゴマー化する際のインターフェイス予測を行なった。予測手法開発に際して、上述のどの会合様式を前提とするかが、まず始めに問題となる。ドメインスワッピングによって複合体が形成されたことを示唆する実験例が少ないため、本研究ではドメインコンタクトメカニズムを予測の対象とした。そのうちタイプ I とタイプ II のメカニズムはどちらも特徴的な一次配列を持つことから、配列のみからの予測が可能である。対照的にタイプ III は

特徴的な一次配列を持たない場合が多く、配列のみからの予測は困難であると考えられる。また、クラス A GPCR ではタイプ III によるオリゴマー化の報告例が多いことから、今回の研究では、ドメインコンタクトメカニズムのタイプ III を予測のターゲットとした。

先行研究

これまでにタンパク質間相互作用のインターフェイスを予測する手法が幾つか提案されている。パッチ解析(patch analysis) [48, 49] などのインターフェイスの形状やアミノ酸組成を利用した手法、ニューラルネットワークなどの機械学習を利用した手法[50]、さらに、evolutionary trace (ET 法) [51] を始めとする進化情報を利用した手法が代表的である。しかし、これらの手法を用いて GPCR オリゴマーのインターフェイス予測を行う際には注意が必要である。

パッチ解析[48, 49]は水溶性タンパク質や球状タンパク質どうしの複合体のインターフェイスの観察に基づいている。GPCR は膜タンパク質であるため、膜貫通領域におけるアミノ酸組成がそれらのタンパク質とは異なり、インターフェイスが同様の性質を保持しているとは考えにくい。膜タンパク質どうしで形成される複合体構造のインターフェイスの観察に基づいて同様の解析を行うことは可能であるが、膜タンパク質は結晶化が困難であることから高解像度の立体構造データが少なく、現時点では手法の開発のためには情報量が不十分であると考えられる。

機械学習を使用したインターフェイス予測[50]では、配列または立体構造が保持する特徴と、実験により確認されているインターフェイスの位置を対応付け、学習を行わせる。次に、インターフェイスの位置が同定されていない配列・立体構造を得た場合に、これまでの学習をもとに予測を行う。この場合、大量の配列もしくは立体構造のデータと、実験で確認されたインターフェイスの位置のデータが必要である。タンパク質の種類によっては大量のアミノ酸配列データが入手可能である。しかし、先に述べた構造データの不足に加え、GPCR 複合体研究は実験系の確立自体が困難であることから、

インターフェイスの位置に関する実験データが不足しており、この手法の適用も困難であると考えられる。

ET 法[51]は、タンパク質の機能部位や、タンパク質複合体のインターフェイスを効率良く検出する手法として知られている(図 2-1, 2-2)。この手法はマルチプルアラインメントのサイトからの情報に、分子系統解析の情報と立体構造の情報を組み合わせることによって、生化学的機能の情報を抽出する。まず、解析対象配列と同一の機能を有する配列群を含むファミリーの分子系統樹を作成し、分子系統樹のクラスタリングに従ってアラインメントを幾つかのグループに分割する。このグループ内でのみ保存されているサイト(クラス特異的サイト)とグループをまたいで分子系統樹全体で保存されているサイト(保存サイト)を併せてトレース残基(Trace Residue; TR)と呼ぶ(図 2-1)。各グループに属する配列間の配列一致度の最低値に閾値(Partition Identity Cutoff: PIC)を複数準備し、各 PIC において、その値以上の類似性を示す配列でグループを形成する。各 PIC において、得られたグループに従って、TR の同定が行なわれる(図 2-2)。Madabushi らによると、同じ機能を有するタンパク質ファミリー内では、適当な PIC を選択すれば、この TR の立体構造上での集積は統計的に有意であり、TR が集積する領域と機能部位とは良く一致する[52]。この ET 法を用いて、GPCR のドメインスワッピングを提案したグループに属する Dean らがクラス A GPCR 内のサブファミリー、さらクラス C、D の GPCR ファミリーについて、オリゴマー形成に重要なサイトの予測を行なった[53]。クラス A から C に属するどのサブファミリーにおいても TM5-6 周辺に統計的に有意な機能サイトのクラスタが検出された。さらに、TM2-3 周辺にも規模が若干小さいクラスタが見出された。そして、それらのサイトにおける点変異実験は、多くの GPCR のリガンド結合をはじめとした生化学的機能に影響を及ぼすことから、検出された領域は GPCR に共通のインターフェイスであると結論づけている。

しかし、Dean らの解析結果[53]と合致しない実験例も多い。AFM によって観察されたマウスロドプシンオリゴマーの立体構造では TM5 及び TM6 がダイマー化のためのインターフェイス、TM1 及び TM2

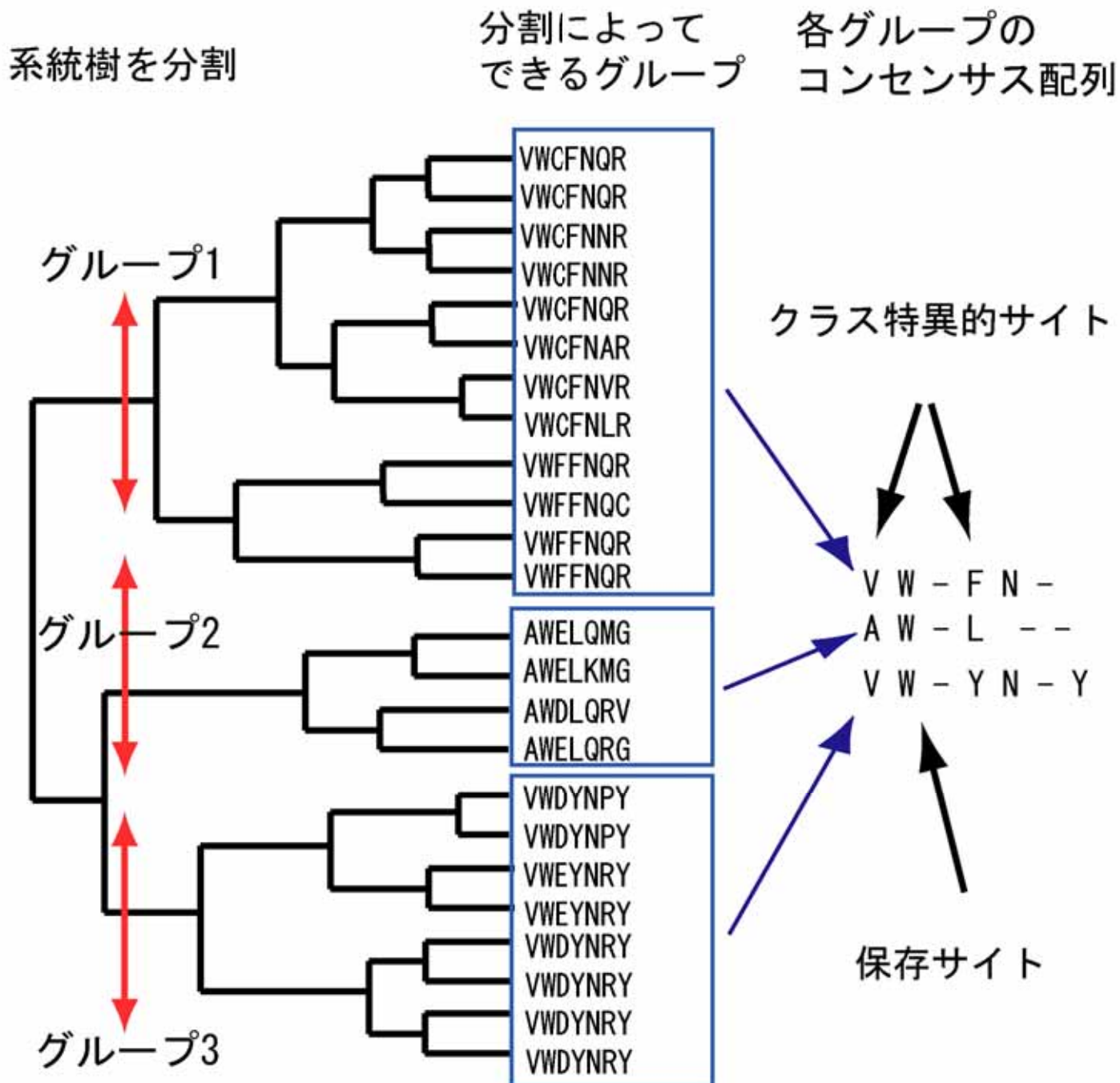
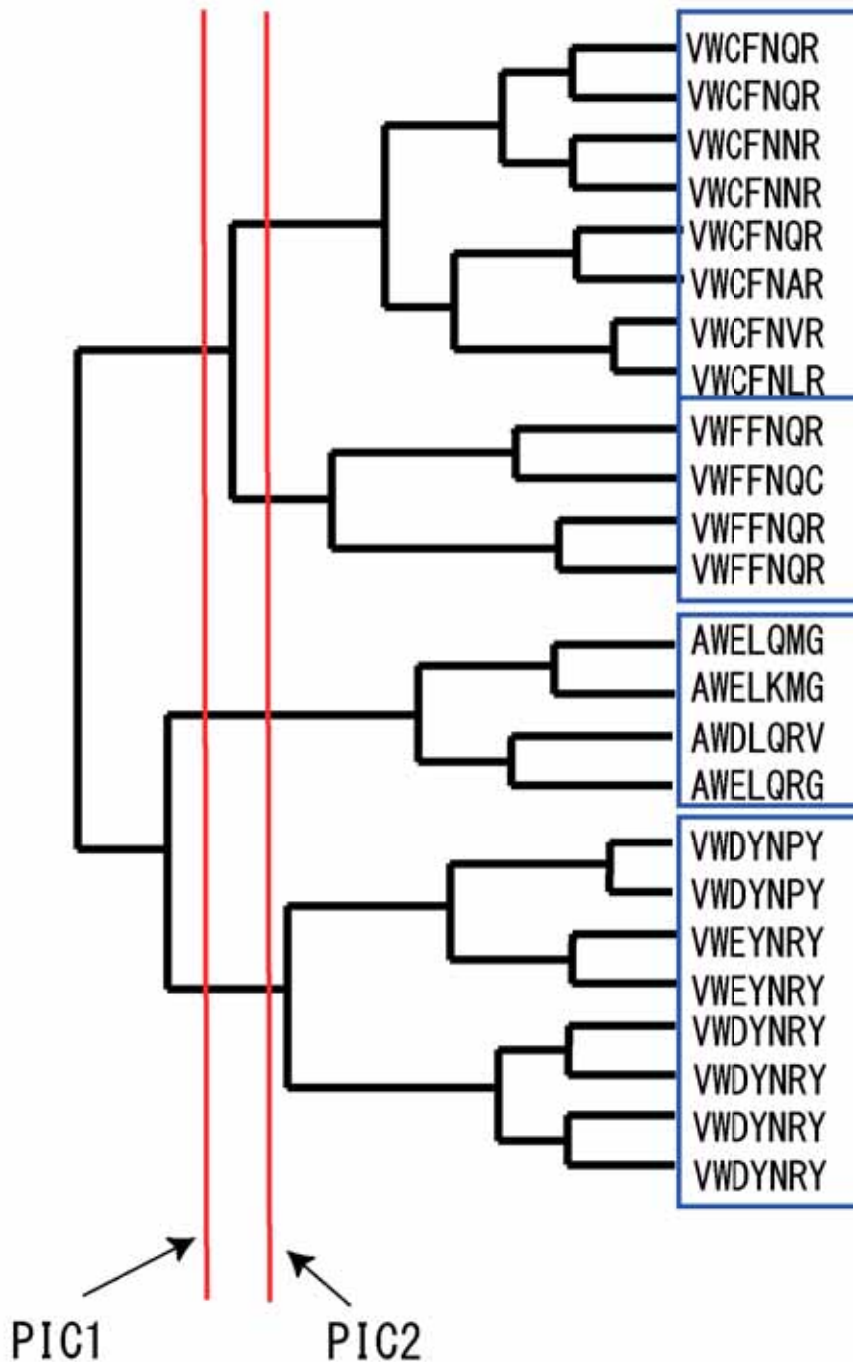


図2-1. evolutionary trace 法(ET法)。

PICをもとにした系統樹のグルーピングに基づき、アラインメントをグループに分割する。各グループにおけるコンセンサス配列を作成し、グループ内でのみ保存されているサイトをクラス特異的サイト、分子系統樹全体で保存されているサイトを保存サイトとし、併せてトレース残基(Trace Residue: TR)と呼ぶ。

PICを変えながら
系統樹を分割

PIC2で分割することによって
できるグループ



PIC1で分割することによって
できる各グループの
コンセンサス配列

V W - F N -
A W - L - -
V W - Y N - Y

PIC2で分割することによって
できる各グループの
コンセンサス配列

V W C F N - R
V W F F N - -
A W - L - -
V W - Y N - Y

図2-2. evolutionary trace 法(ET法)。

各グループに属する配列間の配列一致度の最低値に閾値(partition identity cutoff:PIC)を複数準備し、各PICにおいて、その値以上の類似性を示す配列でのグループを形成する。各PICにおいて、得られたグループに従って、TRの同定が行なわれる。同じ機能を有するタンパク質ファミリー内では、適度なPICを選択すると、このTRの立体構造上での集積は統計的に有意であり、TRが集積する領域と機能部位とは良く一致する。

がオリゴマー化のためのインターフェイスとなっている[25, 26]。TM5とTM2は正しく予測されているが、TM3とTM6は含まれていない。D₂Rについては、ペプチド阻害実験によりインターフェイスはTM6であると予測されており[44]、この結果はET法によるDeanらの予測結果[53]と一致する。しかし、架橋実験を用いた最近の報告によると、TM4がD₂Rインターフェイスの構成要素であるとされている[45, 46]。このように、これまでに実験によって確認されているGPCRのインターフェイスは必ずしも、ET法による予測結果と一致していない。

ET法による予測結果と実験結果との不一致には幾つかの理由が考えられる。ET法は本来、解析に使用したファミリー内のサブタイプ間で機能部位の位置が変化しないことを仮定している。この仮定のもとでは、サブタイプごとに異なる位置にある機能部位を検出することはできない。また、サブタイプ内もしくはサブファミリー内の不変残基のみをTRと見なしていることも問題である。不変残基のみではサブタイプ特異的なインターフェイスを検出できない。例えば、オピオイド受容体には、 δ 、 κ 、 μ 、 σ 、 ε の5つのサブタイプが知られているが、このうち、 δ - κ 、 δ - μ の二組はヘテロダイマーを形成するが、残りの κ - μ の組み合わせではダイマーを形成しないことが確認されている[54-58]。ソマトスタチン受容体サブタイプ5はソマトスタチン受容体サブタイプ1とはヘテロオリゴマーを形成するが、ソマトスタチン受容体サブタイプ4とは形成しないことが確認されている[59]。また、FRETにより観察されたmGluRのダイマー形成時には、TM2及びTM3やTM5及びTM6ではなく、TM4どうしが最も近接している[40]。George[60]らは、ペプチド阻害実験により、D₁RのインターフェイスとD₂Rのインターフェイスが異なることを報告している。さらに、Soyer[61]らは、クラスA GPCRsに属するアミン受容体の分子表面にある保存サイトがサブタイプごとに異なることを示し、これをもとにアミン受容体がオリゴマー化する際のインターフェイスはサブタイプごとに異なるであろうと予測している。以上のことから、少なくともクラスA GPCR内では、同じ分子をリガンドとするサブファミリー内であっても、サブタイプごとに異なる

会合様式を有しており、結果として異なるインターフェイスを有していることが示唆される。もう一つの問題として、ET 法では各アラインメントサイトを評価する際、不変サイトのみを保存サイトとして扱うことがあげられる。しかし、不変サイトのみで評価することは、保存の評価基準としては問題を含んでいる。性質の類似した別の残基に置換される保存的置換を起こしているサイトを無視してしまうからである。また、系統樹作成法自体が抱える問題点とクラスタ同定のエラーのため、一般に系統樹作成手法は万全ではなく、各グループ内には機能的に等価でない配列が含まれている可能性を否定できない。そのような配列が一本でも含まれていた場合、他の配列間では不変サイトであったとしても、多くのサイトが不変サイトとは見なされず、検出感度が低下することになる。

これらの問題点については Dean[53]らも認識しており、共変異解析(Correlated Mutation Analysis: CMA)との併用が予測精度の向上に有効であると提案している[53, 62]。しかし、共変異解析自体の精度の悪さなどから、予測精度はそれほど向上しないと推測される。一方、ET 法が提案されて以来、多くのグループがその関連手法を報告している[52, 61, 63-69]。Madabushi [64]らはサブタイプ特異的な機能部位を検出しようと differential ET を考案した。この手法では、サブタイプ内で検出された TR からサブファミリー全体で検出された TR を取り除くことで、サブタイプ特異的な TR の同定を試みる。従来の ET 法[52]と同じく、立体構造は検出されたサイトのマッピングに利用されているだけであり、十分に活用されているとは言えない。また、保存サイトを不変サイトとしてとらえる点も従来の ET 法の問題点を引きずっている。実際、オプシンファミリーを対象にした解析において、オリゴマー化に寄与するとされる領域を検出できていない。ET で分割を繰り返す方法では、解析に使用されている配列の分配は事前に与えられておらず、インターフェイスが解析しているタンパク質全体で保存していることが仮定されている。これに対し、事前に配列を分類する情報が与えられている時は、その分類に従ってタンパク質を分割し、サイト内の保存が検討される。具体的には分子系統樹のあるサブツリーが基質 A を触媒する酵素の一群

で構成され、別のサブツリーが基質 B を触媒する酵素の一群で構成されているようなケースが考えられる。このような固定した分割に基づく ET 法には、先に述べた differential ET のようにインターフェイスの共通性を仮定しない方法もある。また分割を固定した手法には ET のようなシンボルベースの方法ではなく、スコアマトリクスやサイト特異的頻度を利用して、サイト特異的な分類群間の差を定量的に評価する方法が開発されている。例えば、Hannenhalli と RusseI らは、相対エントロピーを用いてグループ間の機能的差異を特徴づけるアラインメントサイトを検出する手法を開発した[69]。しかし、この手法をインターフェイス予測に適用する場合には、複数のサブタイプのインターフェイスの位置が互いに異なることが分かっている場合にのみ有効である。しかし、クラス A GPCR に属するサブファミリー内では、どのサブタイプ間でインターフェイスが保存されているのか、また、どのサブタイプ間では異なっているのかを事前に知ることはできないため、相対エントロピーを用いた手法が前提とする機能部位の位置の違いを仮定することはできない。以上のような既存の手法が抱える以上の問題点を念頭に置き、GPCR オリゴマーのインターフェイスを予測する手法の開発を行った。

方法

配列情報と立体構造情報

GPCR は配列の類似性をもとに5つ(クラス A-E)に分類されている。このうち膜貫通領域を含むタンパク質全体の詳細な立体構造解析がなされているのは、クラス A に属するウシロドプシンのみである(1F88, 1L9H) [70, 71]。どのクラスに属するタンパク質も7本の膜貫通ヘリックス構造をとる。しかし、異なるクラスに属する任意の2配列間の類似性は小さく、クラス間の進化的類縁関係は不明である。従って、ウシロドプシンの立体構造を他のクラスに属するタンパク質立体構造の鋳型として利用出来るかどうか定かではない。そのため、本研究において開発した手法はクラス A GPCR のみに特化している。

本研究では、解析対象となるサブファミリーのアミノ酸配列と立体構造の情報を組み合わせてインターフェイスの位置を予測した。予測されたインターフェイスの位置を実験的に確認されているインターフェイスの位置と照らし合わせ、予測手法の精度を評価した。評価に用いたのはクラス A GPCR 内の4つのサブファミリーである、オプシンファミリー、ドーパミン受容体ファミリー、アドレナリン受容体ファミリー、そして、ムスカリニックアセチルコリン受容体ファミリーである。配列の類似性・薬理的性質により、ドーパミン受容体ファミリーは5つのサブタイプ(D_1 、 D_2 、 D_3 、 D_4 、 D_5)に、アドレナリン受容体ファミリーは9つのサブタイプ(α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1D} 、 α_{2A} 、 α_{2B} 、 α_{2C} 、 β_1 、 β_2 、 β_3)、ムスカリニックアセチルコリン受容体は5つのサブタイプ(M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 、 M_5)に分類されている。配列情報として、オプシンファミリー163配列、ドーパミン受容体ファミリー86配列、アドレナリン受容体199配列、ムスカリニックアセチルコリン受容体63配列を使用した。これらのファミリーに属するロドプシン [25, 26]、 D_2 ドーパミン受容体 (D_2R) [44-46]、 β_2 アドレナ

リン受容体 (β_2 AR) [18]、 M_3 R [72] では、実験的にインターフェイスの位置が調べられており、予測結果との対応づけが可能である。ロイコトリエン B_4 受容体 (LTB_4 R) についてもペプチド阻害実験を用いてインターフェイスの位置が調べられているが [73, 74]、データベースから取得可能な配列数が少なく十分な精度を保証できる予測ができないため、予測対象からは除外した。ロドプシンについては、ウシロドプシンで X 線立体構造解析像が報告されている [70, 71]。すべてのクラス A GPCR はロドプシンと同じ構造をとると仮定し、この立体構造 (1L9H A 鎖) [71] を各サブファミリータンパク質立体構造の鋳型として利用した。また、特に、オプシンファミリーについての予測結果を評価する際には、AFM によるマウスロドプシンのオリゴマー構造モデル (1N3M) [26] を用いた。

予測方法の概要

本研究では、予測方法の開発にあたり 4 つの仮定をおいた。

- ① ドメインコンタクトメカニズムのタイプ III を予測の対象としたため、インターフェイスは膜貫通ヘリックス領域とその近傍のループ領域の分子表面に位置している。
- ② 個々のモノマーの立体構造において、分子内部に埋もれている残基はオリゴマー化に関与しないため、分子表面に露出している残基のみに着目すれば良い。
- ③ 表面に露出した残基がオリゴマー化に関与しているとすれば、オリゴマー構造を維持するための機能的制約を受け、その残基に対応するサイトは注目するサブタイプ内で保存されていると考えられる。また、インターフェイスにおいて、サブタイプ内で保存されている残基が観測される数は、インターフェイスとして機能しない同じサイズの分子表面において観測される数よりも多いことが期待される。
- ④ オリゴマー化に伴い、モノマー自身の構造は大きく変化しない

これらの仮定に基づき、GPCR の分子表面において保存されている残基の空間分布を調べ、GPCR オリゴマーのインターフェイスを予測する手法を開発した。図 3-1、図 3-2 に方法の概要を示した。この方法の前半は 7 つの手順から構成されている。そのうち 4 つは配列データの前処理 (Box [I]-[IV]) である。残りの 3 つの (Box [V]-[VII]) は立体構造データの前処理である。最後に Box [VIII] で配列情報と立体情報を統合し、立体構造上における保存サイトの分布を二次元平面上で評価した。各ステップの詳細について以下に説明する。

Box [I]: 相同配列の収集 (図 3-1: Box [I])

解析対象タンパク質と相同であるアミノ酸配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI) が提供する blastp [75] を用いて収集した。問い合わせ配列として使用したのは、ヒトの解析対象 GPCR 配列。検索対象データベースは nr とし、できるだけ多くの配列を入手した。

Box [II]: マルチプルアラインメント (図 3-1: Box [II])

入手した配列のマルチプルアラインメントを ClustalX [76] を用いて作成した。視察により明らかな誤りと判定できる領域にはアラインメントエディタである BioEdit [77] を用いて修正を加えた。

Box [III]: 分子系統樹の作成とグルーピング (図 3-1: Box [III])

近隣結合法 (NJ-法) で分子系統樹を作成した。その際、ポワソン分布に基づく補正式を使用し配列間の遺伝的距離を算出した。一カ所でもギャップが挿入されているアラインメントサイトはデータから削除し、系統樹作成には使用しなかった。系統樹作成ツールは Mega2 [78] を使用した。結合する低分子の種類や共役する 3 量体型 G タンパク質の種類を参考にしながら、系統樹上でのクラスタリングに基づき、配列を幾つかのグループに分類した。この分類は幾つかの例外を除き多くのグループは、薬理的性質・生化学的性質に基づいて定義されるサブタイプ分類と一致した。次に、グループごとに再度アラインメントを行い、解析対象配列の立体構造の鋳型とし

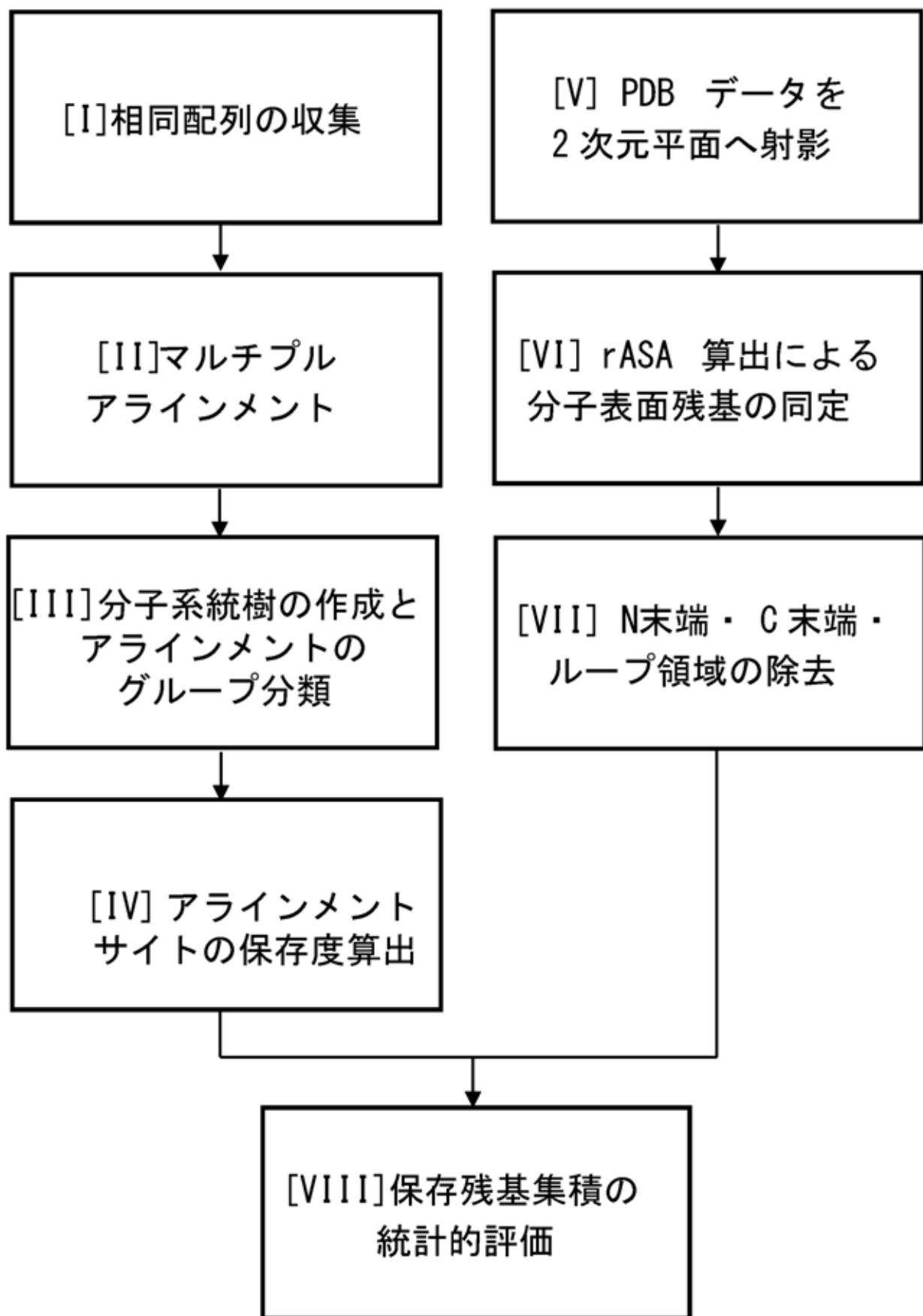


図3-1. 手法の概要1

Box [I]-[IV] で、解析対象タンパク質配列群の全てのサイトにおけるアミノ酸の保存度を算出。Box [V]-[VII] で解析対象タンパク質の立体構造の鑄型として利用する、ウシロドプシン立体構造の前処理を行なう。二つの情報を統合することで、最後に、保存残基集積の統計的評価を行なう。

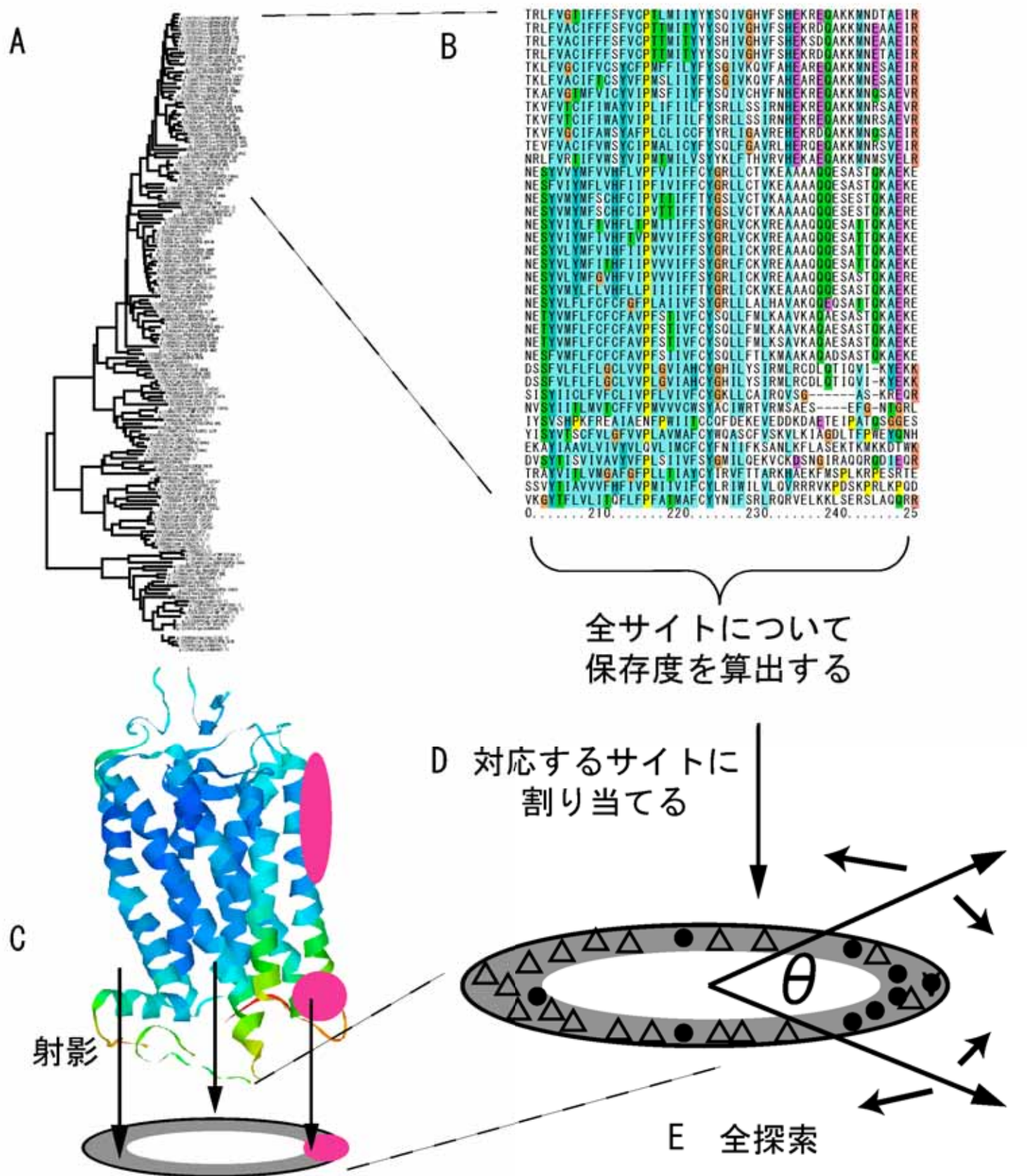


図3-2. 手法の概要2

(A) (図3-1[I]-[III]) 解析対象のサブタイプを含むサブファミリーの配列を用い、分子系統樹を作成。系統樹上のクラスタリングに基づきグルーピングを行う。(B) (図3-1[IV]) 機能的に等価と推定されるサブタイプの配列のみを用いアラインメントした後、サイトごとの保存度を算出。(C) (図3-1[V]-[VII]) すべてのサイトを平面上に射影し、N末、C末、ループ領域を取り除く。(D) (図3-1[V-VII]) 保存度をウシロドプシンの対応するサイトに割り当てる。(E) (図3-1[VIII]) セクターを定義し保存サイトが集積している領域を探索する。

て使用するウシロドプシンの配列に対しアラインメントした。我々の手法においては、ET[51]のように繰り返しグルーピングを行うのではなく、分割を一カ所で固定した。

Box[IV]: 保存度の算出(図 3-1:Box[IV])

アラインメントサイトの保存傾向を定量的に評価するために、各アラインメントサイトの保存度を算出した。アラインメントサイト i における保存度 ($Cons(i)$) は以下の式[79]で算出した。

$$Cons(i) = \frac{\sum_j^N \sum_{k>j}^N W_j W_k Mut(s_j(i), s_k(i))}{\sum_j^N \sum_{k>j}^N W_j W_k}$$

$$Mut(a,b) = \begin{cases} \frac{m(a,b) - \min(m)}{\max(m) - \min(m)}, & \text{if } a \neq \text{gap and } b \neq \text{gap} \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}$$

ここで $m(a, b)$ は膜タンパク質用に算出された PAM250 行列[80]中の、アミノ酸残基 a と b との間のスコアである。 W_j は配列 j 由来の情報に対する重みであり、系統的偏りの補正に用いられる。この重みは Henikoff-Henikoff の方法[81]で算出した。算出された保存度は 0 から 1 までの値を取り、1 に近づけば近づくほど、そのアラインメントサイトはより保存されている (Box[IV])。スコアが設定した閾値以上の値である場合、そのアラインメントサイトは保存されていると見なした。この閾値の設定方法については後述する。各アラインメントサイトにおいて算出されたスコアは、ウシロドプシン立体構造 (1L9H A 鎖) [71] の対応する残基に割り当てた。

なお、今回の $m(a, b)$ の算出法では、JTT94 の log-odds スコアを線形に [0:1] に射影して使用したため、完全保存のサイトであっても、必ずしも $Cons(i)$ は 1 にならない。JTT94 を使用した場合、スコアが最大値 1 となるのは Glu で保存した場合であり、他のアミノ酸どう

しが一致した場合は1にならない。これをナイーブな保存度の性質と反すると考える場合には、Karlinらが提案した補正方法

$$Mut(a,b) = \frac{m(a,b)}{\sqrt{m(a,a)}\sqrt{m(b,b)}}$$

を用いて正規化することも考えられる。しかし、予備的な解析を行った結果、検出されてくる領域はほぼ共通であったため、本研究においてはスコアを線形に射影する算出法を採用した。また、このことは、膜貫通領域に出現する頻度が高いアミノ酸の保存よりも、出現する頻度が低いアミノ酸の保存のほうが進化的に重要という考え方に基づいている。

Box[V]: 3次元座標データの2次元平面への射影(図3-1:Box[V]、図4)

上述のように、オリゴマー化に寄与する残基は保存され、3次元立体構造上のインターフェイス領域に集積していると考えられる。しかしながら、理由はBox[VIII]で記すが、立体構造上で保存残基の集積の統計的有意性を評価するのは困難である。GPCRの分子表面における保存残基のクラスタを検出するために、次のようにGPCRの立体構造を単純化して表現した。ロドプシンのモノマー構造を、膜平面に対し垂直な円柱とみなした。すなわち、ロドプシン構造(1L9H A鎖)[71]の長軸が、膜平面に対しほぼ垂直に位置すると考えた。このとき、インターフェイス残基はこの円柱の外壁部分に存在すると考えられる。円柱を構成するすべての残基を、長軸と垂直な平面上に射影したとすると、射影された残基は円盤状の分布を示す。このとき、インターフェイス残基も同様に射影され、リング状の分布内のある区画に集中して存在することが期待される。そこで以下のような処理を行った。まず、ウシロドプシンPDBデータ(1L9H A鎖)[71]の340残基について、側鎖の幾何重心の座標を計算し、それぞれのx、y、z座標を用いて主成分分析を行った。すなわち、x、y、z座標間の3×3の分散共分散行列についての固有値問題を解いた。ウシロドプシン立体構造の特徴から、第一主成分軸は膜平面に対しほぼ垂直であると考えられる。主成分分析においては、第二主成分軸、第三主成分軸はどちらも第一主成分軸と直行するように設定されるため、第二主成分軸、第三主成分軸によって定義される平面は膜平面に対してほぼ垂直であることが期待される。ここで定義された平面上に全残基を射影し、この2次元平面上のプロットを以下の解析で使用した。

Box[VI]: 内部残基と外部に露出した残基の同定(図3-1:Box[VI])

上述のように、今回開発した予測法では、ドメインコンタクトメカニズムのタイプIIIを予測の標的としている。そのためモノマーにおいては予測されるべきインターフェイスは分子表面に露出して

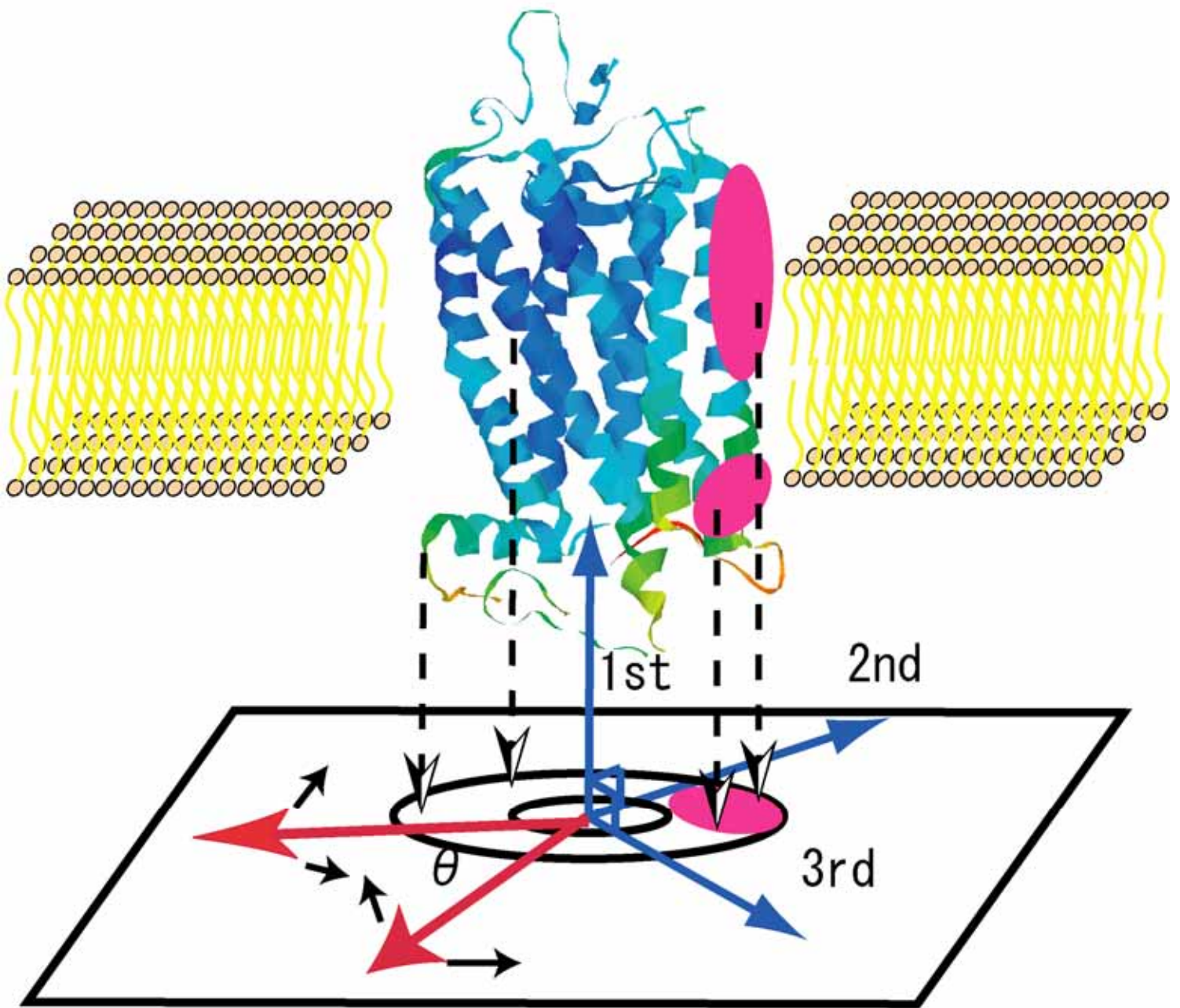


図4. 3次元座標データの2次元平面への射影。

第一・第二・第三主成分軸が青矢印で示してある。3つの軸の交点はウシロドプシンの重心の平面への写像である。円柱に見立てた構造の外壁部分の写像が平面におけるリングである。立体構造上では2つに分離したインターフェイスが平面上へ射影され、平面上では1つに凝縮されているのがわかる。膜平面に平行な平面を定義するために使用した主成分軸を青矢印で、セクターを定義するために設定した2つのベクトルを赤矢印で示した。セクターの内角、ベクトルの向きを変化させることで複数の異なるセクターを作り出し、全探索を行なった。

いることが期待されるため、分子内部に埋もれている残基を取り扱うデータから除去できる。逆に、分子内部の残基を取り除かずに予測を行った場合、リガンド結合に関与するサイトや立体構造の維持に重要なサイトがより多く検出される可能性が高い。そこで、円柱の外壁部分の写像に相当するリング状の分布だけに着目した。このとき、インターフェイス残基もリング状の分布内のある区画に集中して存在することが期待される。そのため、相対溶媒露出表面積 (relative Accessible Surface Area: rASA) を算出し、設定した閾値以上の rASA を持つ残基のみを取り扱うこととした。rASA の算出には NACCESS [82] を使用した。ただし、ここで設定する閾値が問題となる。例えば、Dean [53] らは $rASA \geq 5\%$ を満たす残基を表面残基と定義し、ET 法 [51] を適用した。この基準は分子表面を定義するための閾値としては比較的小さな値である。その結果、検出された残基にはリガンド結合サイトなどの分子内部に位置する残基が多く含まれていた。そこで閾値設定の指針を得るために、マウスロドプシンオリゴマー構造 (1N3M) [26] のインターフェイスを参考にした。モノマーの rASA からオリゴマー時の rASA を引いた値を $\Delta rASA$ とし、 $\Delta rASA$ が 1% 以上の残基をインターフェイス残基と定義した。マウスロドプシン (1N3M A 鎖) [26] のインターフェイス残基の数は 32 であり、そのうち、31 残基 ($31/32=0.968$) の rASA は 25% 以上であった。唯一、74Y の rASA のみは 18.4% であったが、残りの残基の rASA は 25% 以上であったため、インターフェイス形成に寄与しうる表面残基を選択する rASA の閾値を 25% に設定した。内部残基と外部残基の判別のための $\Delta rASA$ の算出にはウシロドプシンモノマーの立体構造 (1L9H A、B 鎖) [71] を使用した。どちらかの鎖での $\Delta rASA$ が 25% 以上であれば、外部残基と見なした。残基の選択や処理には RasMol [83] と Swiss-PDB Viewer [84] を使用した。

Box [VII]: インターフェイス候補残基の同定 (図 3-1: Box [VII])

本解析においては、ドメインコンタクトメカニズムを予測の対象とした。既に述べたように、このメカニズムは 3 つのタイプに分類されるが、クラス A GPCR で報告されているのはタイプ III のみであ

る。また、今回解析対象としたクラス A GPCR の多くは、その N 末端領域や C 末端領域にタイプ I やタイプ II を特徴づける配列を持たない。従って、本解析においてはそれらの末端領域を無視できるものと仮定した。加えて、細胞内ループ領域は 3 量体型 G 蛋白質と相互作用するため、高度に保存された残基が集積している。それゆえ、細胞内外のループ領域を除去すれば、保存に基づくインターフェイス残基検出の感度を高めると期待される。そこで以下の手続きを行った。まず、膜貫通ヘリックス領域に隣接する 3 残基を残すが、それ以外の細胞内外のループ領域を除外した。膜貫通ヘリックス領域に隣接するループ領域の 3 残基については、視察に基づき各残基の C_{α} から見た側鎖の方向がロドプシンの外側に向いていればインターフェイス形成に寄与する可能性があるため解析データに残し、内側を向いていればデータから除外した。ここまでの処理で選択された残基群をインターフェイス候補残基とした。最終的な候補残基は、表 1 に記載した。

Box [VIII]: *ad hoc* なスコア関数に基づく保存残基の統計的評価 (図 3-1: Box [VIII])

残基の 2 次元平面への射影と残基の集積の統計的評価は、我々の方法の中心をなしている。ET 法 [51] では、系統樹上で枝のクラスタリングをもとに配列のグルーピングを繰り返し、その度に立体構造上での TR の集積が評価される。その際、解析に使用されるファミリー内でインターフェイスの位置が変化しないことを前提としているため、ファミリー内の配列全体から TR が抜き出される。そのため、ファミリー内であっても会合様式が変化しており、結果としてインターフェイスの位置が異なる場合、誤った予測結果を導くことになる。これに対し、我々の方法では、系統樹上における配列のグルーピングをサブタイプに相当するグループに固定しインターフェイス構成残基の予測を行ったために、ET 法のようにファミリー内でインターフェイスが保存されていることを仮定する必要がない。そのため、サブタイプごとに異なるインターフェイスも予測することが可能である。クラス A GPCR では、同じリガンドを結合するサブファミ

表 1. インターフェイス候補残基の残基番号

35	38	39	45	46	49	50	52	56
60	63	85	88	92	96	99	108	112
133	136	150	151	152	154	155	162	172
173	174	175	201	205	213	214	217	220
221	223	225	228	252	259	263	266	267
273	274	277	286	287	290	308	321	

リー内であっても、異なるインターフェイスを有することが示唆されているため、GPCR のインターフェイス予測に関しては、サブタイプに相当するグループに分割を固定したほうが有利であると予想される。ただし、サブタイプに相当するグループ内で得られる保存サイトの数が少なく、立体構造上で保存サイトの集積を評価することは困難である。さらに、今回解析の対象としたドメインコンタクトメカニズムでは、インターフェイス形成に寄与する保存サイトの集積場所が複数に分散されるケースも考えられる。つまり、円柱に見立てたロドプシン立体構造を、その長軸方向から眺めた場合には保存サイトが集積しているように見えたとしても、実際には、膜貫通領域の細胞内側と細胞外側の二カ所にインターフェイスが分離していることも考えられる(図4)。そのような場合、保存サイトの集積場所を探索するのは、容易ではない。予測すべきインターフェイスの形状・個数が分からないからである。そこで、保存サイトの集積を統計的に評価するために、すべての残基を先に定義した2次元平面上へ射影した(図4)。こうすれば、立体構造上では細胞内側と細胞外側に分離しているインターフェイスが平面上では一つにまとめられ、取り扱いが容易になる。しかしながら、立体構造上離れた位置関係にあるサイトを平面上の狭い領域に射影したことにより、保存サイトが偶然集められてしまう可能性がある。この可能性を否定するために、観測された個数以上の保存サイトが偶然得られる確率(p_{θ})を算出した。 p_{θ} の算出方法については後述する。

Box[I]から[VII]までで得た情報をもとに、図4に示されているリング状の領域において、保存サイトの集積が統計的に有意な領域を同定した。最初に、リング状の分布の中心を次のように決定した。全ての残基の側鎖の幾何重心の平均を算出することでタンパク質の中心座標を決定した。次に、第二主成分軸と第三主成分軸とで定義される平面上にタンパク質の中心座標を射影した。射影された点は、以後、リング状分布の原点として使用される。原点からリングの外側に向けた2本のベクトルを設定し、ベクトル間の領域のうち、ベクトル間の角度(θ)が小さいほうをセクターとして定義した。ベクトルの長さは、セクター内に射影された全ての点が含まれるのに十

分な長さとした。それぞれのセクターを評価するために、次の関数を用いて評価した。

$$f = \frac{\sum_{j=1}^m C_j}{\theta p_\theta}$$

ここで、 m はセクター内で観測された保存サイトの個数である。各アラインメントサイトの保存度が、設定した閾値(C_t)以上であれば、そのサイトは保存していると見なした。 C_j はアラインメントサイト j の保存度である。セクター内に観測される保存サイトの個数は二項分布に従うという仮定のもとで、保存サイトの個数が偶然に m 個以上になる確率 p_θ を次のように計算した。

$$p_\theta = \sum_{i=m}^{X_\theta} \frac{X_\theta!}{i!(X_\theta - i)!} \left(\frac{n}{N}\right)^i \left(\frac{N-n}{N}\right)^{X_\theta - i}$$

ここで、 N はインターフェイス候補領域に含まれる全てのサイト数、 n はインターフェイス候補領域に含まれる保存サイト数、そして、 X_θ はセクター内に含まれる全サイト数である。保存サイトがリング状の領域内において一様に分布しているとの仮定の下で、インターフェイス候補領域に存在する N 個のサイトから、ランダムに1つのサイトが選ばれた場合に、そのサイトが保存している確率は (n/N) である。次に、 N 個のサイトから X_θ 個のサイトを選択することを考える。上式は二項分布の式に由来している。もし、 p_θ が十分に小さい場合、セクター内の保存サイトの集積は統計的に有意であると考え。ここでは有意水準として 5%を使用した。なお、評価関数 f 値は次の 3

条件を満たすように設計した。(1) インターフェイス領域を特定するため、できるだけ狭い(θ が小さい)セクターを選択する。(2) 保存サイトの保存度の和ができるだけ大きいセクターを選択する。(3) p_θ ができるだけ小さいセクターを選択する。

2本のベクトルを原点の周りに 10° 刻みで回転させることでセクターの向きを変えた。また、2本のベクトルの間の角度、すなわちセクターの中心角 θ を 20° から 180° まで 10° 刻みで変化させることでセクターの広さも変化させた。また、アラインメントサイトを保存サイトと非保存サイトとに区別するための閾値 C_t も 0.5 から 1.0 まで 0.1 刻みで変化させた。セクターの広さ・向き・ C_t を変えるごとに p_θ を算出し、 $p_\theta < 0.05$ を満たすときのみ、 f 値の計算を行った。このとき、 f 値が最大になるセクターをインターフェイスに対応する領域と見なし、この領域に含まれる残基をインターフェイス残基とした。インターフェイス残基の中には、保存されている残基だけでなく、保存されていない残基も含まれている。

結果

サブタイプにおける配列の多様性

本研究では、クラス A GPCR に属する 4 つのサブファミリー内のサブタイプについて、アラインメントサイトを保存サイトと非保存サイトに分離した。しかしながら、サブタイプ内の配列どうしの類似性が高すぎる場合、機能的な制約がかかっていないサイトも保存されていると見なされてしまい、保存サイトと非保存サイトにおける保存度の差は機能的制約を反映しない可能性がある。そこで、分子系統樹上でのグルーピングによって作成されたグループ内の配列が十分に多様であるか否かの検討を行った。まず、解析対象としたグループごとに、最も遠い進化的関係にある 2 配列間の配列一致度 (Lower Bound of Percent Identity: LBPI) を算出した (表 2)。すなわち、グループ内の配列の全ての組み合わせで配列一致度を算出し、最も小さな値を選択した。オプシンファミリーでは 37%、ドーパミン受容体ファミリーでは 44~61%、アドレナリン受容体ファミリーでは 40~70%、アセチルコリン受容体ファミリーでは 73~95%であった。ET 法 [51] では分子系統樹が PIC を基準にして分割され、配列がグルーピングされる。グループ内・グループ間での保存を指標に TR が同定され、立体構造上にマッピングすることで TR が集積している場所を探索する。PIC を基準とした分子系統樹の分割と配列のグルーピングは、PIC の閾値を変更することで繰り返し行われ、最も TR の集積が顕著な分割を探す。Lichtarge [51] らが TR の集積が顕著な PIC の閾値を探索したところ、SH2 ドメインと SH3 ドメインでは 70~75%、核内ホルモン受容体では 50~60%であった。SH2 ドメインのサブファミリーを解析する際には 50%、SH3 ドメインのサブファミリーを解析する際には 65%が使用されている。同様に、Dean らによる GPCR の解析では、70~80%が使用されている。ET 法 [51] における PIC はグループ内の LBPI の上限を与えており、本研究におけるグループ内での

表 2. 各グループ内で最も遠い進化的関係にある 2 配列間の配列一致度 (Lower Bound of Percent Identity: LBPI)

	Lower Bound of Percent Identity (LBPI)
Opsin	37.4%
α_1 adrenergic receptor	45.6%
α_{2A} adrenergic receptor	64.7%
α_{2B} adrenergic receptor	40.4%
α_{2C} adrenergic receptor	57.6%
β_1 adrenergic receptor	54.5%
β_2 adrenergic receptor	54.5%
β_3 adrenergic receptor	70.1%
$D_{1/5}$ dopamine receptor	47.9%
D_2 dopamine receptor	45.5%
D_3 dopamine receptor	56.8%
D_4 dopamine receptor	43.8%
M_1 acetylcholine receptor	95.1%
M_2 acetylcholine receptor	80.4%
M_3 acetylcholine receptor	80.4%
M_4 acetylcholine receptor	82.0%
M_5 acetylcholine receptor	72.5%

LBPI は Lichtarge [51] や Dean [53] らが定義した PIC と同等の概念である。表 2 に示した LBPI の多くは 70%未満におさまっており、ET 法 [51] で使用されている PIC と同程度かそれ以下である。それゆえ、4 つの GPCR サブファミリー (オプシンファミリー、ドーパミン受容体ファミリー、アドレナリン受容体ファミリー) 内で作成されたグループ内の配列は十分変化に富んでおり、保存されているサイトは機能的制約を反映しているものと考えられる。唯一、アセチルコリン受容体ファミリー内のサブタイプの LBPI は ET 法で使用されている PIC を大きく上回っている (73~95%) が、あえて解析を行った。それゆえ、アセチルコリン受容体ファミリーについて予測されたインターフェイスの信頼度は他のサブファミリーに比べ低い可能性がある。

オプシンファミリーについての予測

“方法” で述べた予想通り、第一主成分は膜平面にほぼ垂直と思われる方向にあった。 f 値をセクターの位置の関数としてプロットし、図 5A に示した。セクターの位置は以下のように定義した。セクターの中心は、ロドプシン立体構造の中心を、第二主成分軸と第三主成分軸とで定義される平面上に射影した点である。第二主成分軸、第三主成分軸はこのセクターの中心を通る。2 本のベクトルをこの点からのばし、ベクトルによって形成される狭いほうの領域をセクターとして定義する。今、セクターを定義する 2 つのベクトルの平均ベクトルをセクターの中心から伸ばし、このベクトルの第二主成分軸からの角度 (δ) をセクターの位置として使用した。図 5A の横軸はセクターの位置 (δ) を示している。このように、異なる θ 、 C_t を持つセクターが同じ位置 (δ) に存在する。縦軸は f 値であるが、 $p_\theta \geq 0.05$ の場合は f 値が計算されていないためプロットされていない。 f 値の最大値を図中に黄色の矢印で指し示した。 f 値が最大値を取るセクターはインターフェイスを形成する分子表面から射影された残基を含むと考えられる。以後、選択されたセクターに含まれる全てのインターフェイス候補残基を“インターフェイス残基”と呼ぶ。 f 値、 p_θ 、 C_t を表 3 に示した。オプシンファミリーにおける解析の場合、0.80

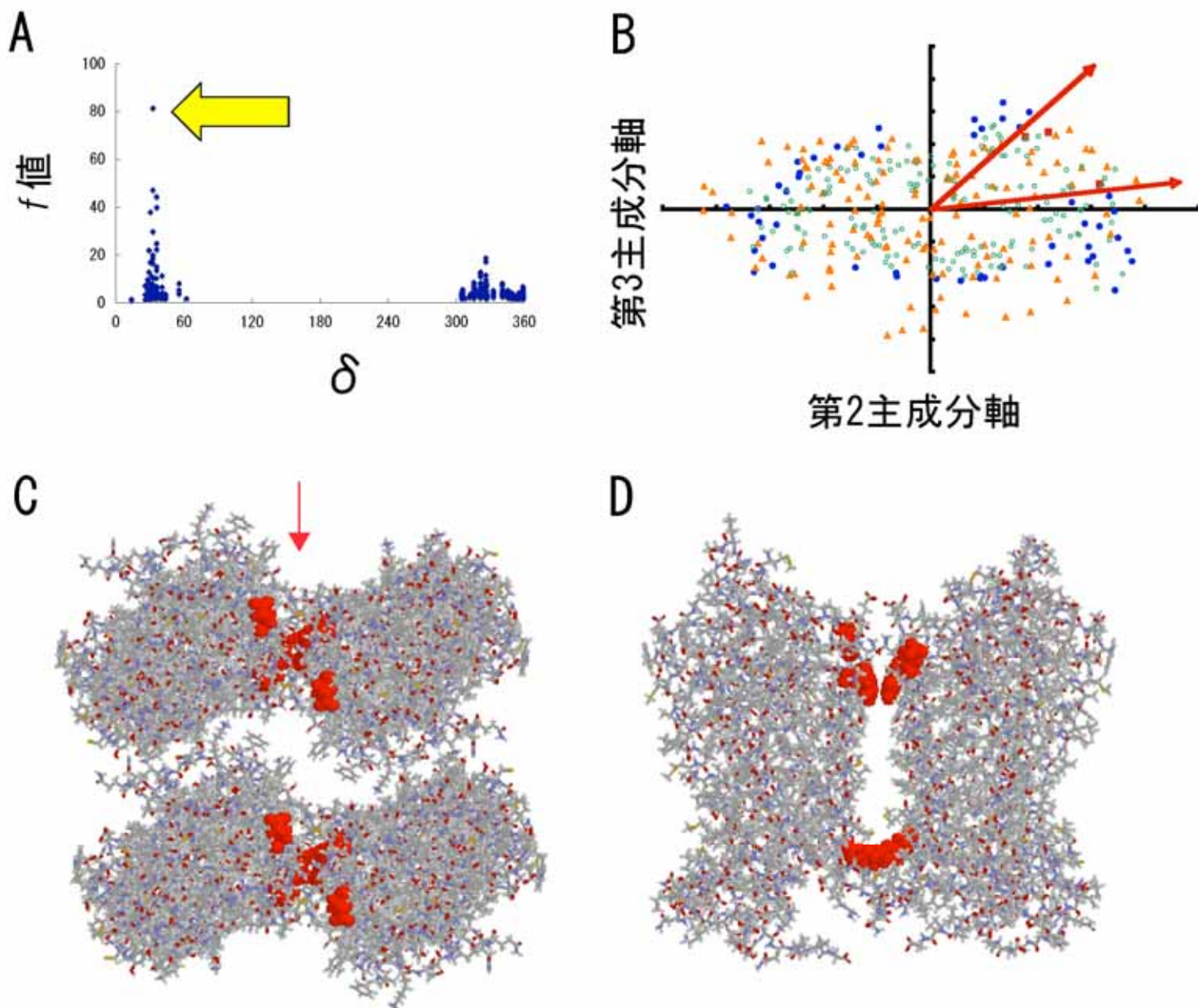


図5. オプシンファミリーについての予測結果。

(A) 第2主成分軸からの角度(δ)に対してプロットされた f 値。 f 値の最大値を黄色の矢印で指し示した。(B) 第二・第三主成分軸によって定義された平面上への、ウシロドプシン座標の写像。 p_{θ} の算出にはセクター内の残基(■)とそれ以外の分子表面残基(●)を使用した。ループ残基(Δ)と内部残基(\circ)はインターフェイス候補残基の絞り込み過程で除去されている。(C), (D) マウスロドプシンオリゴマー構造上にマッピングされた予測されたインターフェイス残基。細胞外から見た図(C)と図(C)の赤矢印(\downarrow)方向から見た図(D)

以上の保存度を持つアラインメントサイトを保存サイトとした。中心角が 40.0° のセクター内には 3 つの残基が含まれ、そのうち 0.80 以上の保存度を持つのは 3 残基であった。その 3 残基がこのセクター内に偶然に集積する確率 (p_θ) は 0.0008 で、そのときの f 値は 81.33 であった。図 5B は、ロドプシンモノマーの全残基を第二主成分軸と第三主成分軸で定義される平面上に射影した図である。セクター内のインターフェイス候補残基を赤色の四角 (■)、それ以外の分子表面残基を青色の丸 (●) で示した。このセクターが最大の f 値を取るため、結果として、図 5B に赤色の四角で示したプロットがインターフェイス残基に相当する。さらに、図 5C と図 5D には、予測されたインターフェイス残基をマウスロドプシンのオリゴマー構造上に赤色の空間充填モデルで表示した。この細胞外からの像により、予測されたインターフェイス残基はロドプシン 2 分子間のインターフェイス部分に位置していることが分かる。予測されたインターフェイス残基の詳細は表 3 に示した。

ドーパミン受容体ファミリー、アドレナリン受容体ファミリー、ムスカリニックアセチルコリン受容体ファミリーについての予測

クラス A GPCRs ファミリー内のサブファミリーであるドーパミン受容体ファミリー、アドレナリン受容体ファミリー、ムスカリニックアセチルコリン受容体ファミリーについても、同様の解析を行った。ドーパミン受容体ファミリーは 5 つのサブタイプ (D_1 、 D_2 、 D_3 、 D_4 、 D_5)、アドレナリン受容体ファミリーは 9 つのサブタイプ (α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1C} 、 α_{2A} 、 α_{2B} 、 α_{2C} 、 β_1 、 β_2 、 β_3)、ムスカリニックアセチルコリン受容体ファミリーは 5 つのサブタイプ (M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 、 M_5) に分類されているが、それらの多くがホモオリゴマーとヘテロオリゴマーの少なくとも一方を形成することが報告されている [8-14]。それらのうち D_2R [44-46]、 β_2AR [18]、 M_3R [72] では、相互作用に関与する残基、もしくはインターフェイスが実験によって示唆されているため、我々の予測結果と照らし合わせ、予測法の評価を行うことができる。

表 3. 予測された残基。各サブタイプごとに、インターフェイスが予測された時の f 値、 p_{θ} 、 C_t と予測された残基が示されている。残基番号はウシロドプシン配列における対応する残基番号であり、アミノ酸はヒト配列のものを記載した。

タンパク質名	f 値	P_{θ}	C_t	インターフェイス残基
Opsin 1 回目	81.33	0.0008	0.8	152H 175W 201E
D ₂ R 1 回目	6.357	0.0344	0.5	149K 150R 151R 153T 154V 161V 172F 173G
β_2 AR 1 回目	7.812	0.0133	0.6	244Y 249Q 273K 280G 284L 287L 288P 295V 308Y
M ₃ R 1 回目	3.634	0.0329	0.5	164F 167Y 183K 184R 186G 187V 194V 206F 207W 358G 362R 370K 371L
Opsin 2 回目	32.254	0.0037	0.5	136Y 213I 217I 220F 221F 223Y 225Q 228F 252R 259I 266L 267L 273F 274Y 277T

ドーパミン受容体ファミリーの NJ-法による分子系統樹と各グループの予測結果を図 6A に示した。分子系統樹上でのグループはドーパミン受容体ファミリーのサブタイプ分類にほぼ一致しているため、以後サブタイプ名で記す。D₁R と D₅R は明確に分離することができなかったため、一つのサブタイプとして扱うこととした。以後、D_{1/5}R と記載する。図 6A の分子系統樹の右端に予測結果を表示した。予測されたインターフェイス残基をマウスロドプシンオリゴマー構造の A 鎖 (1N3M A 鎖) [26] 上に赤の空間充填モデルで表示した。いずれもモノマーの構造を細胞外から見た図である。D₂R では実験によりインターフェイスが示唆されている [44-46]。そこで、予測されたインターフェイスとの比較を行った。図 6A に示した D₂R の予測されたインターフェイスを拡大し、図 6B に示した。赤の空間充填モデルで表示された残基が予測されたインターフェイス残基である。表 3 に示したように Lys¹⁴⁹, Arg¹⁵⁰, Arg¹⁵¹, Thr¹⁵³, Val¹⁵⁴, Val¹⁶¹, Phe¹⁷², Gly¹⁷³ が検出されたが、これらの残基はすべてマウスロドプシンの TM4 に対応するサイトに位置していた。D₂R では TM4 がホモオリゴマー化のためのインターフェイスだとする研究グループ [45, 46] と TM6 がインターフェイスだと主張する研究グループ [44] とがあり、我々の結果は前者の主張と一致している。図 6C に、図 6B と同じ配向で TM4 を青の空間充填モデルで表示させた。TM4 の分子表面と我々の予測結果が一致していることが分かる。同様に、D₃R、D₄R、D_{1/5}R についても予測を行った (図 6A)。これらのサブタイプについてはインターフェイスの位置についての実験データが存在しないため、予測精度の検証はできない。しかし、D₂R の TM6 がインターフェイスだと主張しているグループ [44] が、ペプチド阻害実験により D₁R でも同様のインターフェイスが保存されているか否かの検証を行った。その結果、どの領域がインターフェイスとして機能しているのかは依然として不明だが、D₁R の TM6 は少なくともホモオリゴマーのインターフェイスではないと報告している [60]。図 6A から分かるように、D₃R のインターフェイスは D₄R のインターフェイスと同じである。しかし、D_{1/5}R のインターフェイスは、D₃R や D₄R とだけでなく、D₂R とも異なっている。D₂R 以外のサブタイプについて予測されたインターフェイス残

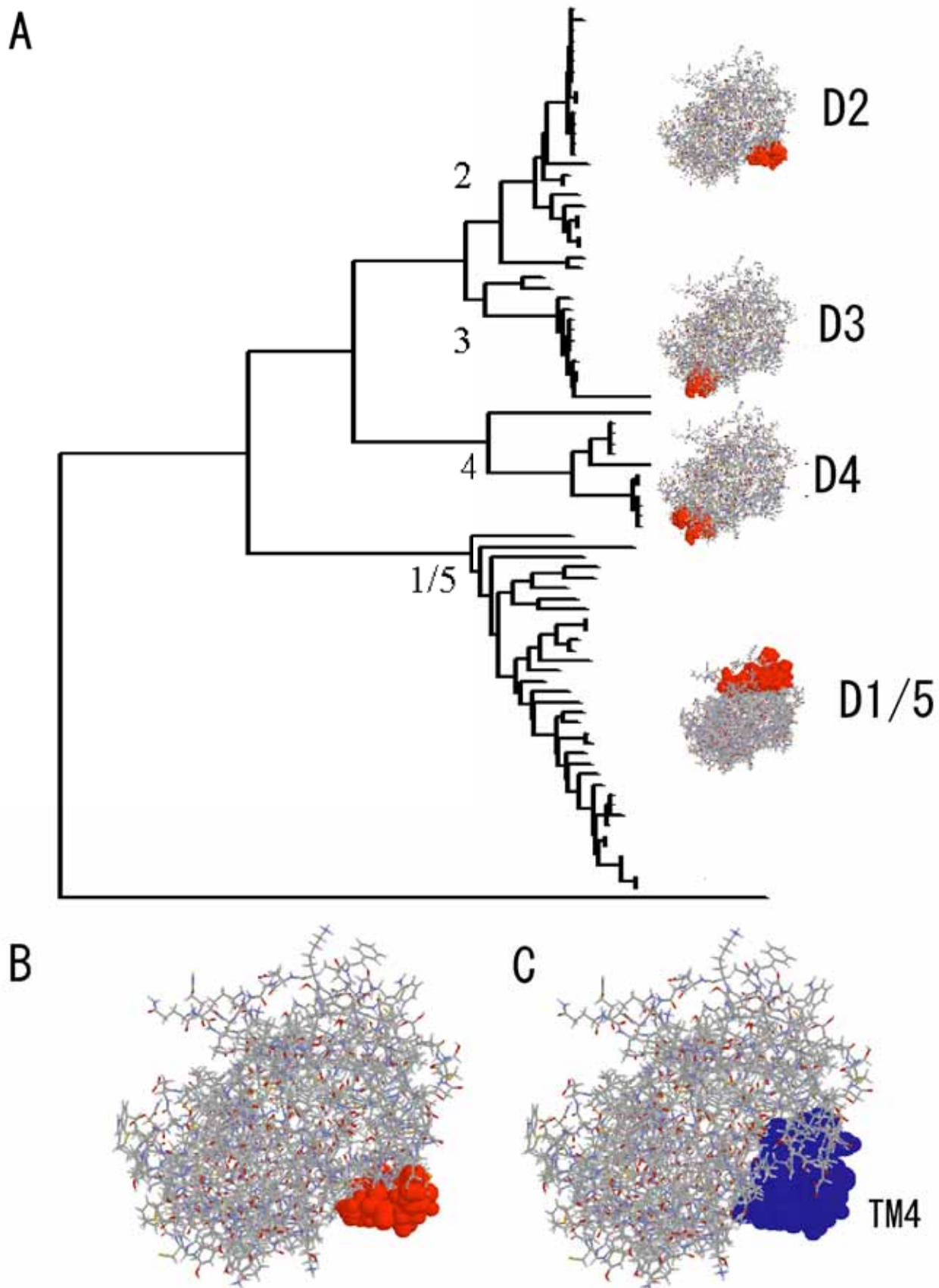


図6. ドーパミン受容体ファミリーについての予測結果

(A) NJ-法による分子系統樹:ノードに付けられた番号はサブタイプの番号に対応している。サブタイプごとに予測されたインターフェイスをマウスロドプシンオリゴマー構造のA鎖上にマッピングし、分子系統樹の右端に示した。すべて細胞の外側から見た像である。(B)D₂Rについて予測されたインターフェイス。(C)D₂Rについて実験により提案されているインターフェイス。マウスロドプシンのTM4に対応している。

基の詳細は付録の表 a に記載した。

次に、アドレナリン受容体ファミリーについて予測を行った。図 7A に、このサブファミリー全体の NJ-法による分子系統樹とグループごとの予測結果を示した。ドーパミン受容体ファミリー同様、分子系統樹上のグループはほぼ薬理的性質に基づくサブタイプ分類に一致しているため、以後は各グループをサブタイプ名に置き換えて説明する。ただし、 α_{1A} AR、 α_{1B} AR、 α_{1D} AR についてはそれぞれ 9 配列、6 配列、8 配列しか入手できず、情報量が不足しているため、一つのサブタイプとして取りまとめた。以後、 α_1 AR と記載する。まず、予測精度を検証するために、 β_2 AR の予測を行った。表 3 に示したように Tyr²⁴⁴、Gln²⁴⁹、Lys²⁷³、Gly²⁸⁰、Leu²⁸⁴、Leu²⁸⁷、Pro²⁸⁸、Val²⁹⁵、Tyr³⁰⁸ がインターフェイス残基として検出され、これらはマウスロドプシンオリゴマー[26]の TM5 の末端と TM6 に対応していた(図 7B)。 β_2 AR では TM6 がホモオリゴマーのインターフェイスだと主張しているグループがある[18]。図 7C にマウスロドプシンの TM6 を青の空間充填モデルで表示させた。さらに、他のサブタイプの予測も行った(図 7A)。 α_{2A} AR のインターフェイス候補領域における保存サイトの集積は統計的に有意ではなく、インターフェイスは予測できなかった。 α_1 AR、 α_{2B} AR、 α_{2C} AR、 β_1 AR では、インターフェイスが類似した位置にあるが、 β_2 AR、 β_3 AR のインターフェイスは他のサブタイプとは離れた位置に存在する。 β_2 AR 以外の予測されたインターフェイス残基についての詳細は、付録の表 b に記載した。

最後に、ムスカリニックアセチルコリン受容体について予測を行った。図 8A に、このサブファミリー全体の、NJ-法による分子系統樹とグループごとの予測結果を示した。この受容体においても分子系統樹におけるグルーピングは、ほぼ薬理的性質をもとにしたサブタイプ分類に一致しているため、各グループをサブタイプ名で記載する。まず、 M_3 R に着目して解析を行った。表 3 に示したように、予測されたインターフェイス残基は Phe¹⁶⁴、Tyr¹⁶⁷、Lys¹⁸³、Arg¹⁸⁴、Gly¹⁸⁶、Val¹⁸⁷、Val¹⁹⁴、Phe²⁰⁶、Trp²⁰⁷、Gly³⁵⁸、Arg³⁶²、Lys³⁷⁰、Leu³⁷¹ であった。このサブタイプでは、Cys¹⁴⁰ と Cys²²⁰ がオリゴマー化に寄与するとの報告がある[71]。予測されたインターフェイス残基をマ

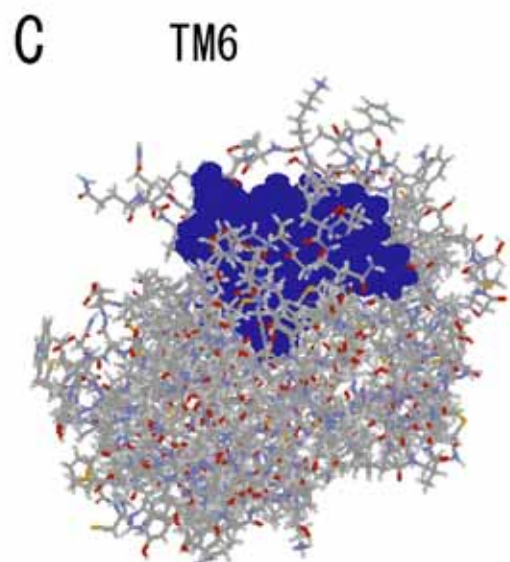
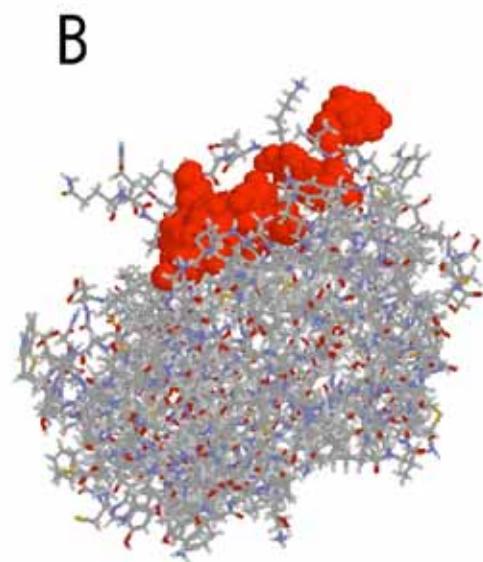
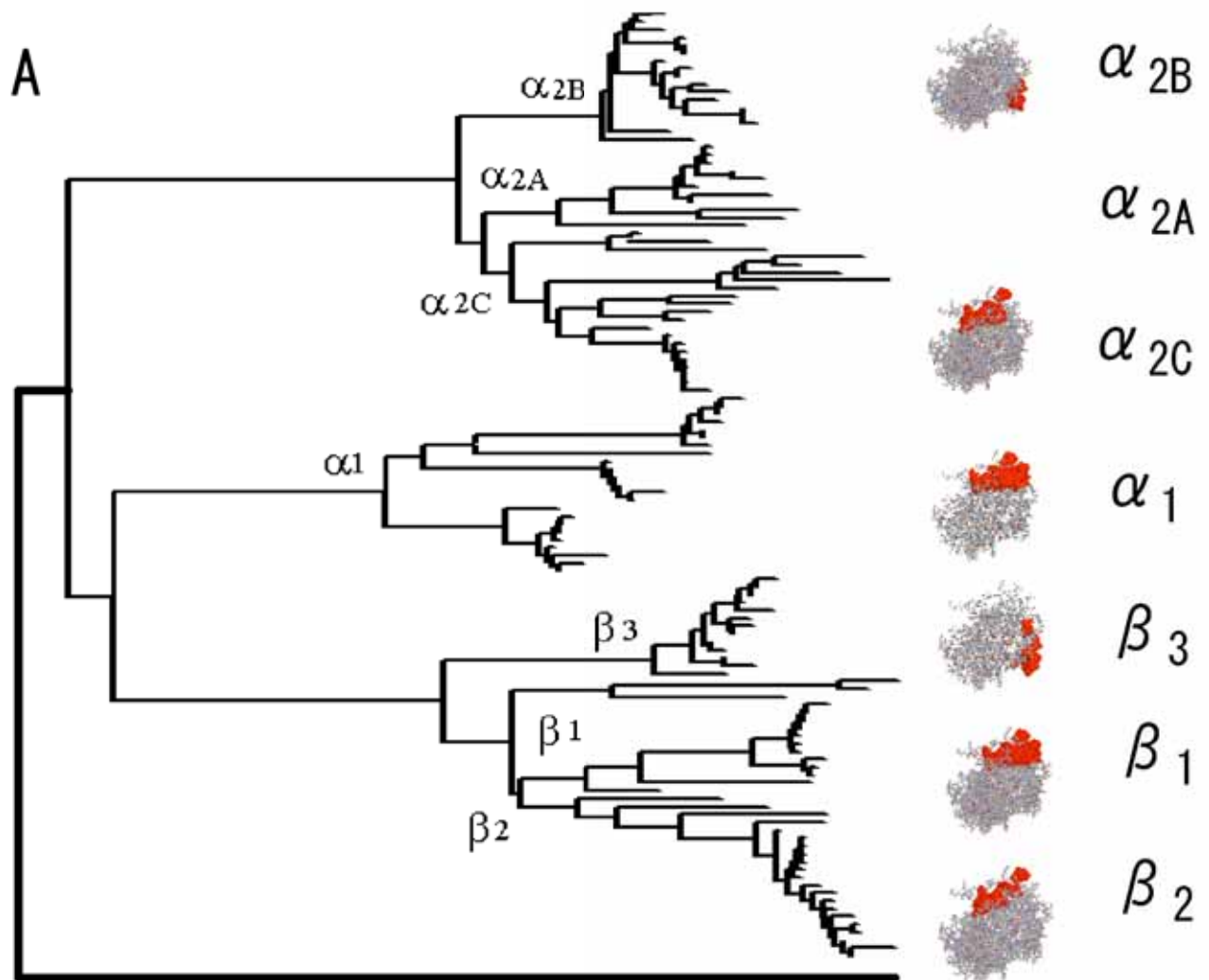


図7. アドレナリン受容体ファミリーについての予測結果

(A) NJ-法による分子系統樹。ノードに付けられた番号はサブタイプの番号に対応している。サブタイプごとに予測されたインターフェイスをマウスロドプシンオリゴマー構造のA鎖上にマッピングし、分子系統樹の右端に示した。すべて細胞の外側から見た像である。(B) β_2 ARIについて予測されたインターフェイス。(C) β_2 ARIについて実験により提案されているインターフェイス。どちらもマウスロドプシンのTM6に対応している。

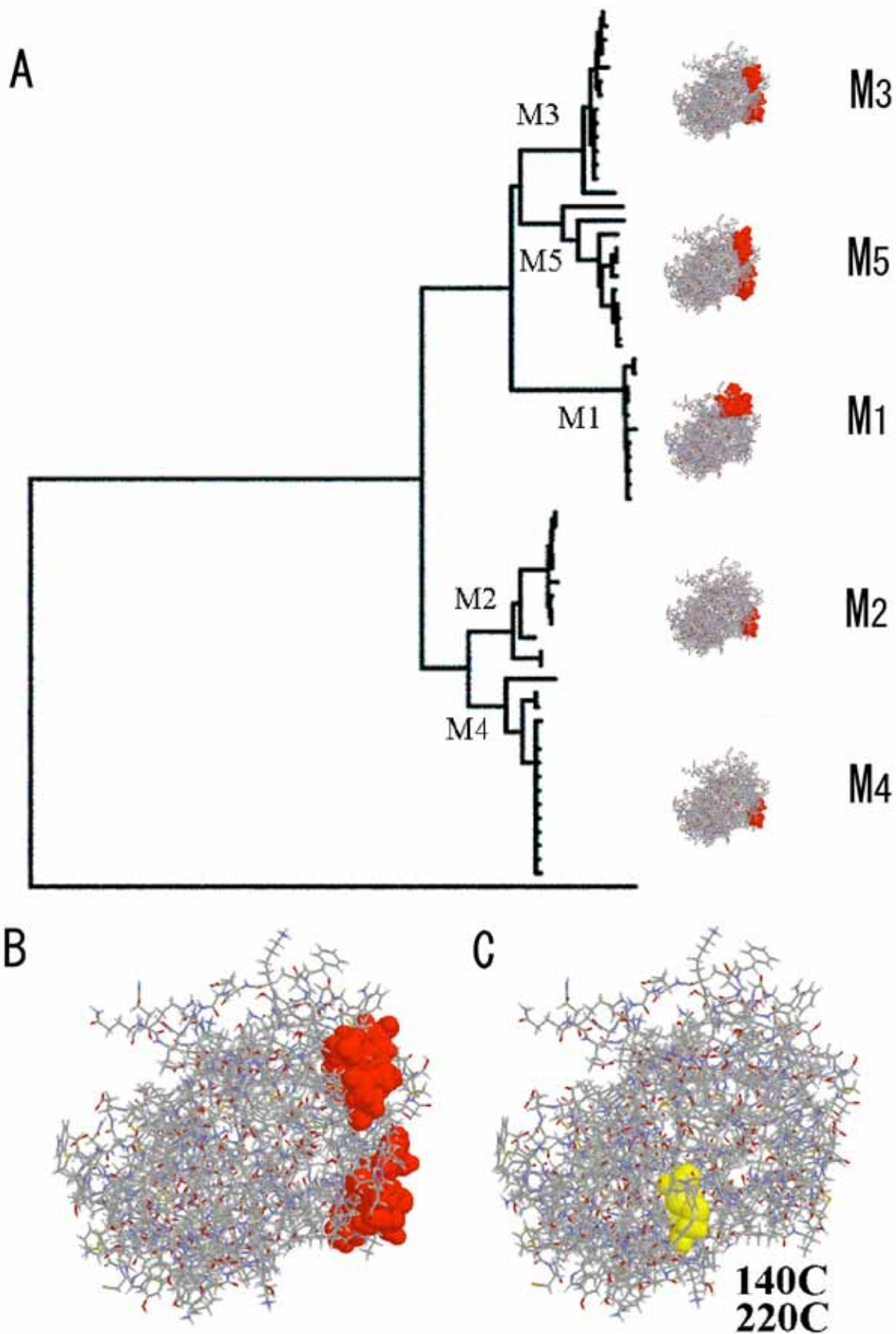


図8. ムスカリニックアセチルコリン受容体ファミリーについての予測結果。
 (A) NJ-法による分子系統樹：ノードに付けられた番号はサブタイプの番号に対応している。サブタイプごとに予測されたインターフェイスをマウスロドプシンオリゴマー構造のA鎖上にマッピングし、分子系統樹の右端に示した。すべて細胞の外側から見た像である。(B) M_3R について予測されたインターフェイス。(C) M_3R について実験により提案されているインターフェイス。

ウスロドプシンのホモオリゴマー構造 (1N3M A 鎖) [26] 上に赤色の空間充填モデルで (図 8B)、実験で報告されている 2 残基を黄色の空間充填モデル (図 8C) で表示した。予測されたインターフェイス残基と実験により提案されている 2 残基の位置が離れていることが見て取れるが、詳細な議論は後ほど行う。さらに、残りの 4 つのサブタイプについても予測を行った (図 8A)。M₁R、M₃R、M₅R について予測されたインターフェイスの位置は類似しており TM4 と TM5 を中心に予測されている。また、M₂R、M₄R について予測されたインターフェイスの位置も類似しており、TM4 が予測されている。M₃R 以外の、予測されたインターフェイス残基の詳細は付録の表 c に示した。

考察

インターフェイス予測のための保存度の評価

インターフェイスの特徴を明らかにしようという研究が盛んに行われている[85-90]。調べられている問題の一つとして、「インターフェイスにおけるサイトの保存度の平均値は、インターフェイス以外の分子表面における平均値より高いか?」というものがある[90]。この研究では、まず解析対象であるタンパク質と祖先を同じくするタンパク質の配列が収集され、マルチプルアラインメントが作成される。次にインターフェイスを構成するすべてのサイトについて保存度が算出され、それらの平均値が算出される。同様の計算をインターフェイス形成に関与しない分子表面サイトについても行い、両者を比較する。これまではインターフェイスは、インターフェイス以外の分子表面よりも保存される傾向にあると報告されてきた[90]。しかし、最近、Caffrey[91]らは、インターフェイスを形成するサイトの保存度の平均値と、インターフェイスの形成に関与しない分子表面サイトの保存度の平均値を算出し、両者の差が統計的に有意でない、と報告している。この結果は、インターフェイスとインターフェイス以外の分子表面を区別する指標として保存度が有効な指標ではない可能性を示唆している。しかし、これまでのインターフェイスにおける保存度の評価方法には問題点がある。一つは、インターフェイスとインターフェイス以外の分子表面の保存度を比較するために、「インターフェイスを構成するすべてのサイトの保存度の平均値」を使用してきたことである。近年の球状タンパク質を中心とした研究から、インターフェイスを構成している全ての残基が会合に等価に寄与しているのではなく、インターフェイス中の限られた数の残基が複合体形成においてエネルギー的に大きく寄与していることが明らかとなってきた。このように複合体形成に大きな寄与を示す残基はホットスポットと呼ばれ[86]、他の残基に比べ保存され

る傾向がある[92]。このことは、インターフェイスを形成するすべてのサイトの保存度の平均値を算出することは、インターフェイスとインターフェイス以外の分子表面を区別するための手法として適切ではない可能性を示唆している。インターフェイスに位置してはいるが置換が許容される残基も含むことで、算出される保存度の平均値が低下するからである。それゆえ、我々は、インターフェイス予測の際に、「ある領域を構成するすべての残基の保存度の平均値が高い場所」を探すのではなく、「ある領域を構成する残基のうち、保存された残基の個数が多い場所」を探すこととした。今回は、GPCRオリゴマーのインターフェイス予測に適用したが、球状タンパク質を含む他のタンパク質についても同様の解析が可能であると考えている。

予測精度の評価

オプシンファミリー

オプシンファミリーに属するマウスロドプシンのオリゴマー構造がAFMにより観測されている[25, 26]。そこで、オプシンファミリーについての予測されたインターフェイスをマウスロドプシンのオリゴマー構造[25, 26]のインターフェイスと比較するため、予測されたインターフェイスをマウスロドプシンのオリゴマー構造[25, 26]上へ空間充填モデルで表示させた(図 5C、5D)。マウスロドプシンでは、TM4・TM5・TM3 と TM4 の間に位置する細胞内ループ領域・TM5 と TM6 の間にある細胞内ループ領域がダイマー形成に参与している。また、TM4 と TM5 の間の細胞外ループの付け根にあたる Trp¹⁷⁵ はロドプシンのオリゴマー形成に重要な役割を果たすことが示唆されている。この Trp¹⁷⁵ は予測されたインターフェイス残基に含まれていた。加えて、残りのインターフェイス残基である、His¹⁵²、Glu²⁰¹ はどちらもヘリックス 4 またはヘリックス 5 に含まれており、図 5C、図 5D から分かるように、マウスロドプシンにおけるダイマー化のためのインターフェイスに一致していた。このように、我々の方法はオプシンファミリーのインターフェイスを正しく予測することができている。

ドーパミン受容体ファミリー

Ng[44]らは、ペプチド阻害実験により、TM6がD₂Rホモオリゴマーのインターフェイス形成に関与していると報告した。しかしながら、Guo[45]らが、最近、異なる実験結果を報告した。システイン架橋実験により、Cys¹⁶⁸を含むTM4がD₂Rホモオリゴマーのインターフェイスを形成していることを示した。その発表の直後に、Ng[44]と同じグループに所属しているLee[46]らが切断変異実験と免疫ブロット法により、TM4とそれ以外に未同定の領域がD₂Rホモオリゴマーのインターフェイスを形成していると報告した。ただし、Cys¹⁶⁸を介したジスルフィド結合はオリゴマー化に必須ではないとされている[46]。図6B、6Cに示したように、我々の予測結果は最近の実験データと一致し、TM4がD₂Rのインターフェイスとして予測されている。Cys¹⁶⁸のrASAが25%以下であったため、我々の解析ではCys¹⁶⁸はインターフェイス候補残基から除外されている。しかしながら、このCysに近接している8残基(Lys¹⁴⁹、Arg¹⁵⁰、Arg¹⁵¹、Thr¹⁵³、Val¹⁵⁴、Val¹⁶¹、Phe¹⁷²、Gly¹⁷³)が予測されたインターフェイス残基に含まれているため、Cys¹⁶⁸に近接した領域はインターフェイス形成に関与しているものと考えられる。このように、我々の解析は、TM4のオリゴマー化への関与を示唆している。しかしながら、D₂Rがこれらのサイトを他のタンパク質との相互作用に使用している可能性は否定できない。さらに、我々の方法では予測されていないTM6が他のタンパク質との会合におけるインターフェイスの構成要素である可能性もある。この問題については以下で述べる。

ある家系ではD₂Rの154番目のValがIleにミスセンス変異した多型が見出され、この多型は筋間代生痙攣(Myoclonus Dystonia: M-D)との関連が示唆されている[93]。M-Dとは筋肉の収縮と弛緩が交互に起こる痙攣のことである。M-Dの分子メカニズムの一つはD₂Rを阻害する抗精神病薬に対する副作用である。しかし、ウシロドプシンを鋳型としたD₂Rの立体構造上におけるVal¹⁵⁴は、アゴニストやアンタゴニストの結合部位からは遠く離れた分子表面に位置すると考えら

れる。また、このサイトはドーパミン(アゴニスト)とスピペロン(アンタゴニスト)に対する薬理的性質が似ている D_2 レセプターファミリーに分類される 3 つのサブタイプ、 D_2R 、 D_3R 、 D_4R の間で保存されておらず、リガンド結合に重要なサイトである可能性は低い。それゆえ、ファーマコフォアの構造はこの多型によって大きく変化しないと推測される。加えて、ヒト胎児由来腎臓細胞 (Human Embryonic Kidney cells: HEK293 cells) に発現させた野生型の D_2R と変異型 D_2R とでは、アゴニスト・アンタゴニストに対する親和性が等しく、機能的な応答も等価であることが確認されている [94]。以上のことより、 D_2R モノマーのリガンドに対する親和性や選択性が変化することで M-D が引き起こされているとは考えにくい。興味深いことに、予測されたインターフェイス残基中に、この V^{154} が含まれていた。このサイトの保存度は閾値よりは低いけれども、魚類を除く脊椎動物の配列では Val が完全に保存されている。上述のように、HEK293 に発現させた実験から、この変異体は正常なシグナル伝達が可能であると考えられる。この実験系は大量発現系であるため、モノマーもしくは、ホモオリゴマーの比率が高いと考えられる。従って、このミスセンス変異はモノマーとホモオリゴマーのリガンド結合能とシグナル伝達能には影響を及ぼさないと考えられる。一方、この実験系におけるヘテロオリゴマーの比率は低いことから、この多型のヘテロオリゴマーに及ぼす影響が考えられる。 D_2R は D_3R [95]、 $A_{2A}R$ [33] などとヘテロオリゴマーを形成することが報告されている。我々は、 D_2R が関与するヘテロオリゴマー化がミスセンス変異により阻害されることで M-D が引き起こされる可能性があると考えている。

D_2R 以外のサブタイプについてもインターフェイス予測を行った。上述のように、予測されたインターフェイスはサブタイプごとに異なっていた。図 6A に示したように、 D_3R のインターフェイスは D_4R のインターフェイスとは同じだが、他のサブタイプとは異なる位置に存在する。 $D_{1/5}R$ では予測されたインターフェイス残基が TM5 と TM6 に含まれている。しかし、 D_1R の TM6 はホモオリゴマー形成のインターフェイスとしては使用されていないことが実験によって提案されている [60]。上述のように、今回の解析では、分子系統樹内で D_1R

と D_5R をクラスタとして分離できなかったため、本来は 2 つのサブタイプを 1 つのグループとして扱った。そのため、実験データとの不一致が生じた可能性がある。 D_1R はホモオリゴマーだけでなく、 $A_{1A}R$ とのヘテロダイマーも形成し、ヘテロダイマーの薬理的性質はホモオリゴマーのものと異なることが報告されている [96, 97]。現在のところ、 D_1R についてホモオリゴマーのインターフェイスも、ヘテロダイマーのインターフェイスも報告されていない。それゆえ、実験データと予測結果の不一致のもう一つの解釈として、TM6 がヘテロ複合体のためのインターフェイスとして使用されていることが考えられる。

アドレナリン受容体ファミリー

Hebert [18] らはペプチド阻害実験により、 β_2AR の TM6 がホモオリゴマー化に関与していると報告した。我々の予測でも、TM6 の表面に位置する残基が検出されており、Hebert [18] らの報告と一致している。また、彼らは β_2AR の TM4 に、膜貫通型タンパク質が膜貫通領域で会合するために重要な役割を果たす GXXXG モチーフの存在を指摘している [18]。GXXXG モチーフはグリコフォリン A で発見された。グリコフォリン A では LIXXG⁸⁴VXXG⁸³VXXT という配列のうち、Gly がホモダイマー化に必須である [98, 99]。Gly の C_α に結合する水素原子と、結合相手であるヘリックスの主鎖カルボニルの酸素とが水素結合を形成することでヘリックスどうしが相互作用する [100]。また、最近の研究によって、GXXXG モチーフの周辺に位置する Leu も会合に重要な役割を果たすことが示されている [101]。Hebert [18] らは、 β_2AR でも TM4 の LKTLG²⁷⁶IIMG²⁸⁰TFTL²⁸⁴ 内の Gly²⁷⁶、Gly²⁸⁰、Leu²⁸⁴ がダイマー化に重要であると報告している。我々の予測したインターフェイス残基中に、このうち Gly²⁸⁰ と Leu²⁸⁴ が含まれていた。このように、我々の方法はアドレナリン受容体のオリゴマー化に関与する残基を正しく予測できている。図 7A から分かるように、アドレナリン受容体ファミリー内での予測されたインターフェイスの位置の変化は、ドーパミン受容体ファミリー内における変化ほど大きくはない。しかし、 β_2AR と β_3AR のインターフェイスは他のサブタイプとは異なる

る位置にある。この 2 つのサブタイプが他のサブタイプから分岐する時点でインターフェイスを変化させた可能性が示唆される。なお、今回の解析では、データベースから得られる配列数が少なかったため、 α_{1A} AR、 α_{1B} AR、 α_{1D} AR の 3 サブタイプを一つのサブタイプとして扱った。しかし、それら 3 つのサブタイプのインターフェイスが互いに異なる位置にある可能性もある。このことから、 α_1 AR のインターフェイスとして予測された領域の信頼度は高くない。

ムスカリニックアセチルコリン受容体ファミリー

クラス A GPCR 内には、第二細胞外ループと第三細胞外ループに存在する 2 つの Cys が高度に保存されており、両者の間でジスルフィド結合が形成されるサブファミリーが多い。このことは、今回、解析の対象としたサブファミリーにも当てはまる。 M_3 R では、この 2 つの Cys を Ala に置換 (C140A、C220A) すると、オリゴマー化が阻害されることから、このジスルフィド結合のオリゴマー化への関与が提案されている [72]。一つの解釈は、モノマーどうしのジスルフィド結合によるダイマー化が Ala 置換により阻害されたとするものである。もう一つの解釈は、分子内相互作用に関与している Cys を置換したことによるモノマー自身の構造変化によりインターフェイスが機能しなくなったとするものである。ウシロドプシン [70, 71] でも M_3 R の Cys¹⁴⁰ と Cys²²⁰ に対応するサイトでは Cys を保持しており、そのサイト間で分子内ジスルフィド結合を形成していることが X 線結晶構造解析で観測されている。しかし、分子間ジスルフィド結合が観測されたとの報告は現時点ではない。AFM によって観察されたマウスロドプシンのオリゴマー構造でも、モノマーどうしはジスルフィド結合を形成可能な位置関係にはない [26]。我々の解析では、Phe¹⁶⁴、Tyr¹⁶⁷、Lys¹⁸³、Arg¹⁸⁴、Gly¹⁸⁶、Val¹⁸⁷、Val¹⁹⁴、Phe²⁰⁶、Trp²⁰⁷、Gly³⁵⁸、Arg³⁶²、Lys³⁷⁰、Leu³⁷¹ がインターフェイス残基として検出されたが、いずれの残基も Cys¹⁴⁰ と Cys²²⁰ からは遠く離れた位置にある (図 8B、8C))。興味深いことに、形成される量は減少するものの、二重の変異体 (C140A、C220A) でもホモダイマー形成能を保持していることが確認されている [72]。野生型と二重変異体が同じ会合様式でホモダ

イマーを形成しているならば、このことは M_3R のダイマー化にとって 2 つの Cys は必須ではなく他の様式もダイマー化に関与していることを示している。予測されたインターフェイス残基と 2 つの Cys の位置関係が離れていることを考慮に入れ、今回の予測が M_3R モノマーどうしが会合しダイマー化する際のインターフェイスを正しく予測できていると仮定するならば、モノマー間でジスルフィド結合は形成されないと考えられる。 M_3R の Cys¹⁴⁰ と Cys²²⁰ に対応するウシロドプシンの Cys¹¹⁰ と Cys¹⁸⁷ はモノマー自身の立体構造維持に必須であることが Karnik[102]らによって報告されている。同様に、 M_3R においても分子内ジスルフィド結合の欠如によって立体構造が維持できない可能性がある。このことによりダイマー化のためのインターフェイスが適切に形成されず、ダイマー化が阻害される可能性がある。ただし、既に述べたように、アセチルコリン受容体ファミリーの LBPI は、機能的制約のもとでの保存と系統的近縁性の反映を区別できるほど十分に低くはない。このため、インターフェイスが誤って予測されている可能性もある。

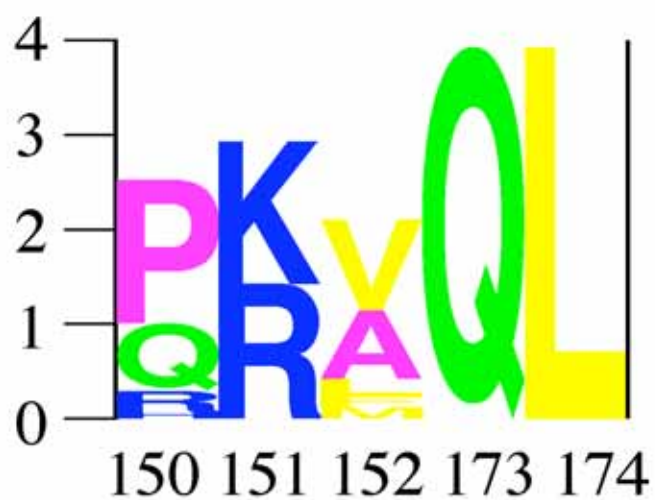
サブタイプ内での保存サイトの観察

今回の解析では、類似した薬理学的性質を保持するサブファミリー内であっても、予測されたインターフェイスの位置がサブタイプごとに異なっていた。そのため、あるサブタイプで予測されたインターフェイス残基が他のサブタイプにおいても保存されているのか、それとも、他の残基に置換されているのかを知ることは有用である。そこで、各サブタイプで予測されたインターフェイス残基に対応するサイトの、サブタイプ内でのシーケンスロゴ[103]を作成し、サブタイプ内・サブタイプ間での置換傾向(保存傾向)を観察した。ただし、インターフェイス残基すべてを対象とするのではなく、予測されたインターフェイス内の保存サイトのみを解析の対象とした。オプシンファミリーは一つのグループとして取り扱ったため解析を行っていない。先述のようにアセチルコリン受容体ファミリーは 2 つの Cys 残基がホモダイマー化に関与すると報告されている[72]。

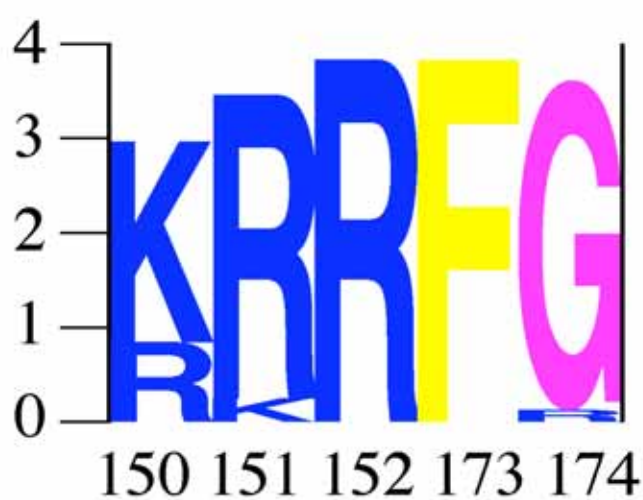
しかし、予測されたインターフェイス残基は、この 2 残基からは隔たった位置にあること、また、LBPI が機能的な制約を反映した保存を評価できるほど小さくないことに加えて、実験データが少ないことや予測の信頼度が低いことからここでは議論しない。

ドーパミン受容体ファミリーについて、分子系統樹上で 4 つのグループに分け解析を行ったが、実験によりインターフェイスが示唆されているのは D_2R のみであるため[44-46]、ここでは D_2R についてのみ議論する。図 9 に D_2R のシーケンスロゴを示す。 D_2R で予測された 5 つのインターフェイス残基に対応する、ウシロドプシン配列の残基番号は 150、151、152、173、174 である。このうち、 D_3R でも同じ性質のアミノ酸が保存されているサイトに対応するウシロドプシン配列の残基番号は 152、173、174 である。残りの 2 サイト(150、151)については、 D_3R 内では保存されているものの、 D_2R とは異なる残基に置換されている。 $D_{1/5}R$ と D_4R ではサイト 150、151、152 が非保存的であり、一方、サイト 173 と 174 は、グループ内では保存されているが、 D_2R と同じ残基が保存されているのはサイト 174 のみである。 D_4R のサイト 173 において支配的な残基は Cys だが、 D_2R における対応するサイトで支配的な残基は Phe である。 D_2R のインターフェイス残基で特徴的なのは、サイト 151 と 154 の 2 カ所に Arg が観察されることである。どちらの Arg も TM4 の細胞質と脂質二重層の境界付近に位置している、これは、マウスロドプシンのオリゴマー構造においても、TM4 の細胞質と脂質二重層の境界付近がダイマー化に関与していること[26]と合致する。水溶性タンパク質のインターフェイスでは、Arg 残基はホットスポット[86, 92]に多く観察されるため、これらの Arg 残基が膜タンパク質においてもホットスポットを形成している可能性がある。しかし、膜タンパク質の膜貫通領域と細胞質側のループ領域の境界付近には正電荷のアミノ酸が多く出現するポジティブインサイドルール[104]が知られており、今回観察された 2 残基の Arg もこのルールに従ったものである可能性を否定できない。Arg の機能的意義を明らかにするためには、さらなる実験・計算科学的アプローチが必要であろう。

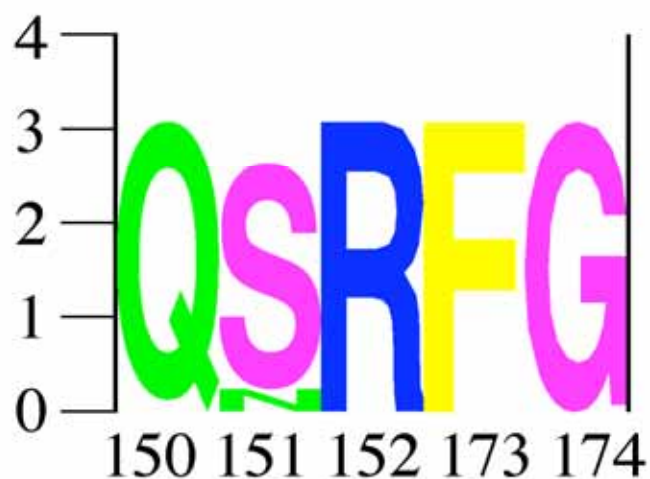
同様にアドレナリン受容体ファミリーについても、予測されたイン



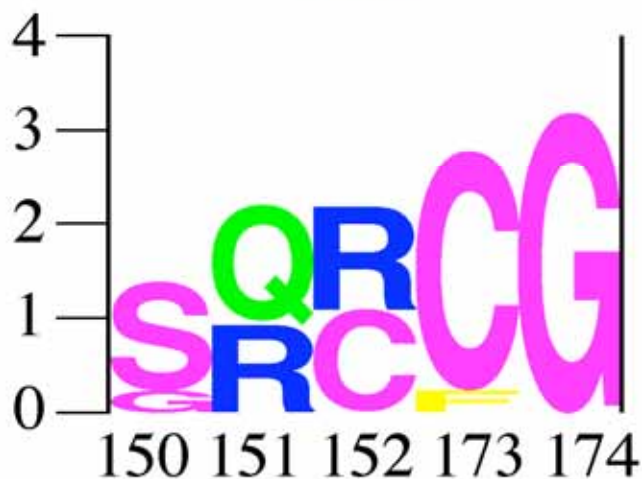
D1/5R



D2R



D3R



D4R

図9. D₂Rについて予測されたインターフェイス内の保存残基と、他のサブタイプにおける対応するサイトのシーケンスロゴ。残基番号はウシロドプシン配列の残基番号に対応づけてある。D₂Rでは保存されているサイトが他のサブタイプでは置換される傾向にあることが分かる。

ターフェイス残基に対応するサイトの、サブタイプ内でのシーケンスロゴを作成し、サブタイプ内・サブタイプ間での置換傾向(保存傾向)を観察した(図 10)。アドレナリン受容体ファミリー内では実験的にインターフェイスが報告されているのは β_2 AR のみであるため[18]、ここでの議論は β_2 AR を中心に行う。 β_2 AR における保存サイトは、ウシロドプシン配列の残基番号 223、228、252、259、267、287 に対応する。この 6 つの保存サイトは α_1 AR、 α_{2C} AR、 β_1 AR でも保存されている。そのうち α_1 AR と β_1 AR ではウシロドプシン配列における残基番号 223、252、259、267 で β_2 AR と同じ残基が保存されている。 α_{2C} AR でもウシロドプシン配列における残基番号 223、259、267 で β_2 AR と同じ残基が保存されている。 α_1 AR、 α_{2C} AR、 β_1 AR の他のサイトについては、 β_2 AR のものと異なっているだけでなく、 α_1 AR、 α_{2C} AR、 β_1 AR の間でも異なっているが、物理科学的性質は類似したアミノ酸が保存されている。上述のように、 β_2 AR、 α_1 AR、 α_{2C} AR、 β_1 AR について予測されたインターフェイスの位置は互いに類似している。この 4 つのサブタイプ間での保存傾向の類似性は、インターフェイスの位置の類似性を反映していると考えられる。対照的に、 β_2 AR の保存サイトに対応する Tyr²²³ 以外のサイトは α_{2B} AR のサブタイプ内で保存されていない。 β_2 AR の保存サイトに対応する β_3 AR の各サイトは、サイト 223、259、267 ではサブタイプ間で保存されている。サイト 228、252、287 では、サブタイプ内でも置換される傾向にあり、特にサイト 252 では性質の異なるアミノ酸に置き換わっている。上述のように、 α_{2B} AR、 β_3 AR、 β_2 AR の 3 者について予測されたインターフェイスの位置は互いに異なっている。この 3 つのサブタイプの保存傾向の違いはインターフェイスの位置の違いを反映していると考えられる。 β_2 AR の予測されたインターフェイスで保存されている 2 つのサイトでは、Tyr が保存されている。球状タンパク質で、Tyr はホットスポットに頻出する残基である[86, 92]。4 つの保存サイトは TM6 に集積しており、Tyr は脂質二重膜と細胞外との境界に位置している。また、Lys が保存されているサイトは脂質二重膜と細胞質の境界に位置するため、D₂R の場合と同様にポジティブインサイドルール[104]に従っている可能性がある。Gly が保存されてい



図10. β_2 ARについて予測されたインターフェイス内の保存残基と、他のサブタイプにおける対応するサイトのシーケンスロゴ。
 残基番号はウシロドプシン配列の残基番号に対応している。 β_2 ARでは保存されているサイトが他のサブタイプでは他の残基に置換される傾向にあることが分かる。

るサイトもあるが、Gly の C_{α} に結合する水素原子と、結合相手であるヘリックスの主鎖カルボニルの酸素とが水素結合を形成することでヘリックスどうしが相互作用し、膜タンパク質どうしがダイマー化する際のヘリックス間パッキングに役立つのではないかと考えられる [14, 98-100]。

インターフェイスを複数持つタンパク質のインターフェイス予測

本方法では、2次元平面において f 値が最大値を取るセクターのみを選択し、その領域が立体構造上でのインターフェイスに対応すると予測した。このため、この方法では 1 つのインターフェイスしか予測できず、2 つ以上のインターフェイスを分子内に有している場合、残りのインターフェイスは無視される。例えば、マウスロドプシンのオリゴマー構造中には 2 種類のインターフェイスが観察される [25, 26]。オリゴマー構造を観測した著者らの記述によれば、一つはモノマーどうしが会合しダイマー化するためのインターフェイスである。もう一つはダイマーどうしが緩やかに会合しオリゴマー化するためのインターフェイスである。図 5C は 4 分子のマウスロドプシンを細胞外から観察した像である。PDB データ中では、左上、左下、右上、右下の順に A 鎖、B 鎖、C 鎖、D 鎖と定義されている。A 鎖-C 鎖、B 鎖-D 鎖の間で形成されているインターフェイスがダイマー化のためのインターフェイス。ダイマー (A 鎖-C 鎖) とダイマー (B 鎖-D 鎖) の間に形成されているインターフェイスがオリゴマー化のためのインターフェイスである。我々の解析では、ダイマー化のためのインターフェイスのみが検出され、オリゴマー化のためのインターフェイスは検出されなかった。しかし、図 5A には 2 つのピークが存在する。一方は $\delta = 30^\circ$ 付近に、もう一方は $\delta = 320^\circ$ 付近に観察される。最大値に対応するピークは 30° 付近のものであり、この最大値が算出されるセクターが含む残基はダイマー化のためのインターフェイスに対応する。一方、 320° 付近の f 値を持つセクターに含まれる残基は、ダイマー化のためのインターフェイスとオリゴマー化

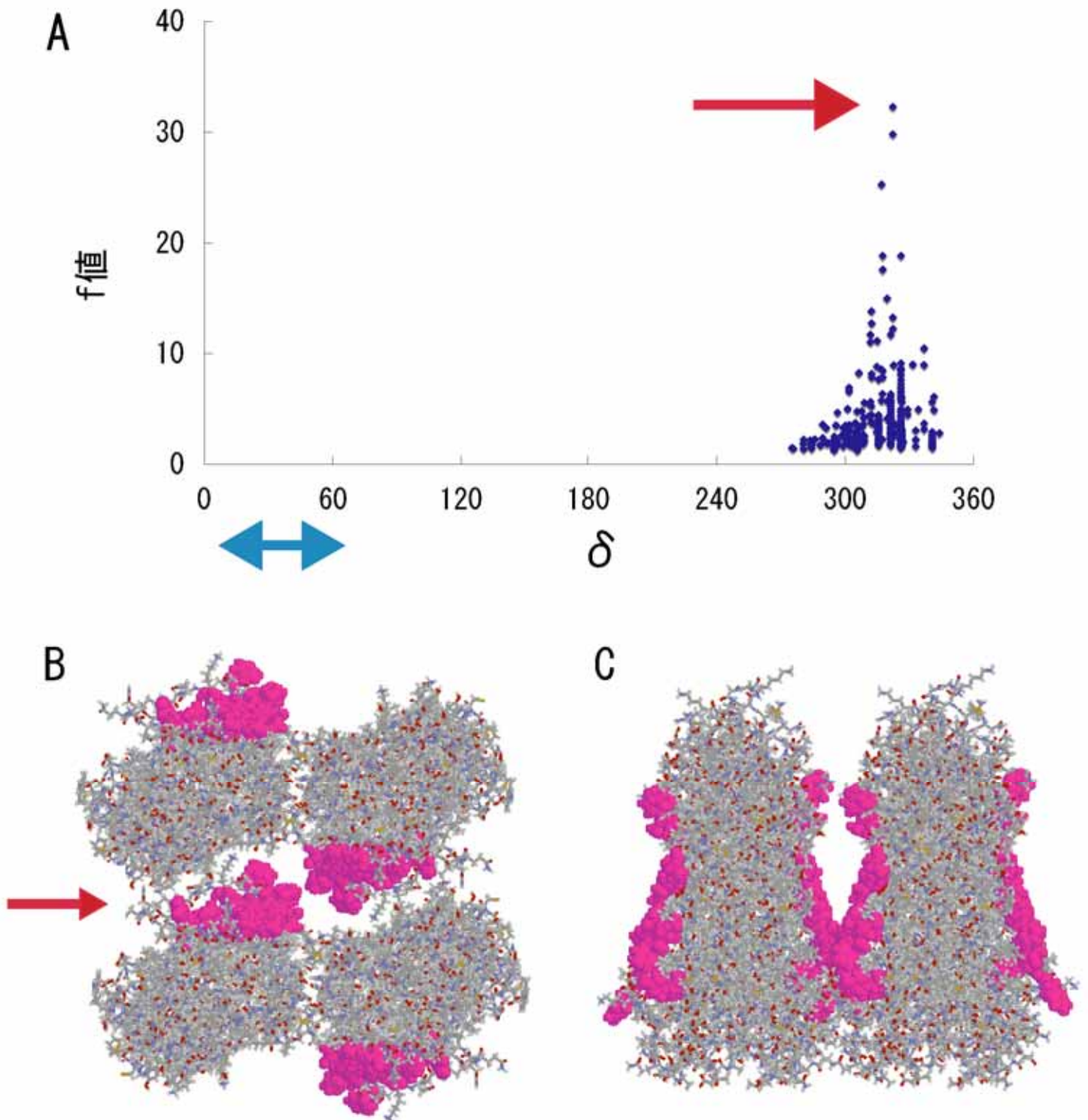


図11. オプシンファミリーについての二度目の予測結果。
 (A) 第2主成分軸からの角度(δ)に対してプロットされたf値。一度目の予測で検出されたために除去された領域を両方向の青矢印で示した。f値の最大値を赤色の矢印で示した。(B) (C) マウスロドプシンオリゴマー構造上にマッピングされた予測されたインターフェイス残基。細胞外から見た図(B)と矢印(→)方向から見た図(C)

のためのインターフェイスの両方を含む。それゆえ、オリゴマー化のためのインターフェイスを予測しようとするならば、30° 付近に位置する最大値が算出されるセクターがカバーする領域を、インターフェイス候補領域から除き、残された領域で再度インターフェイス予測を行えば良い。図 11A に示したのは、このようにして 2 度目の予測を行った際の f 値のプロットである。一回目の予測で検出され、2 度目の予測では使用しなかった領域を両方向の青矢印で示した。また、 f 値の最大値を右向きの赤矢印で示してある。予測されたインターフェイス残基は表 3 に示した。また、インターフェイス残基をマウソロドプシンのオリゴマー構造上にマッピングしたところ、二度目に予測されたインターフェイスはオリゴマー化のためのインターフェイス領域に位置している(図 11B、11C)。このことは、我々の方法にわずかな修正を加えさえすれば、複数のインターフェイスを予測可能だということを示している。また、 f 値の分布と立体構造上での分布を詳細に解析すれば、その分子が持つインターフェイスの個数を知ることができるであろう。

データベース: G-protein coupled Receptor Interacting Partners -GRIP-

GPCR が創薬における重要性や、そのオリゴマー化の重要性についても認識されつつあることは先に述べた。2000 年以降、オリゴマー化とオリゴマー化の際のインターフェイスに関する報告が増加している。” GPCR” とオリゴマー化関連用語をキーワードとして PubMed で検索したところ、99 年までは年間一桁の論文がこれらの用語を含んでいたが、2000 年を境に増加し昨年は 44 件に到達した。オリゴマー化のメカニズム、細胞レベルでの機能は、サブファミリー内であってもサブタイプごとに異なることから、情報を収集し、整理することは重要である。GPCR に関する情報を収集・整理したデータベースとしては、GPCRDB(G-Protein Coupled Receptor Data Base)が先駆的である[105]。しかし、GPCRDB にはオリゴマー化に関する情報は全く含まれていない。そこで文献情報から、GPCRs オリゴマー化に関する情報を収集しデータベース(G-protein coupled Receptor

Interacting Partners: GRIP) を作成した。URL: <http://timpani.genome.ad.jp/~grip/GRIP01/index.htm>にて公開している。

図 12A は、GRIP のホームページのスクリーンショットである。リンクを辿ると、クラス A から E の分類に対応するメニューがある(図 12B)。各クラスはさらに 46 のサブファミリーに分類されており、それぞれのサブファミリーは複数のサブタイプから構成されている(図 12C)。これらのサブタイプ分類は GPCRDB の分類や KEGG[106]における分類とほぼ一致している。このサブタイプごとに情報を格納した。図 12D に D_2R に関してまとめられたページを示す。図 12D-1 は、我々の予測法で予測されたインターフェイスに関する情報を収めたページ(図 13A)へリンクしている。図 12D-2 は D_2R の相互作用相手ごと情報を収めたページ(図 13B)へリンクしている。

予測されたインターフェイスに関するページでは、ウェブ上で立体構造を操作するためのプラグインである Chime[107]を利用してインターフェイスの位置を表示させることができる。予測の過程で保存残基と見なされたものは赤色の空間充填モデルで、非保存残基と見なされたものは黄色の空間充填モデルで、残基ごとに表示できるようにしてある。各残基の保存度、ウシロドプシン配列における対応するサイトの残基番号が括弧内に示してある。その下には、予測に使用されたマルチプルアラインメントへのリンクがはられている。このアラインメントでは、残基番号はウシロドプシン配列のものに一致させてあり、ウシロドプシン配列に対応するサイトが存在しない場合にはそのサイトは除かれている。さらに、インターフェイスの位置は類似する薬理的性質を持つサブタイプ間でも異なる場合があることから、他のサブタイプについて予測されたインターフェイスも分子系統樹上で比較できるよう設計されている(図 14)。その他の情報については Remarks に記載した。例えば、 D_2R の場合、予測されたインターフェイスに含まれる残基の一つ Val¹⁵⁴ と遺伝性筋間代性痙攣との関連性について記載した。また、予測手法についての詳細がまとめられた論文、文書へもリンクしている。

相互作用のペアごとに情報を収めたページ(図 13B)には、相互作用

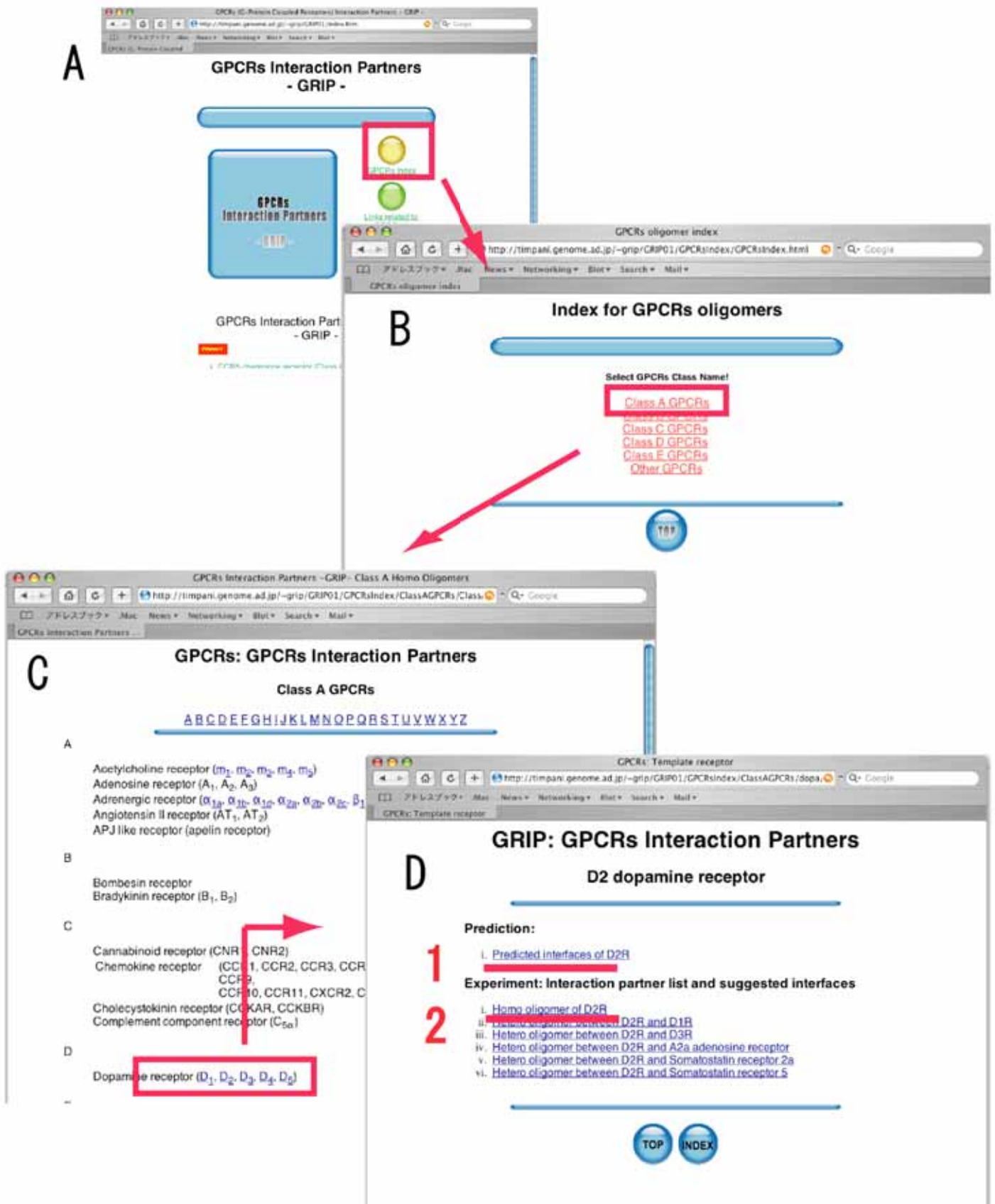
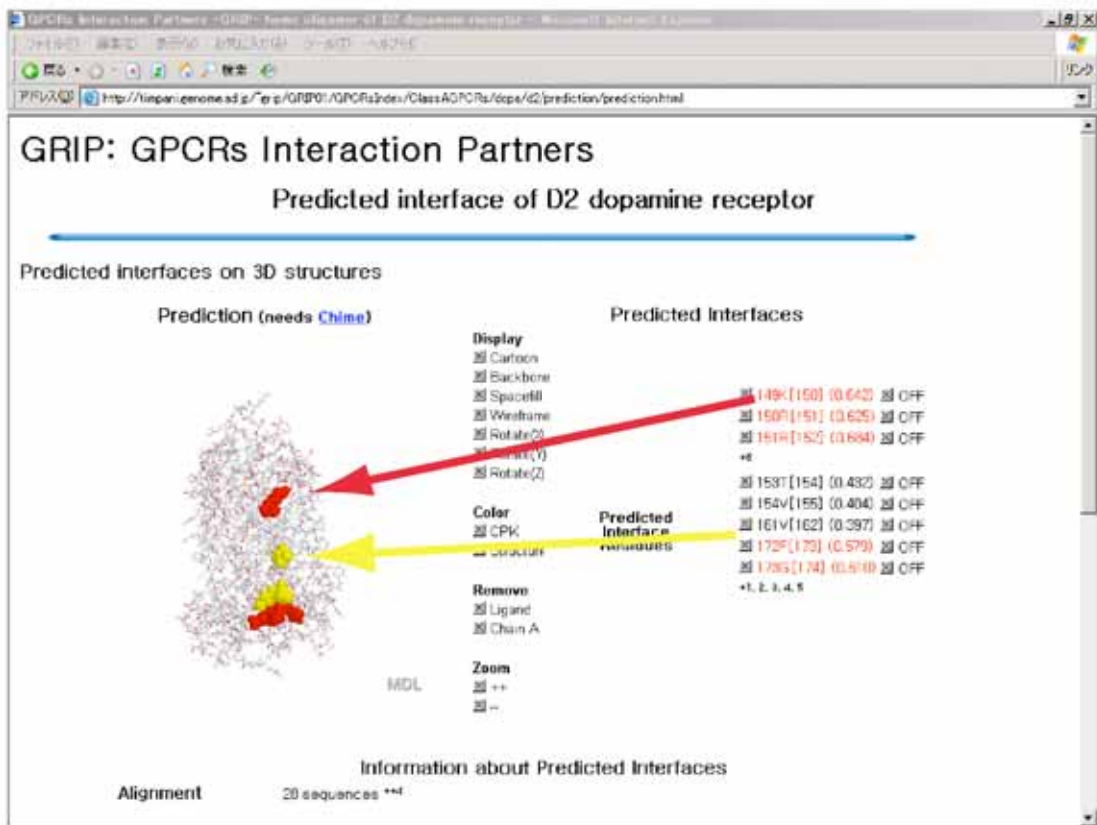


図12. GRIP (G-Protein Coupled Receptor Interacting Partners) のスクリーンショット。
 (A) ホームページ。(B) クラスA-Eへの分類。(C) クラスA GPCRファミリー内のサブファミリー。サブタイプごとに情報が格納されている。(D) D₂Rについてページ。1からはインターフェイス予測についてのページへ、2からは実験に基づいた相互作用相手についてのページへリンクしている。

A



B

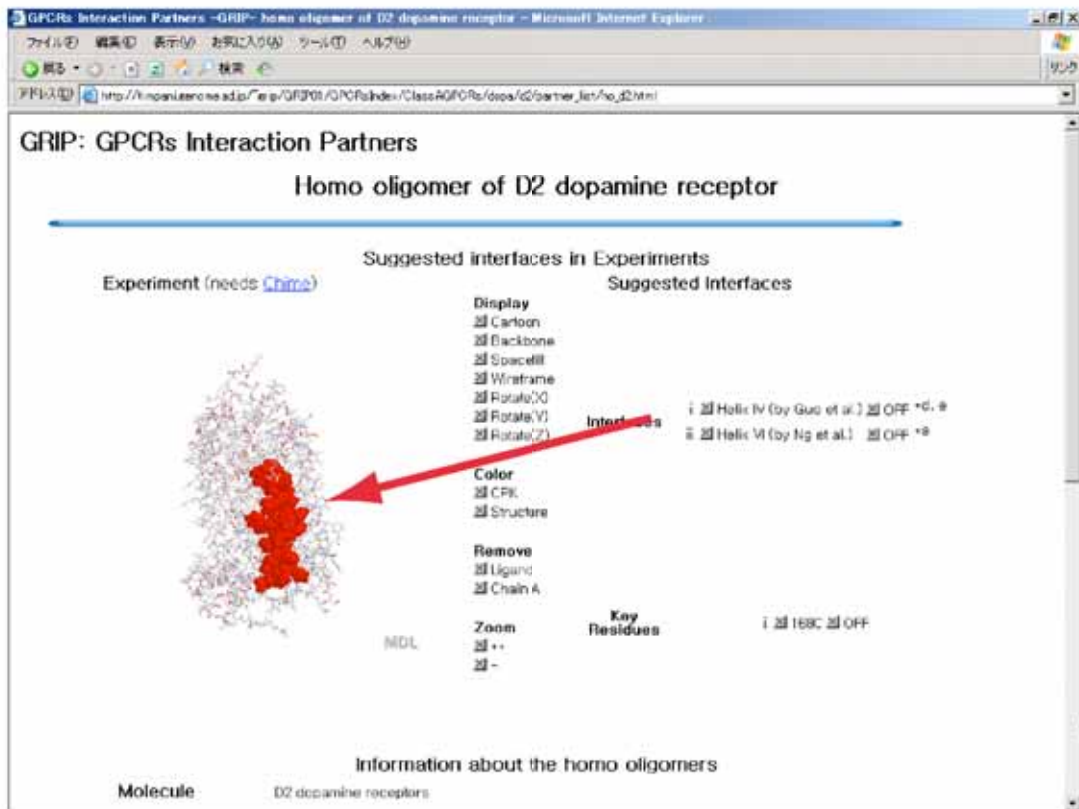


図13. D₂Rについての予測されたインターフェイスと実験により提案されているインターフェイス。

(A) D₂Rについてのインターフェイス予測結果。×印の付いたボタンをクリックすると立体構造上に予測されたインターフェイス残基が空間充填モデルで表示される。保存残基は赤で、非保存残基は黄色で表示される。(B) 実験により提案されているD₂Rのインターフェイス。

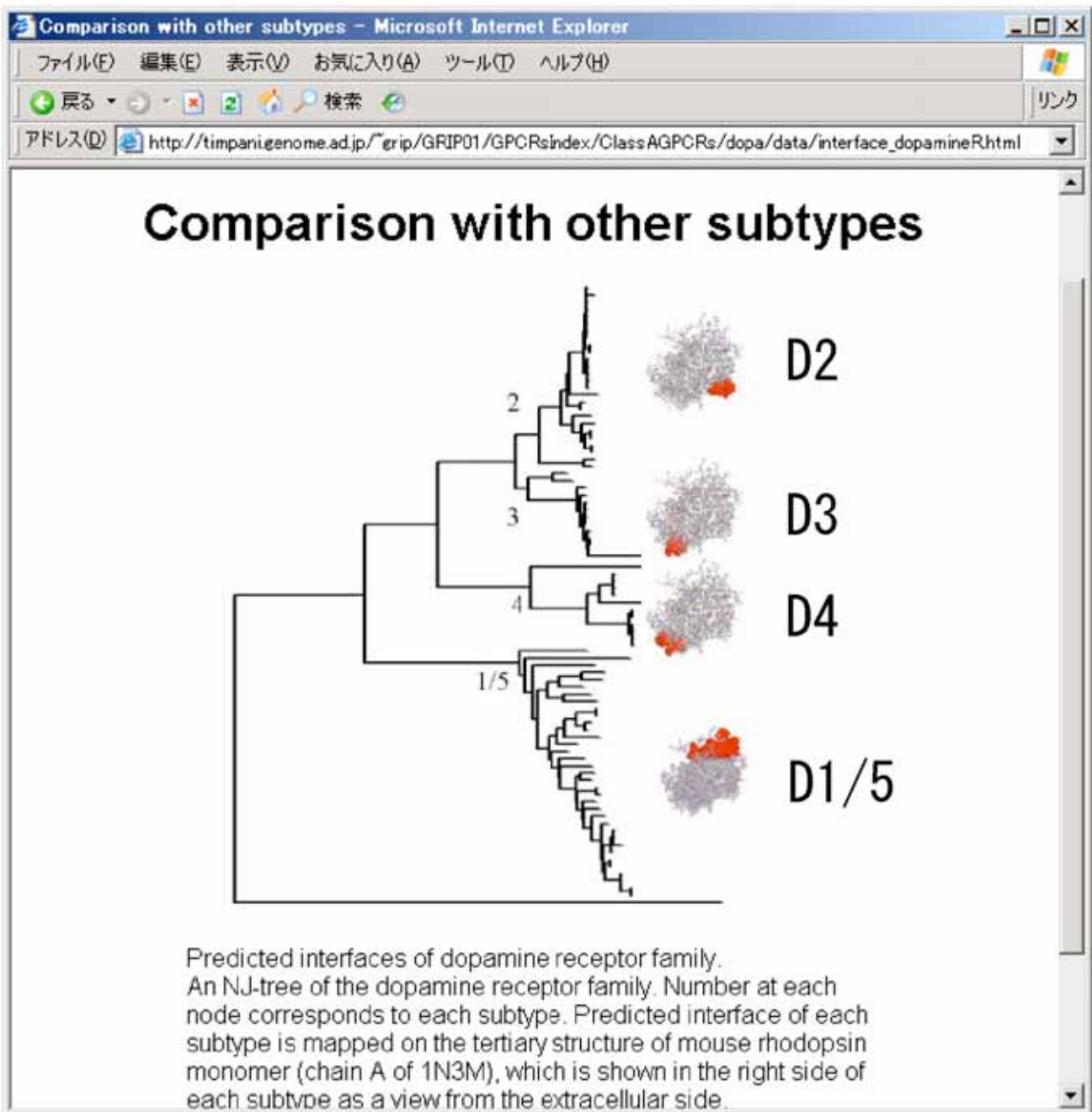


図14. ドーパミン受容体ファミリーについて、サブタイプごとに予測されたインターフェイス。

相手のタンパク質名と実験手法、そして、それらが記載されている文献の情報が記されている。実験に基づくインターフェイスが提案されているものについては、予測のページと同様に Chime[107]を利用してインターフェイスの位置を表示できるようにした。しかし、実験に基づいて示唆されているインターフェイスは、ロドプシン[25, 26]、D₂R[44-46]、β₂AR[18]、M₃R[72]、LTB₄R[73, 74]のみであり、情報は不足している。

現在のところ、17のサブタイプについて情報の入力完了している。2004年6月9日にログ解析を始めてから、総計867名(9月13日現在)が利用している。未だ予測を行っていないサブタイプについて予測を進めると同時に、これから先報告される実験結果についても引き続き収録を続けて行く予定である。

結び

GPCR オリゴマーのインターフェイスを予測する手法を開発した。クラス A GPCR に属する幾つかのサブファミリーについて解析することで、我々の手法の長所と短所について議論してきた。GPCR が複合体を形成する際のインターフェイスに関するさらなる情報があれば、オリゴマー化を制御する医薬品の合理的設計につながると考えている。このインターフェイスへの結合を介してオリゴマー化を制御する試みは、タンパク質のポケット部位に結合し内在性リガンドと競合する従来のドラッグデザインとは異なるコンセプトに基づいている。実際、相互作用する 2 つのタンパク質の一方のインターフェイス部分に相当するペプチド、または、そのペプチド構造を模倣した低分子により、タンパク質間相互作用を制御できることが示されている[108]。例えば、インテグリンの β 鎖は、細胞外マトリクス (ECM) にある RGD 配列を認識し会合するが、RGD ペプチドまたはこのペプチドに構造が類似した低分子を添加することで、インテグリン β 鎖と ECM との結合を阻害し細胞間接着を緩めることが知られている。同様に、GPCR においても分子間相互作用を制御する薬物の設計できる可能性がある。しかし、残念なことに、GPCR のオリゴマー化に関する情報、特に、オリゴマー化のインターフェイスに関する情報は不足している。このような状況では、我々が開発した予測方法は、そのような新しい創薬研究を進める上で極めて有用なツールとなるだろう。

最後に、本方法の今後の改善点について述べる。今回の解析においては、文献データを参考に分子系統樹上で機能的に等価なグループを同定した。我々の方法をゲノムワイドなデータに適用しようとするならば、このグルーピングの手続きは自動化する必要がある。この問題については今後取り組んで行きたいと考えている。

また、本研究ではドメインコンタクトにより相互作用するケースを想定したが、仮にドメインスワッピングによるオリゴマー[36, 37]

が存在し、そのインターフェイス予測を試みるのであれば、我々の手法とは異なるアプローチが必要となるであろう。上述のように、GPCR はホモオリゴマーだけでなく、ヘテロオリゴマーも形成する。さらに、GPCR 以外の膜タンパク質とも複合体を形成する[109, 110]。例えば、D₅ ドーパミン受容体(D₅R)の C 末端は GABA_A 受容体(GABA_AR) γ_2 サブユニットの第二細胞内ループと直接相互作用し、抑制的な影響を及ぼし合う[109]。また、Receptor-activity-modifying proteins (RAMPs) は一回膜貫通型の膜タンパク質で、カルシトニン受容体様受容体(CRLR)と相互作用する。この相互作用は CRLR が膜上へ移行し、活性を持つのに必須である。結合する RAMP の種類によって、認識するリガンドが変化する[110]。このように、GPCR と相互作用する膜タンパク質が GPCR であるとは限らないため、予測されたインターフェイスが他の膜タンパク質との相互作用に使用されている可能性がある。しかし、現在確認されている GPCR のインターフェイスはすべて GPCR どうしの複合体のものであるため、本研究においては GPCR どうしで形成される複合体のインターフェイスのみに注目した。

また、立体構造情報を入手できるのはウシロドプシンのみであるため、クラス A GPCR のみに予測対象を限定した。しかし、他のクラスの GPCR の立体構造解析がなされれば、本手法と同様のアプローチが可能であると考えている。さらに、GPCR に限らず以下の 4 条件を満たすタンパク質に対し本手法は適用可能であろう。

- ① 近縁な配列の立体構造を入手できる
- ② 立体構造を円筒状の構造に見立てることができる
- ③ インターフェイスは円筒の側面に位置する
- ④ オリゴマー形成時にもモノマー自身の構造は大きく変化しない

従って、多くの膜タンパク質に適用可能だと考えている。さらに、適当な平面上への立体構造情報を射影できればタンパク質全般に適用可能であるため、現在、手法の改良に取り組んでいる。

我々の手法はオリゴマー化のためのインターフェイスの位置を予測できるが、どの分子とオリゴマーを形成するのかは予測できない。つまり、インターフェイスが分かったとしても、それがホモオリゴマー化のためのインターフェイスなのか、ヘテロオリゴマー化のた

めのインターフェイスなのか、さらには、GPCR 以外の膜タンパク質との相互作用のためのインターフェイスなのか判定できない。この問題を解決できればシグナル伝達のメカニズム解明に有用だと考えられる。相互作用相手の予測についても今後の課題としたい。

謝辞

本論文に書き記した一連の研究は、奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科情報生命科学専攻博士後期課程在学中に、ゲノム情報学講座において執り行われたものです。

本学 情報科学研究科 小笠原直毅教授には、本研究を滞り無く遂行するための環境を整えて頂きました。ゼミナール等でのご意見や、本論文を作成するにあたり貴重な助言により、本論文を執筆できました。小笠原教授のご助力のおかげで、今回の研究をことができました。厚く御礼申し上げます。

本学 情報科学研究科 五斗進客員助教授(京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター助教授)には、京都大学バイオインフォマティクスセンターに受け入れて下さり、同研究所内での共同研究を進めるための環境を提供して下さいました。五斗助教授のご助力がなければ、今回の研究を行うことはできませんでした。深く感謝申し上げます。

本学 情報科学研究科 箱嶋敏雄教授には、報告会において鋭いご質問、ご指摘を頂きました。中間報告会で頂いたコメントのおかげで、実験を行なっている研究者に研究の価値を理解して頂くにはどうしたら良いか真剣に考えるようになりました。心より御礼申し上げます。

本学 情報科学研究科 川端猛客員助教授には、研究会などで多くの鋭いご質問、ご指摘を頂きました。川端助教授との議論の内容は本研究だけでなく、今後のためにも非常に有用だったと感じております。ありがとうございました。

九州大学 生体防御医学研究所 微生物ゲノム情報学分野 藤博幸教授(前京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター客員教授)には、本研究を遂行するにあたって、研究の立ち上げから論文の執筆までご指導頂きました。日頃から丁寧にご指導頂いたおかげで本研究を終えることができました。また、様々な分野に興味を

持ち、新しい分野を開拓し続けようとする姿勢から多くのことを学ばせて頂きました。深く御礼申し上げます。

京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンターにて研究をさせて頂いた期間中、人材養成ユニットにてお世話になりました。隈啓一客員助教授には毎月の報告会等を通して非常に丁寧なご指導をご指摘を頂き、また、論文紹介や輪読の際に垣間見える深い専門知識と研究に対する姿勢には深い感銘を受けました。本当にありがとうございました。

同じく、人材養成ユニットのスタッフ、研究員、学生の皆様には、セミナー、報告会などを通じて貴重なご意見を賜りました。皆様のお力添えにより本論文の執筆にまでたどり着けました。本当にありがとうございました。

立命館大学情報理工学部教授藤田典久教授、ならびに、同学の今井隆志講師には大学在籍時だけでなく、その後の論文のとりまとめに際しましても、大変お世話になりました。本論文にて取り扱ったテーマは、お二人の存在抜きには無かったものと思っております。本当にありがとうございました。

本研究は、2003年度と2004年度は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科21世紀COEプログラム「細胞機能を支える動的分子ネットワーク」の支援を受けて行なわれました。このプログラムにてRAに採用して頂いたことで、海外での発表など貴重な経験をさせて頂きました。深く感謝しております。

2005年度は、日本学術振興会の支援を受けて行なわれました。ありがとうございました。

本研究を遂行するにあたり、京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンターの計算機資源を使用させて頂きました。ありがとうございました。

参考・引用文献

- [1] Wise A, Gearing K, Rees S. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today* 2002;7:235-246.
- [2] McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:551-577.
- [3] Stergiou GS, Skeva II. Renin-angiotensin system blockade at the level of the angiotensin converting enzyme or the angiotensin type-1 receptor: similarities and differences. *Curr Top Med Chem* 2004;4:473-481.
- [4] Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 2002;520:97-101.
- [5] M. Suwa, T. Sato, I. Okouchi, M. Arita, S. Matsumoto, S. Tsutsumi, H. Aburatani, K. Asai, Y. Akiyama., "SEVENS: The Comprehensive Collection of Seven Transmembrane Helix Receptors, hunted from Human genome", *Nucleic Acid Research*. 2003;31:1.
- [6] <http://www3.oup.co.uk/nar/database/summary/373?action=search;sect=all;term=Suwa>
- [7] Crossley R. GPCRs come of age in San Diego. *Drug Discov Today*. 2003;8:19-20.
- [8] Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter

receptors. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:274–286.

- [9] Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Rios C, Trapaidze N, Devi LA. G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med* 2001;79:226–242.
- [10] Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* 2001;92:71–87.
- [11] Angers S, Salahpour A, Bouvier M. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:409–435.
- [12] Agnati LF, Ferre S, Lluís C, Franco R, Fuxe K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev* 2003;55:509–550.
- [13] Kroeger KM, Pflieger KD, Eidne KA. G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front Neuroendocrinol* 2003;24:254–278.
- [14] Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 2004;5:30–34.
- [15] Limbird LE, Meyts PD, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;64:1160–1168.

- [16] Limbird LE, Lefkowitz RJ. Negative cooperativity among beta-adrenergic receptors in frog erythrocyte membranes. *J Biol Chem* 1976;251:5007–5014.
- [17] Loisel TP, Adam L, Hebert TE, Bouvier M. Agonist stimulation increases the turnover rate of beta 2 AR-bound palmitate and promotes receptor depalmitoylation. *Biochemistry* 1996;35:15923–15932.
- [18] Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 1996;271:16384–16392.
- [19] Hebert TE, Loisel TP, Adam L, Ethier N, Onge SS, Bouvier M. Functional rescue of a constitutively desensitized beta2AR through receptor dimerization. *Biochem J* 1998;330:287–293.
- [20] Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3684–3689.
- [21] Jordan BA, Cvejic S, Devi LA. Opioids and their complicated receptor complexes. *Neuropsychopharmacology* 2000;23:S5–S18.
- [22] McVey M, Ramsay D, Kellett E, Rees S, Wilson S, Pope AJ, Milligan G. Monitoring receptor oligomerization using

time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta-opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem* 2001;276:14092–14099.

- [23] Gomes I, Filipovska J, Jordan BA, Devi LA. Oligomerization of opioid receptors. *Methods* 2002;27:358–365.
- [24] Levac BA, O’ Dowd BF, George SR. Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:76–81.
- [25] Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* 2003;421:127–128.
- [26] Liang Y, Fotiadis D, Filipek S, Saperstein DA, Palczewski K, Engel A. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem* 2003;278:21655–21662.
- [27] Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8606–8611.
- [28] Ciruela F, Escriche M, Burgueno J, Angulo E, Casado V, Soloviev MM, Canela EI, Mallol J, Chan WY, Lluís C, McIlhinney

RA, Franco R. Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J Biol Chem* 2001;276:18345–18351.

- [29] Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferré S, Fuxe K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 2002;277:18091–18097.
- [30] Ferré S, Karcz-Kubicha M, Hope BT, Popoli P, Burgueno J, Gutierrez MA, Casado V, Fuxe K, Goldberg SR, Lluís C, Franco R, Ciruela F. Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11940–11945.
- [31] Terrillon S, Barberis C, Bouvier M. Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1548–1553.
- [32] Fuxe K, Agnati LF, Jacobsen K, Hillion J, Canals M, Torvinen M, Tinner-Staines B, Staines W, Rosin D, Terasmaa A, Popoli P, Leo G, Vergoni V, Lluís C, Ciruela F, Franco R, Ferré S. Receptor heteromerization in adenosine A2A receptor signaling: relevance for striatal function and Parkinson's disease. *Neurology* 2003;61: S19–S23.
- [33] Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela

EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferre S, Fuxe K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 2002;277:18091–18097.

- [34] AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 2000;407:94–98.
- [35] AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 2001;7:1003–1009.
- [36] Gouldson PR, Snell CR, Bywater RP, Higgs C, Reynolds CA. Domain swapping in G-protein coupled receptor dimers. *Protein Eng* 1998;11:1181–1193.
- [37] Gouldson PR, Higgs C, Smith RE, Dean MK, Gkoutos GV, Reynolds CA. Dimerization and domain swapping in G-proteincoupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology* 2000;23:S60–S77.
- [38] Maggio R, Vogel Z, Wess J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3103–3107.
- [39] Monnot C, Bihoreau C, Conchon S, Curnow KM, Corvol P, Clauser E. Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants. *J Biol Chem*

1996;271:1507–1513.

- [40] Tsuji Y, Shimada Y, Takeshita T, Kajimura N, Nomura S, Sekiyama N, Otomo J, Usukura J, Nakanishi S, Jingami H. Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J Biol Chem* 2000;275:28144–28151.
- [41] Romano C, Miller JK, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, Goldberg MP, O' Malley KL. Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol Pharmacol* 2001;59:46–53.
- [42] Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, Bai M. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J Biol Chem* 2001;276:5316–5322.
- [43] Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 1998;396:683–687.
- [44] Ng GY, O' Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P, George SR. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:200–204.
- [45] Guo W, Shi L, Javitch JA. The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer. *J Biol Chem* 2003;278:4385–4388.

- [46] Lee SP, O' Dowd BF, Rajaram RD, Nguyen T, George SR. D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry* 2003;42:11023–11031.
- [47] Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Stein T, Prezeau L, Blahos J, Pin J, Froestl W, Kuhn R, Heid J, Kaupmann K, Bettler B. C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci* 2001;21:1189–1202.
- [48] Jones S, Thornton JM. Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches. *J Mol Biol* 1997;272:121–132.
- [49] Jones S, Thornton JM. Prediction of protein-protein interaction sites using patch analysis. *J Mol Biol* 1997;272:133–143.
- [50] Ofraan Y, Rost B. Predicted protein-protein interaction sites from local sequence information. *FEBS Lett* 2003;544:236–239.
- [51] Lichtarge O, Bourne HR, Cohen FE. An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J Mol Biol* 1996;257:342–358.
- [52] Madabushi S, Yao H, Marsh M, Kristensen DM, Philippi A, Sowa ME, Lichtarge O. Structural clusters of evolutionary trace residues are statistically significant and common in

proteins. *J Mol Biol* 2002;316:139–154.

- [53] Dean MK, Higgs C, Smith RE, Bywater RP, Snell CR, Scott PD, Upton GJ, Howe TJ, Reynolds CA. Dimerization of G-proteincoupled receptors. *J Med Chem* 2001;44:4595–4614.
- [54] Jordan BA, Cvejic S, Devi LA. Opioids and their complicated receptor complexes. *Neuropsychopharmacology* 2000;23:S5–S18.
- [55] Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 1999;399:697–700.
- [56] George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O' Dowd BF. Oligomerization of mu- and delta opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 2000;275:26128–26135.
- [57] Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 2000;20:RC110.
- [58] Jordan BA, Trapaidze N, Gomes I, Nivarthi R, Devi LA. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:343–348.
- [59] Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem*

2000;275:7862–7869.

- [60] George SR, Lee SP, Varghese G, Zeman PR, Seeman P, Ng GY, O' Dowd BF. A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. *J Biol Chem* 1998;273:30244–30248.
- [61] Soyer OS, Dimmic MW, Neubig RR, Goldstein RA. Dimerization in aminergic G-protein-coupled receptors: application of a hidden-site class model of evolution. *Biochemistry* 2003;42:14522–14531.
- [62] Gouldson PR, Dean MK, Snell CR, Bywater RP, Gkoutos G, Reynolds CA. Lipid-facing correlated mutations and dimerization in G-protein coupled receptors. *Protein Eng* 2001;14:759–767.
- [63] Landgraf R, Fischer D, Eisenberg D. Analysis of heregulin symmetry by weighted evolutionary tracing. *Protein Eng* 1999;12:943–951.
- [64] Madabushi S, Gross AK, Philippi A, Meng EC, Wensel TG, Lichtarge O. Evolutionary trace of G protein-coupled receptors reveals clusters of residues that determine global and class-specific functions. *J Biol Chem* 2004;279:8126–8132.
- [65] Hannenhalli SS, Russell RB. Analysis and prediction of functional sub-types from protein sequence alignments. *J Mol Biol* 2000;303:61–76.
- [66] Gu X. Maximum-likelihood approach for gene family

evolution under functional divergence. *Mol Biol Evol* 2001;18:453–464.

- [67] del Sol Mesa A, Pazos F, Valencia A. Automatic methods for predicting functionally important residues. *J Mol Biol* 2003;326:1289–1302.
- [68] Mihalek I, Res I, Lichtarge O. A family of evolution-entropy hybrid methods for ranking protein residues by importance. *J Mol Biol* 2004;336:1265–1282.
- [69] Hannehalli SS, Russell RB. Analysis and prediction of functional sub-types from protein sequence alignments. *J Mol Biol* 2000;303:61–76.
- [70] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000;289:739–745.
- [71] Okada T, Fujiyoshi Y, Silow M, Navarro J, Landau EM, Shichida Y. Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5982–5987.
- [72] Zeng FY, Wess J. Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. *J Biol Chem* 1999;274:19487–19497.
- [73] Baneres JL, Martin A, Hullot P, Girard JP, Rossi JC, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon

leukotriene B4 binding to recombinant BLT1. *J Mol Biol* 2003;329:801–814.

- [74] Baneres JL, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol* 2003;329:815–829.
- [75] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- [76] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876–4882.
- [77] <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- [78] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001;17:1244–1245.
- [79] Valdar WS, Thornton JM. Protein-protein interfaces: analysis of amino acid conservation in homodimers. *Proteins* 2001;42:108–124.
- [80] Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. A mutation data matrix for transmembrane proteins. *FEBS Lett* 1994;339:269–275.
- [81] Henikoff S, Henikoff JG. Position-based sequence weights. *J Mol Biol* 1994;243:574–578.
- [82] <http://wolf.bms.umist.ac.uk/naccess/naccess.html>

- [83] <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>
- [84] <http://kr.expasy.org/spdbv/>
- [85] McCoy AJ, Chandana Epa V, Colman PM. Electrostatic complementarity at protein/protein interfaces. *J Mol Biol* 1997;268:570–584.
- [86] Bogan AA, Thorn KS. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* 1998;280:1–9.
- [87] Chakrabarti P, Janin J. Dissecting protein–protein recognition sites. *Proteins* 2002;47:334–343.
- [88] Ma B, Elkayam T, Wolfson H, Nussinov R. Protein–protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5772–5777.
- [89] Ofra Y, Rost B. Analysing six types of protein–protein interfaces. *J Mol Biol* 2003;325:377–387.
- [90] Nooren IM, Thornton JM. Structural characterisation and functional significance of transient protein–protein interactions. *J Mol Biol* 2003;325:991–1018.
- [91] Caffrey DR, Somaroo S, Hughes JD, Mintseris J, Huang ES. Are protein–protein interfaces more conserved in sequence than the rest of the protein surface? *Protein Sci* 2004;13:190–202.

- [92] Hu Z, Ma B, Wolfson H, Nussinov R. Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins* 2000;39:331–342.
- [93] Klein C, Brin MF, Kramer P, Sena-Esteves M, de Leon D, Doheny D, Bressman S, Fahn S, Breakefield XO, Ozelius LJ. Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5173–5176.
- [94] Klein C, Gurvich N, Sena-Esteves M, Bressman S, Brin MF, Ebersole BJ, Fink S, Forsgren L, Friedman J, Grimes D, Holmgren G, Kyllerman M, Lang AE, de Leon D, Leung J, Prioleau C, Raymond D, Sanner G, Saunders-Pullman R, Vieregge P, Wahlstrom J, Breakefield XO, Kramer PL, Ozelius LJ, Sealfon SC. Evaluation of the role of the D2 dopamine receptor in myoclonus dystonia. *Ann Neurol* 2000;47:369–373.
- [95] Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Lin R, Baragli A, Colzi A, Griffon N, Corsini GU, Sokoloff P, Levenson R, Vogel Z, Maggio R. D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem* 2001;276:30308–30314.
- [96] Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8606–8611.
- [97] Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K.

Adenosine–dopamine receptor–receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1997;20:482–487.

- [98] Lemmon MA, Flanagan JM, Treutlein HR, Zhang J, Engelman DM. Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha–helices. *Biochemistry* 1992;31:12719–12725.
- [99] Lemmon MA, Flanagan JM, Hunt JF, Adair BD, Bormann BJ, Dempsey CE, Engelman DM. Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha–helices. *J Biol Chem* 1992;267:7683–7689.
- [100] Senes A, Ubarretxena–Belandia I, Engelman DM. The C α –H \cdots O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9056–9061.
- [101] Melnyk RA, Kim S, Curran AR, Engelman DM, Bowie JU, Deber CM. The affinity of GXXXG motifs in transmembrane helix–helix interactions is modulated by long–range communication. *J Biol Chem* 2004; 279:16591–16597.
- [102] Karnik SS, Sakmar TP, Chen HB, Khorana HG. Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8459–8463.
- [103] Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 2004;14:1188–1190.

- [104] Gavel Y, von Heijne G. The distribution of charged amino acids in mitochondrial inner-membrane proteins suggests different modes of membrane integration for nuclearly and mitochondrially encoded proteins. *Eur J Biochem* 1992;205:1207-1215.
- [105] Horn F, Bettler E, Oliveira L, Campagne F, Cohen FE, Vriend G. GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:294-297.
- [106] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D277-280.
- [107] <http://www.mdli.com/downloads/downloadable/index.jsp>
- [108] Sillerud LO, Larson RS. Design and structure of peptide and peptidomimetic antagonists of protein-protein interaction. *Curr Protein Pept Sci.* 2005 Apr;6:151-169.
- [109] Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB. Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 2000;403:274-280.
- [110] McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998;393:333-339.

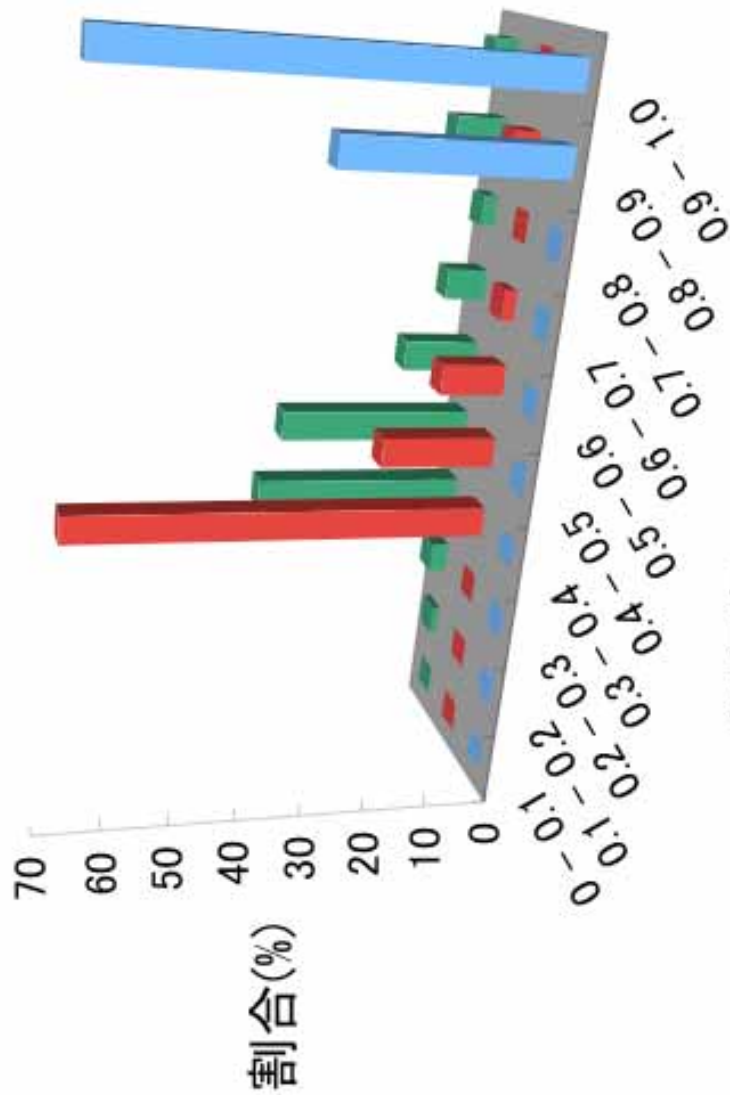
付録

保存度の分布

本研究では、アラインメントサイトを保存サイトと非保存サイトに分離するために閾値 C_t を設けた。その際、閾値を作為的に一つに固定することを避けるために、 C_t の値を 0.5 から 1.0 まで 0.1 刻みで変化させた。しかし、この場合、 C_t 以上の保存度を有するサイトを保存サイトとみなすことが適切であるかどうかを判断する必要がある。そこで、保存度 $Cons(i)$ の分布を調べた。まず、図 a にはオプシンファミリーに関する保存度の分布を示した。予測されたインターフェイス残基中の保存残基の保存度の分布(■)、予測されたインターフェイス残基を除いたインターフェイス候補残基中の保存度の分布(■)、そして、すべてのサイトについての保存度の分布(■)を示している。予測されたインターフェイス残基の保存度の分布は 0.8 ~ 0.9 の区間と 0.9 ~ 1.0 の区間に集中し、他の 2 つの分布からは隔っている。同様に、図 b には D_2R に関する保存度の分布を示した。オプシンの場合とは異なり、予測されたインターフェイス残基の保存度の分布が高い保存度の領域に位置しておらず、0.5 ~ 0.6、0.6 ~ 0.7 の区間に集中しているが、他の 2 つの分布とは異なっている。また図 c には、 β_2AR に関する保存度の分布を示した。これについても予測されたインターフェイス残基中の保存残基の保存度の分布は、他の 2 つの分布とは異なっている。以上のことから、保存度の閾値を 0.5 以上に設定して計算したことは適切であると考えられる。

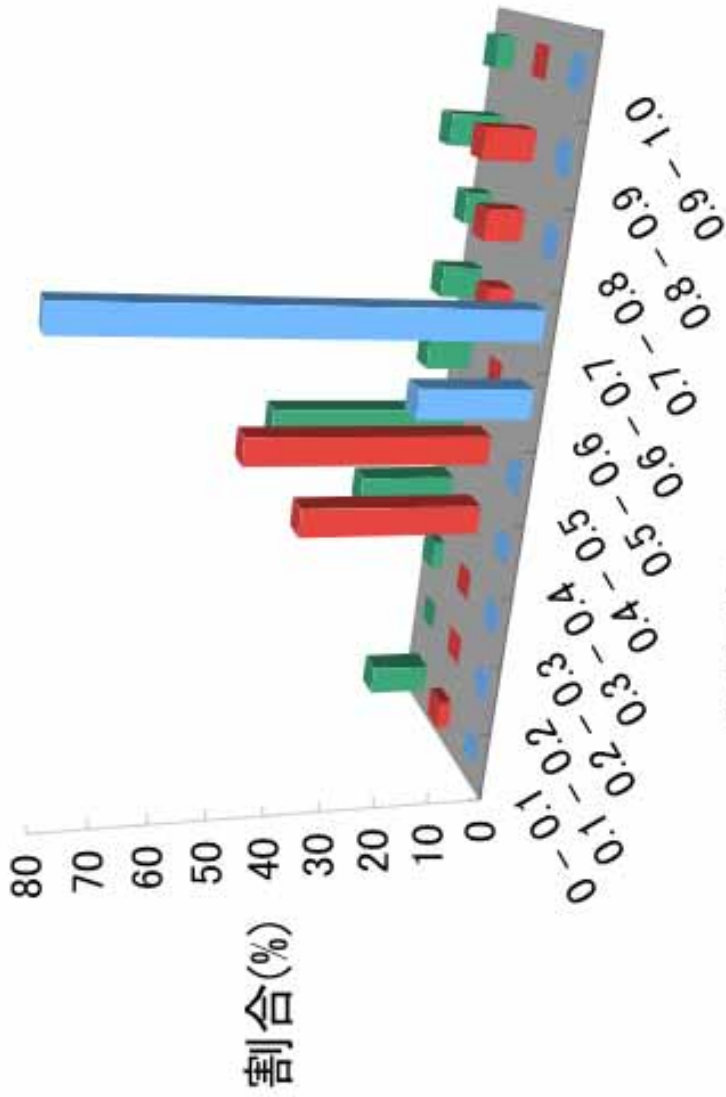
アミノ酸組成

予測されたインターフェイス中の保存残基に対応するサイトでは、どのような残基の頻度が高いかを調べ、サブタイプ内とクラス A GPCR 全体の他の領域(予測されたインターフェイス残基を除いたインターフェイス候補残基・ループ残基・内部残基)における保存サイ



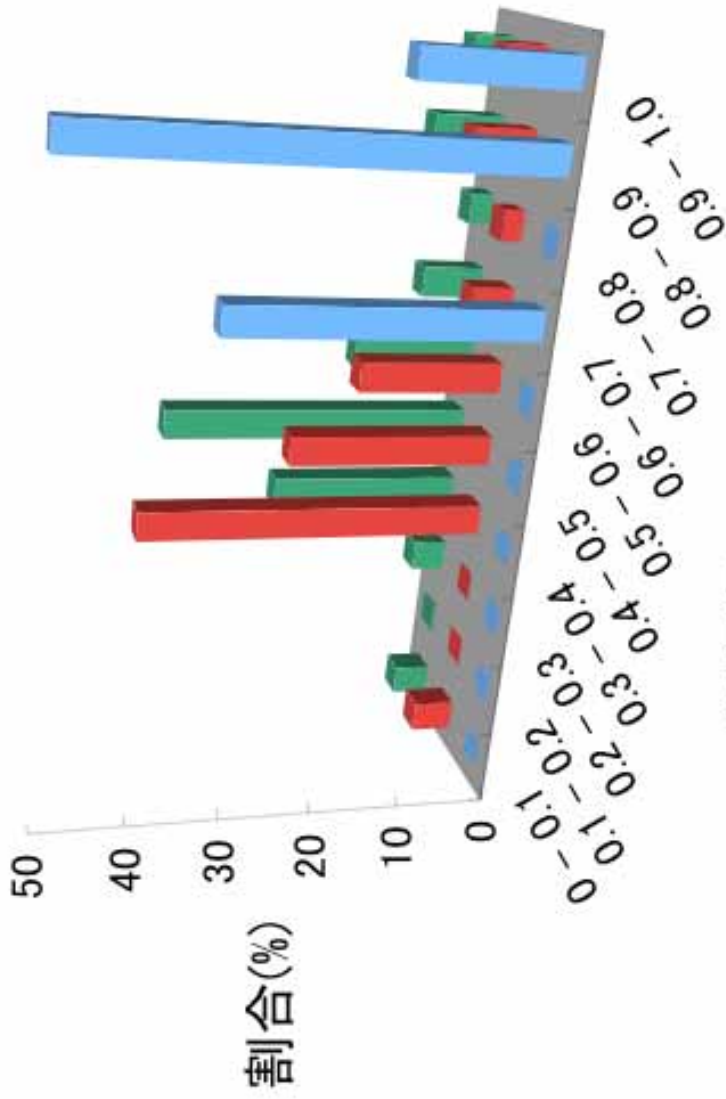
保存度

! "#\$ % & ' () * + , - . / 0 ' 1 ' 2 3 0 2 4 5 6 7 8 9 : - ; < = > ? @ A B 0 ' C , (D 0 E
 F G H - 8 9 F G - 8 9 : - ; < I J K L > ? @ A B 0 ' C , (D 0 E F G M N O B 0 ' C , (D 0 E P Q
 F G H - 8 9 : - ; < I J K L R S T L U V T - 3 0 2 4 W O T - 8 9 : - ; < I J K M X S T O 7 = #



保存度

! " # \$ % & ' () * + , - . / 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` { | } ~ ¡ ¢ £ ¤ ¥ ¦ § ¨ © ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿



保存度

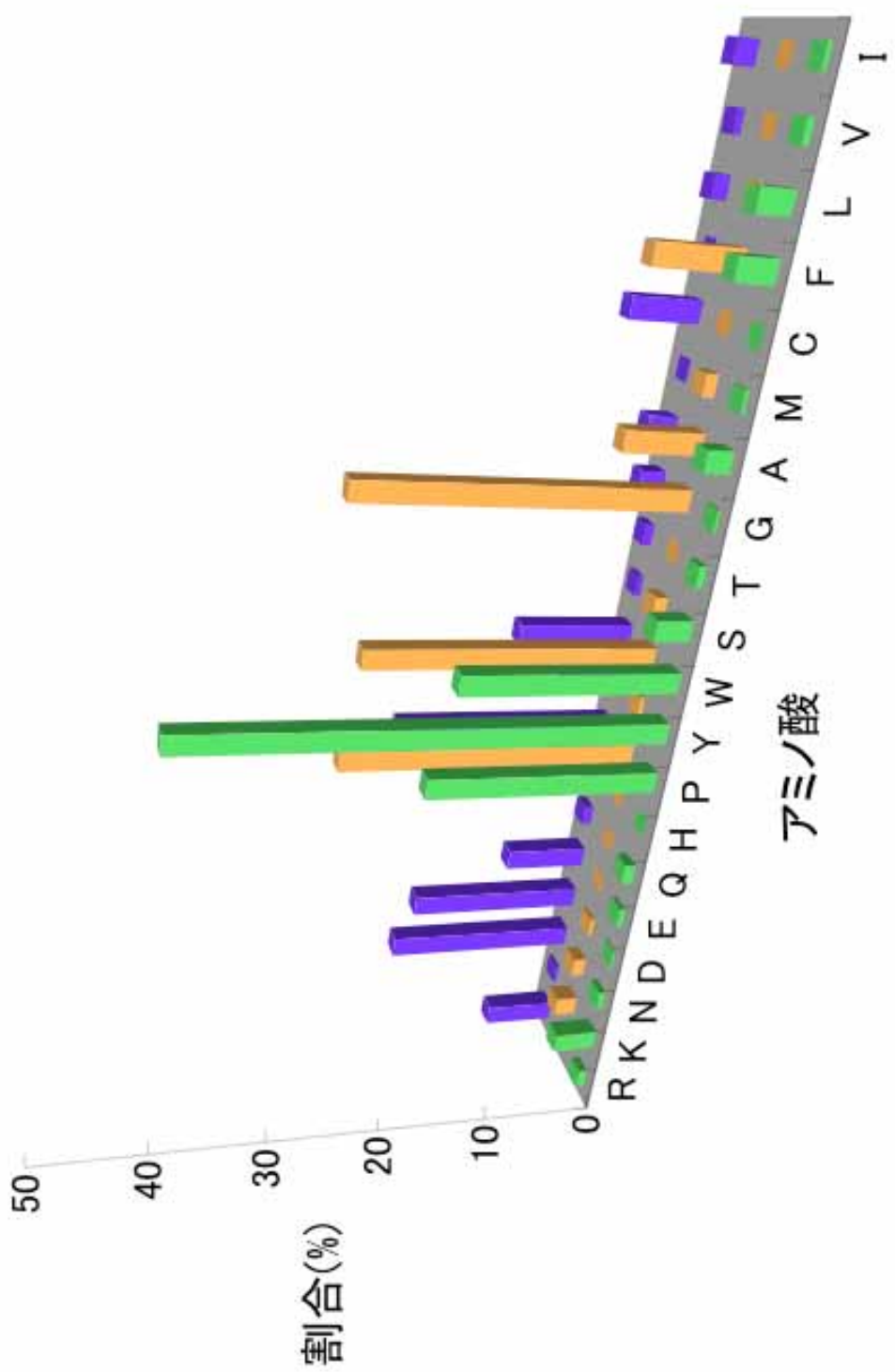
! "#\$ %& ' () * + * , - , . / 0 1 2 3 4 & 5 6 7 8 9 : ; <) * = > ? @) A B C D & 2 3 B
 C & 2 3 4 & 5 6 EF GH 8 9 : ; <) * = > ? @) A LMB CD& 234
 &56E F GH N O P H Q R P & -) , . S K P & 2 3 4 & 5 6 EF GI T O P K 1 7 #

トのアミノ酸組成との比較を行なった。解析に使用した配列のアライメントサイトのうち保存サイトのみに着目し、20種類のアミノ酸の出現頻度を計測した。系統的偏りは、Henikoff らによる重みづけ[81]を用いて補正した。なお、クラス A GPCR 全体の精密なアライメントを作成することは困難なため、簡易的に本研究で使用したオプシン・ドーパミン受容体・アドレナリン受容体・アセチルコリン受容体の配列群をクラス A GPCR 全体の配列とみなして使用した。

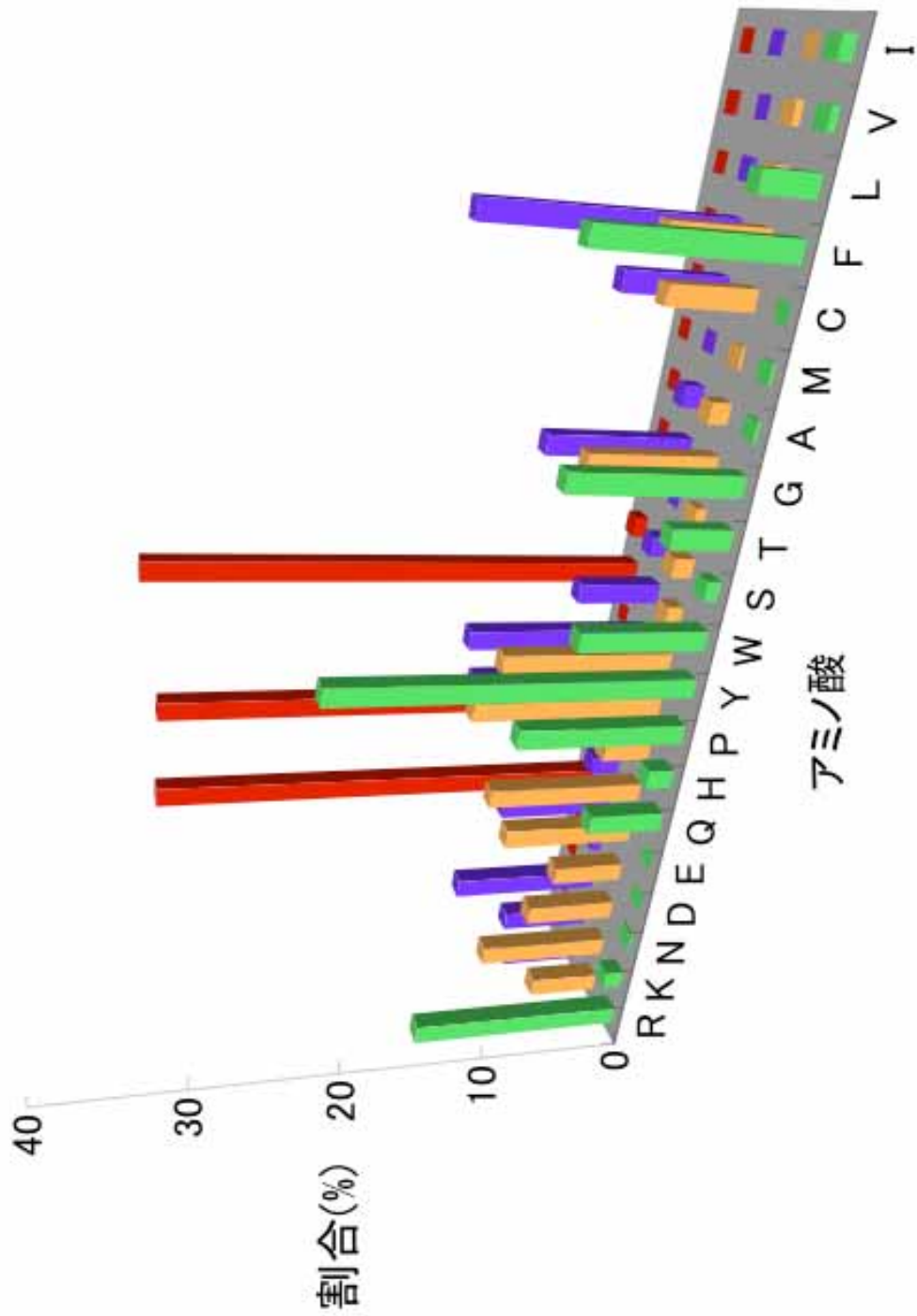
クラス A GPCR 全体では、各領域のアミノ酸組成は図 d のような分布となった。解析に使用したインターフェイス候補残基(表 1)に対応するサイトでは、Tyr、Pro、Trp の保存が多く観測された(■)。ループ残基に対応するサイトでは、Pro、Trp、Gly の保存が多い(■)。内部残基に対応するサイトでは、荷電性のアミノ酸と Trp が同程度観測されている(■)。

上記 3 つの領域において頻出するアミノ酸は、オプシンファミリー内での観測数も多い(図 e)。ただし、オプシンファミリー内の、予測されたインターフェイス残基を除いたインターフェイス候補残基に対応するサイト(■)では、Phe と Arg が多く出現している。ループ残基に対応するサイト(■)では、荷電性のアミノ酸の出現頻度が高い。また、内部残基に対応するサイト(■)では Phe が多い点が GPCR 全体とは異なる。オプシンにおいて、予測されたインターフェイス残基に対応するサイトでは Glu、His、そして、ホットスポット[86]に頻出する Trp が多く観測された(■)。また、図 e から、予測されたインターフェイス内の保存サイトのアミノ酸組成は、他の 3 つの領域(予測されたインターフェイス残基を除いたインターフェイス候補残基・ループ残基・内部残基)におけるアミノ酸組成の分布とは異なっていることが分かる。これらのことから、アミノ酸組成を他の領域とは異なるものに変化させ、さらに、ホットスポット[86]に出現する残基を用いることでインターフェイスが形成されているものと推測される。

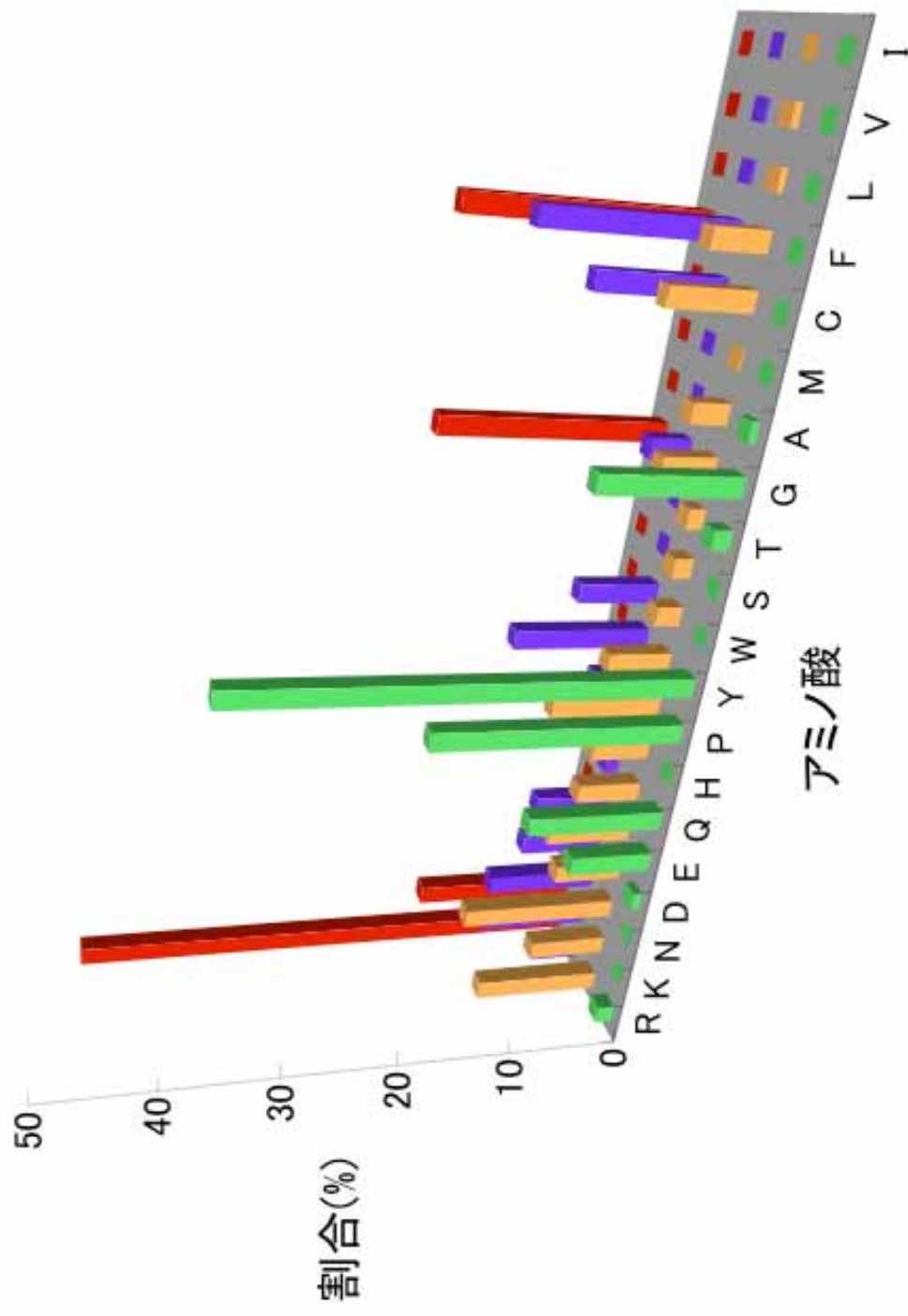
D₂R についても、予測されたインターフェイス内の保存残基に対応するサイトのアミノ酸組成を、他の領域と比較した(図 f)。予測されたインターフェイス残基に対応するサイト(■)には、ホットスポッ



! !"# \$ % & "##\$%&' () * + , - . / 0 1 2 3 4 5 ' 6 ' 7 8 9 : ; < = > ? @ ; & A B C D ' E F G
 * H ; I . / 0 1 2 3 4 JK LM N > O CD ' E F G * H ; I . / 0 1 2 3 4 JK LMP9Q M R SCD ' E
 FG * H ; I . / 0 1 2 3 4 JK IT U 9 Q V * 5 #



! "#\$% & ' () * + , - . / 0 1 2 3 4 5 6 + 7 8 9 : ; ! < . = > ? @ A (B -) C A D E F G H .
 I J K 1 L A M \$NO PQ R - & G H . I J K 1 L A M \$NO PQ S T G H . I J K 1 L A M \$NO PQ U ? V W
 X Y Z @ A (B -) C A D G H 5 6 + 7 8 9 : NO P [\ ? V] 1 ; \$



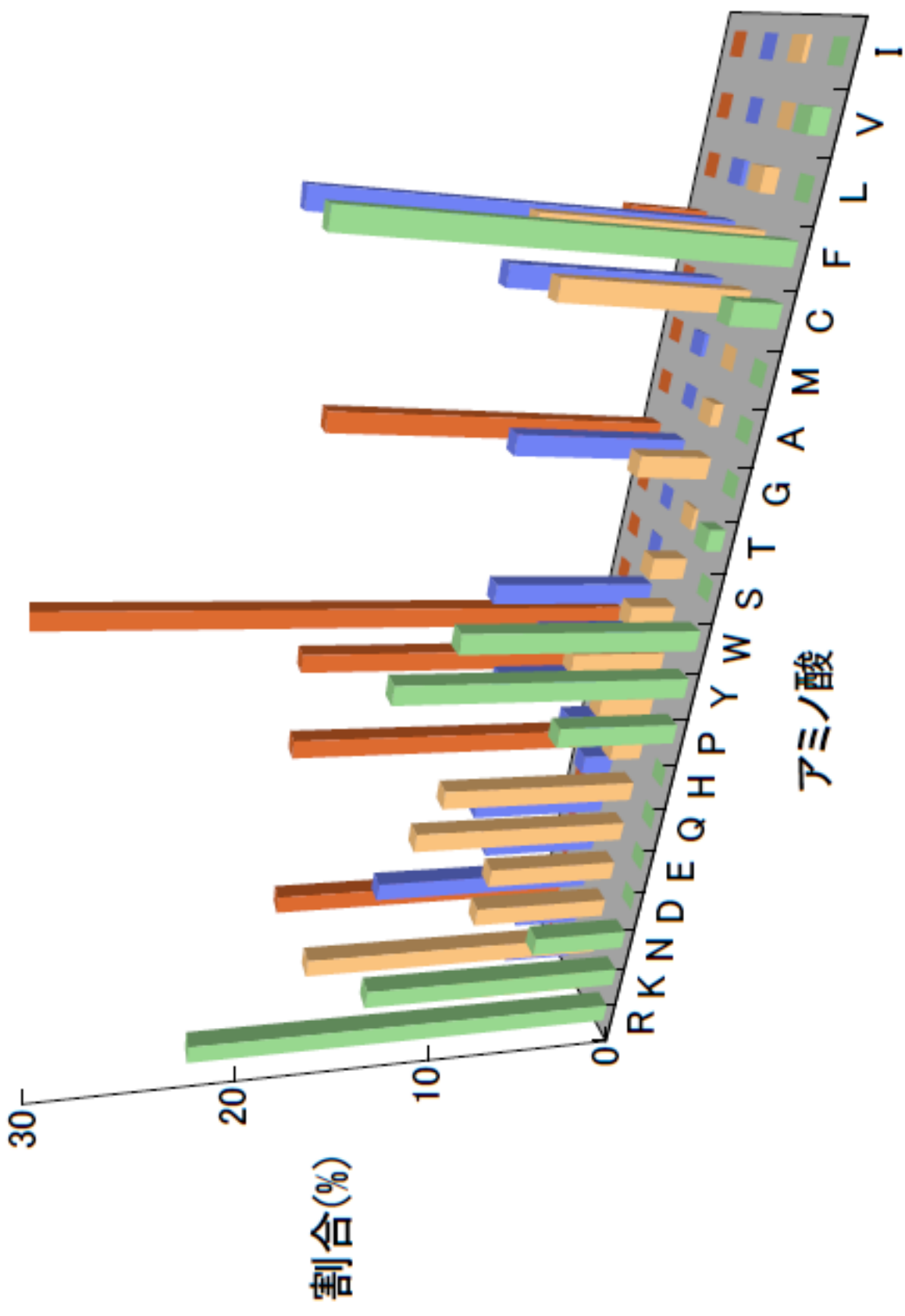
! "#\$ %& ' () * + , - . / 0 1 2 3 4 # 5 & 6 7 8 9 : ; < = > ? : @ A B C D & E F G) H : I
 JK LM N = O C D & E F G) H : I \$JK LM P Q C D & E F G) H : I \$JK LM R 8 S T U V W 9 : ; < =
 > ? : @ C D - . / 0 1 2 3 JK IX Y 8 S Z) 4 \$

トに頻出する Arg が最も多く観測されていることから、Arg をインターフェイスとして利用していることが示唆される。それ以外に、Lys, Gly, Phe などが多く観測されている。予測されたインターフェイス以外の領域のアミノ酸組成はオプシンファミリー(図 e)と類似している。オプシンファミリーの場合と同様に、インターフェイスとそれ以外の領域とでアミノ酸組成を変化させている可能性が示唆される。

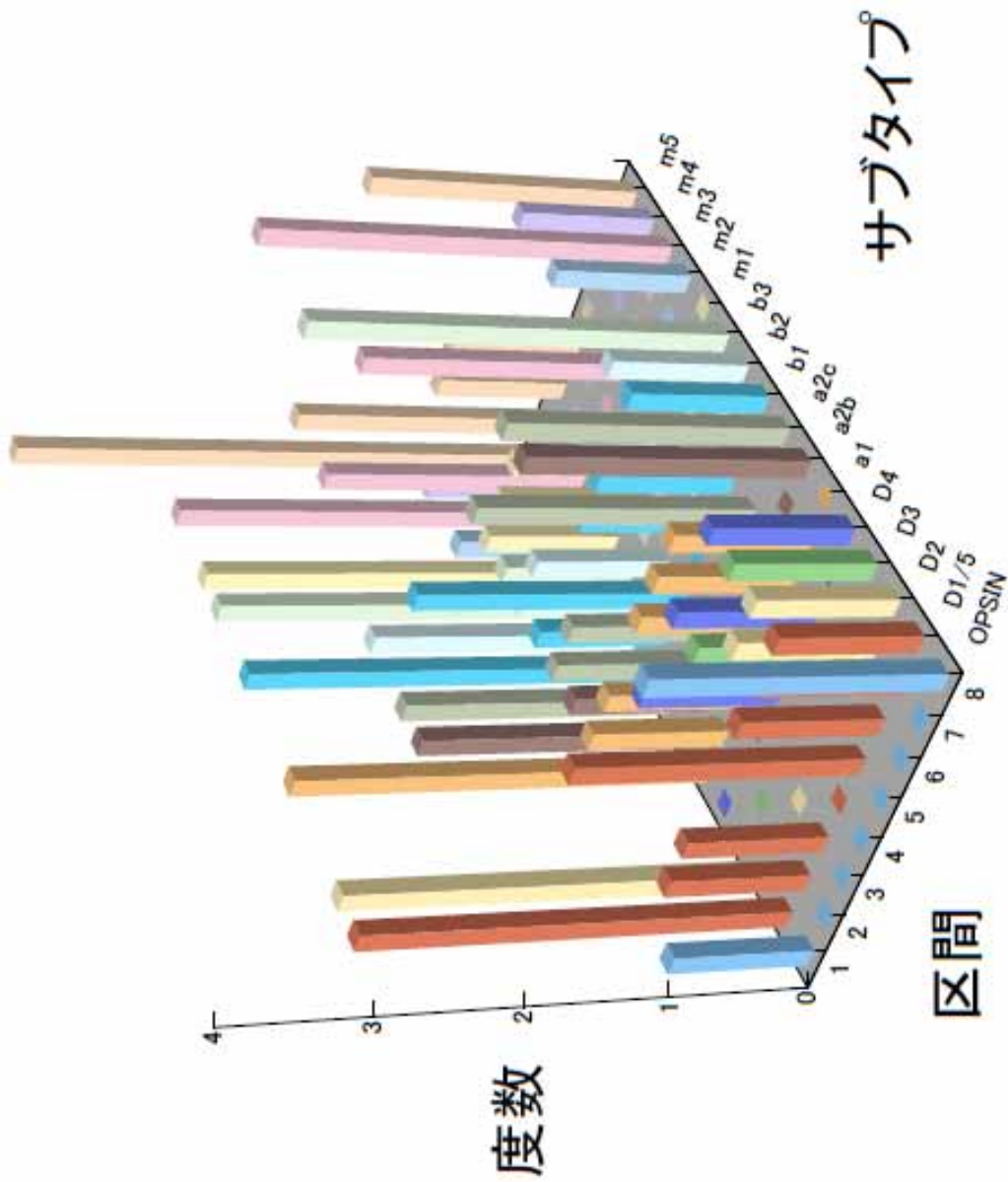
β_2 AR についても同様に、予測されたインターフェイス内の保存残基に対応するサイトのアミノ酸組成を、他の領域と比較した(図 g)。 β_2 AR の予測されたインターフェイス内の保存残基に対応するサイトでは、ホットスポットに頻出する Tyr、ヘリックス間のパッキングに利用される Gly の占める割合が他の領域と比べ顕著に高い(■)。さらに、ホットスポット[86]に出現する Arg に加え、Gln、Pro が多く観測された。予測されたインターフェイス以外の領域のアミノ酸組成はオプシンファミリー(図 e)や D_2 R(付録図 f)と類似している。オプシンファミリーや D_2 R の場合と同様に、インターフェイスとそれ以外の領域とでアミノ酸組成を変化させている可能性が示唆される。

膜平面に垂直な軸方向の残基の分布

本研究において、予測されたインターフェイス残基が、膜に対してどの位置にあるのかを知ることは、その相互作用メカニズムを考える上で重要である。そこで、予測されたインターフェイスに含まれる保存サイトが膜平面に垂直な軸に対してどの位置に現れるかを調べ、ヒストグラムを作成した(図 h)。PDB 座標データを平面上へ射影した際に求めた第一主成分軸上に座標を射影し、細胞内側から細胞外側へ、幅が均等な 8 つの区間を定義した。本研究で使用した 16 のサブタイプ(オプシン、 $D_{1/5}$ R、 D_2 R、 D_3 R、 D_4 R、 α_{1A} R、 α_{2b} AR、 α_{2c} AR、 β_1 AR、 β_2 AR、 β_3 AR、 M_1 R、 M_2 R、 M_3 R、 M_4 R、 M_5 R)について予測されたインターフェイス残基の個数を区間ごとに計測した。図 h から分かるように、膜と細胞質の境界領域(区間 1)、膜と細胞外の境界領域(区間 8)に位置する残基の個数が多く、一方、膜貫通領域の中心部に近



! "#\$% &.' () * + , - . / 0 1 2 3 4 5 # 6 ' 7 8 9 : ; < = > ? @ ; A B C D E ' F G H * I ; J
 K L M N O > P D E ' F G H * I ; J \$ K L M N Q R D E ' F G H * I ; J \$ K L M N S 9 T U V W X ; < = >
 ? @ ; A D E . / 0 1 2 3 4 K L M Y Z 9 T [* 5 \$



! "#\$% & ' () ! * " + , - . / - 0 1 2 3 4 ! " (5 6 7 # 8 9 : ; < = > ? @ A (B * C D 2 \$ % & \n
 E F G H = 9 & ' I J K L M D N (O P D Q R S T O " I (E F 9 K L M : U V W X Y Z U V [X J : \n
] ^ _ * ` a - b c 9 d e M : f g h g - b c (i j k 7 . / - 1 m 9 # 8 M D 2 \$

づくほど数が少ないU字型の分布を示した。ただし、 D_3R と D_4R のように細胞質側の境界領域に保存残基が検出されないタイプのインターフェイスも存在した。このことは、異なる会合様式が存在することを示唆しているものと考えられる。Liangらによるロドプシンのオリゴマー構造に関する報告[26]では、ダイマー化のためのインターフェイスは細胞内側・外側が共にインターフェイス形成に寄与しているが、オリゴマー化のためのインターフェイスでは細胞内側のみが関与しているとされている。このことは今回の解析結果における傾向と一致する。ただし、ロドプシンオリゴマー構造はAFMによる観察をもとにしたモデル構造であるため、今後の詳細な報告を待つ必要がある。

表 a. ドーパミン受容体ファミリーについて予測されたインターフェイス残基。各サブタイプごとに、インターフェイスが予測された時の f 値、 ρ_θ 、 C_t 、予測された残基が示されている。予測された残基番号に対応するヒト配列のアミノ酸を記した。

θ	!"	#\$\$&'0	!_0	
+, -.	/0 +12-3+	02-	0200/	4 5 6 7 '8\$9@: ;<\$=\$>&@ 4 5 C 4 5 6 7 '<MNO%P+. R@-0??1?
*@.	@0 32?-/	02-	020?B	4 5 6 7 '8\$9@: ;<\$=\$>&@ .:&@M:@ 4 5 6 7 '<MNO% *@. R@/A13@/0
*?.	@0 @?2?/A	02/-	02003	4 5 6 7 '8\$9@: ;<\$=\$>&@ .:&@M:@ 4 5 6 7 '<MNO% *?. R@-0??1/
*B.	?0 +32B1B	023	0200A	4 5 6 7 '8\$9@: ;<\$=\$>&@ .:&@M:@ 4 5 6 7 '<MNO% *B. R@B1?A/

表 b. アドレナリン受容体ファミリーについて予測されたインターフェイス残基。各サブタイプごとに、インターフェイスが予測された時の f 値、 p_{θ} 、 C_t 、予測された残基が示されている。予測された残基番号に対応するヒト配列のアミノ酸を記した。

θ	f	# θ	I_{θ}	
$\alpha 1$	*+, +, ., /	++*	+++0	1 2 3 4 '5\$6 \$\beta\$ 88\$:\$:\$&\\$ 1 2 @ A B C(D) D A E D(F) G H C(T) J J F(C) I(C) 1 2 3 4 '9KLM \$\alpha\$, ENDF0+, >*, ?0+, >0>0?0+, >0, ., 0, >?, >/ =+= +=+ =+? =+* =+> =. . > =/ =. =>< =>? =>.
$\alpha 2b$	+=, +*, ., /, ?	++0	+++	1 2 3 4 '5\$6 \$\beta\$ 88\$:\$:\$&\\$ 1 2 @ H H B C R S 1 2 3 4 '9KLM \$\alpha\$=5E9D \$\beta\$<0>/>+* ==* ==. =<+ =<. =<. =< =. =< =. ?
$\alpha 2c$	*+/-, +*	++0	+++	1 2 3 4 '5\$6 \$\beta\$ 88\$:\$:\$&\\$ 1 2 @ E C H H B R J I I E 1 2 3 4 '9KLM \$\alpha\$=TE9D \$\beta\$0+, >*, =<< =?? =<< =<+ =<? =<. =< / <0? <00 <*/
$\beta 1$, 0+, +, -0>	++0	+++, 0	1 2 3 4 '5\$6 \$\beta\$ 88\$:\$:\$&\\$ 1 2 @ C A # B I A B J G H C J D D I 1 2 3 4 '9KLM \$\beta\$, ENDF00., =*0 , 0? =<? =< / =?, =? = ?? ? =>, <+ <=< <., < / <<> <?0 <?* <?>
$\beta 2$	*+, ., - /, =	++*	+++, <	1 2 3 4 '5\$6 \$\beta\$ 88\$:\$:\$&\\$ 1 2 @ A U G H C C J D A 1 2 3 4 '9KLM \$\beta\$=ENDF0+, >*> =? = ?? =? > =. = / ? = / ? = >0 <+ /
$\beta 3$	*+, ., - ., +, /	++*	+++.	1 2 3 4 '5\$6 \$\beta\$ 88\$:\$:\$&\\$ 1 2 @ G E # E V D W R U W 1 2 3 4 '9KLM \$\beta\$3ENDF., =>. , 0, , 0 = , 0 < , 00 , * = , . < , . ? , . 0 = + ,

表 6. ムスカリニクアセチルコリン受容体ファミリーについて予測されたインターフェイス残基。各サブタイプごとに、インターフェイスが予測された時の f 値、 p_θ 、 C_t 、予測された残基が示されている。予測された残基番号に対応するヒト配列のアミノ酸を記した。

θ	f^m	# $\$ \% \& ' /$	i_θ	
*+,	-.	+ / 012. .03	.0..+	4 5 6 7 '8\$9@: <\$=\$>&@ 4 5 B 4 5 6 7 '<HI J' *+, K L M N O P Q R S T U V W X Y Z
*@,	@.	20?A3 .0/	.0.2+	4 5 6 7 '8\$9@: <\$=\$>&@ 4 5 B 4 5 6 7 '<HI J' * @, K L M N O P Q R S T U V W X Y Z
*-,	1.	-0?-2 .0A	.0.--	4 5 6 7 '8\$9@: <\$=\$>&@ 4 5 B 4 5 6 7 '<HI J' * -, K L M N O P Q R S T U V W X Y Z
*2,	@.	20A/3 .0/	.0.2+	4 5 6 7 '8\$9@: <\$=\$>&@ 4 5 B 4 5 6 7 '<HI J' * 2, K L M N O P Q R S T U V W X Y Z
*A,	++.	102@? .0A	.0.+@	4 5 6 7 '8\$9@: <\$=\$>&@ 4 5 B 4 5 6 7 '<HI J' * A, K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

業績リスト

<受賞>

- POSTER AWARD of the year: Nemoto W and Toh H. 14th ScreenTech & TargetTalk 2005 [Sheraton San Diego Hotel & Marina, San Diego, USA, 21-23 March, 2005] Poster Session 「Prediction of GPCR oligomer interface」

<学術雑誌論文>

- Nemoto W, Toh H, “Prediction of interfaces for oligomerizations of G-protein coupled receptors” . *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 58, 644-660, 2005.
- Nemoto W, Imai T, Takahashi T, Kikuchi T and Fujita N. “Detection of Pairwise Residue Proximity by Covariation Analysis for 3D-Structure Prediction of G-Protein-Coupled Receptors” . *The Protein Journal*, 23, 427-435, 2004.
- Hiramoto T, Nemoto W, Kikuchi T and Fujita N, “Construction of hypothetical three-dimensional structure of P2Y1 receptor based on Fourier transform analysis” , *J Protein Chem*, 21, 537-545, 2002.

<総説・解説記事>

- 根本 航、藤 博幸 “Class A GPCR 複合体のインターフェイス予測” , 蛋白質・核酸・酵素 増刊号 生命秩序を担う生体超分子. 50, 1382-1387, 2005.
- 根本 航、藤 博幸 “シリーズ ポストゲノムシーケンス時代の薬理学 3 バイオインフォマティクス” , 日本薬理学会誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 125, 159-164, 2005.

<国際会議>

- Nemoto W and Toh H. International Biophysics Congress [Montpellier, France, 27 August – 1 September, 2005] Poster Session 「Prediction of Interfaces for oligomerization of GPCRs
- Nemoto W and Toh H. 14th ScreenTech & TargetTalk 2005 [Sheraton San Diego Hotel & Marina, San Diego, USA, 21 – 23 March, 2005] Poster Session 「Prediction of GPCR oligomer interface」 (POSTER AWARD of the year)
- Nemoto W, Toh H. The Pacific Symposium for Biocomputing (PSB) 2005. [The Fairmont Orchid, Big Island of Hawaii, 4 – 8 January, 2005] Poster Session 「Prediction of interfaces for GPCRs oligomer」
- Nemoto W, Toh H. The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science [Pacifico Yokohama, Japan, 14 – 18 April, 2004] Poster Session 「Prediction of interfaces for the class A GPCR oligomerization」
- Nemoto W, Toh H. “Prediction of Interfaces for GPCR Oligomer” , *Genome Informatics*, 14, 512–513, 2003.
- Nemoto W, Imai T, Kikuchi T and Fujita N. “Application of Covariation Analysis in 3D Structure Prediction of G-Protein Coupled Receptors” , *Genome Informatics*, 13, 336–337, 2002.
- Hiramoto T, Nemoto W, Yamamoto M and Fujita N. The 4th International Congress of Structural Biology [Vienna, Oesterreich, 5 – 9 September, 2001], “Construction of 3D structures of purinoceptors by using Fourier transform analysis”

<国内学会>

- Nemoto W and Toh H. 第 5 回日本蛋白質科学会年会 [福岡国際会議場, 福岡, 30 June – 2 July, 2005] Poster Session 「Analysis of interfaces for membrane protein complexes」
- Nemoto W, Toh H. 第 42 回日本生物物理学会年会 [京都国際会館, 京都, 13 – 15 December, 2004] Poster Session 「G タンパク質共役型受容体がオリゴマー化する際のインターフェース予測手法の開発と、Class A GPCRs への適用」
- Nemoto W, Toh H. 第 26 回日本分子生物学会年会 [神戸ポートアイランド, 神戸, 8 – 11 December, 2004] Poster Session 「Database for GPCRs Interaction Partners -GRIP-」
- Nemoto W, Toh H. 第 25 回日本分子生物学会年会 [神戸ポートアイランド, 神戸, 10 – 13 December, 2003] Poster Session 「G タンパク質共役型受容体オリゴマーの相互作用インターフェースの予測」

<研究会発表>

- Nemoto W and Toh H. NAIST 21st Century COE Program International Symposium [Nara Public Hall, Nara, 17–19 January, 2005] Oral Presentation & Poster Session 「Prediction of interfaces for GPCR oligomers」
- Nemoto W, Toh H. 科学研究費補助金特定領域研究「膜インターフェイス」“Molecular Soft Interactions at Membrane Interface” 第 2 回公開シンポジウム [ホテル阪急エキスポパーク, 大阪, 4 August, 2004] Poster Session 「Prediction of interface for GPCRs oligomer」
- Nemoto W, Toh H. Systems Analysis of Biological Processes [University of Minnesota, Minnesota, USA, 22 – 23 July, 2004]

Poster Session 「Prediction of interface for GPCR oligomer」

- Nemoto W, Toh H. The 4th International Workshop on Bioinformatics and Systems Biology [PALULU Plaza KYOTO, Japan, 1 – 3 June, 2004] Poster Session 「GPCR-GPCR interfaces are conserved on structure than the rest of surface」
- Nemoto W, Toh H. Frontiers in Bioinformatics: Structure, Interaction and Function [Event Hall, Kyoto City International Foundation, Japan, 10 February, 2004] Poster Session 「Prediction of interface for GPCR oligomer」
- Nemoto W, Toh H. 2nd NAIST Bio-COE International Symposium, Molecular Network in Cellular Signal Transduction and Environment Responses [NAIST, Japan, 19 – 20 January, 2004] Poster Session 「Prediction of Interfaces for GPCRs oligomer」

