

平成 30 年 9 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08268

研究課題名(和文) 睡眠制御薬の合理的開発に資する活性型/不活性型オレキシン受容体結晶構造の差分析

研究課題名(英文) Differential analysis of the crystal structures of active / inactive orexin receptor contributing to rational development of sleep control drug

研究代表者

寿野 良二 (Suno, Ryoji)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：60447521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はOX1RやOX2Rの活性型、不活性型の結晶構造を決定することを最終的な目的としている。選択的アンタゴニストEMPA結合型OX2Rの構造を決定でき、EMPAの選択性の分子機構を詳細に解明することができた。OX1R、OX2Rの立体構造が明らかになったことから、構造情報をもとにした薬剤開発に有益な情報をもたらすことができた。また、研究期間中に様々なOX2Rの立体構造認識抗体を取得でき、現在までにその一つがシグナル伝達を阻害する機能性抗体であった。今後はナルコレプシー治療薬開発を目指した研究の一環として活性型OX2Rの構造決定が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our goal is to determine the active and inactive crystal structures of OX1R and OX2R. We determined the structure of the selective antagonist EMPA-bound OX2R, and revealed the molecular mechanism of the selectivity of EMPA in detail. As the three-dimensional structure of OX1R and OX2R became clear, it was possible to provide useful information for drug development based on structural information. In addition, various tertiary structure-recognizing antibodies can be obtained during the research period, and one of them has been a functional antibody that inhibits signal transduction up to now. In the future, structure determination of active OX2R is expected as a part of research aimed at developing therapeutic drug for narcolepsy.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヒト膜受容体 GPCR シグナル伝達 X線結晶構造解析 抗体 薬剤開発 ナルコレプシー

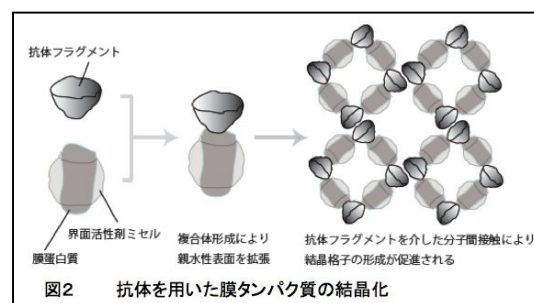
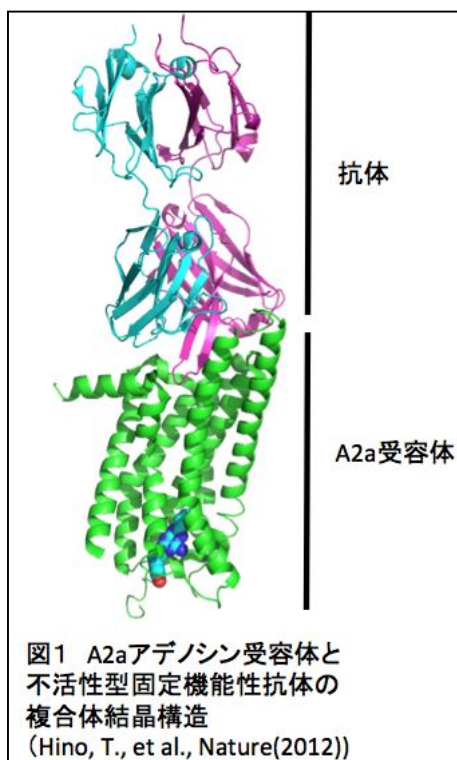
1. 研究開始当初の背景

「ナルコレプシー」は強烈な眠気の発作を主な症状とする脳疾患（睡眠障害）である。この疾患は時と場所を選ばず突然眠りに落ちてしまうため、例えば自動車運転中の居眠り事故を起こす危険性ははらんでいる。この疾患は日本では人口の0.16%罹患しており、これは世界平均0.05%と比較して大幅に多い。G蛋白質共役受容体(GPCR)の一種であるオレキシン受容体(OX1R, OX2R)は1998年に連携研究者の柳沢正史教授らに発見された。食欲や睡眠の制御を行い、特にナルコレプシーの発症に関わることを解明した。脊椎動物は睡眠と覚醒を繰り返して生活しているが、オレキシンA及びオレキシン受容体は覚醒を安定する効果があることが明らかされている。これらのことから近年、オレキシン受容体の覚醒・睡眠制御における役割に注目が集まっており、薬剤開発に重要な要素であるオレキシン受容体の詳細な構造情報の取得が待たれている。

2. 研究の目的

研究開始当初、オレキシン受容体の構造に関する報告はなく、OX1R, OX2Rのリガンド結合及びシグナル伝達に関わる分子機構は全く不明であった。これらの構造を決定

することで、ナルコレプシーに有効な治療薬の開発に重要な情報を提供することができる。具体的には2つのサブタイプの構造をそれぞれ決定することで、その分子メカニズムを比較検討でき、サブタイプ特異的な副作用のないリガンド開発に重要な知見を得ることができる。さらにオレキシン受容体の活性型、不活性型の構造を決定することで、それぞれの反応状態にシフトするリガンドの開発にも情報を提供できる。そのためには構造のある反応状態に固定化が必要があるが、その手段として機能性抗体を用いた構造解析が知られている。つまり、特定の構造を認識する抗体を取得してその抗原との複合体構造を決定することによって、特定の反応状態を固定化した構造を決定することができる。我々の研究室では機能性抗体を用いてA2aアデノシン受容体を不活性型に固定化した結晶構造を決定した実績がある(図1)。GPCRの構造解析では我々の研究室は実績があり、抗体を用いたX線結晶構造解析においては世界有数の技術と知識を有する(図2)。本研究ではOX1R, OX2Rの様々な反応状態の構造を機能性抗体など様々なツールを用いて決定し、シグナル伝達に関する分子機構を解明するとともに構造情報を元にした薬剤開発に貢献することを目的としている。



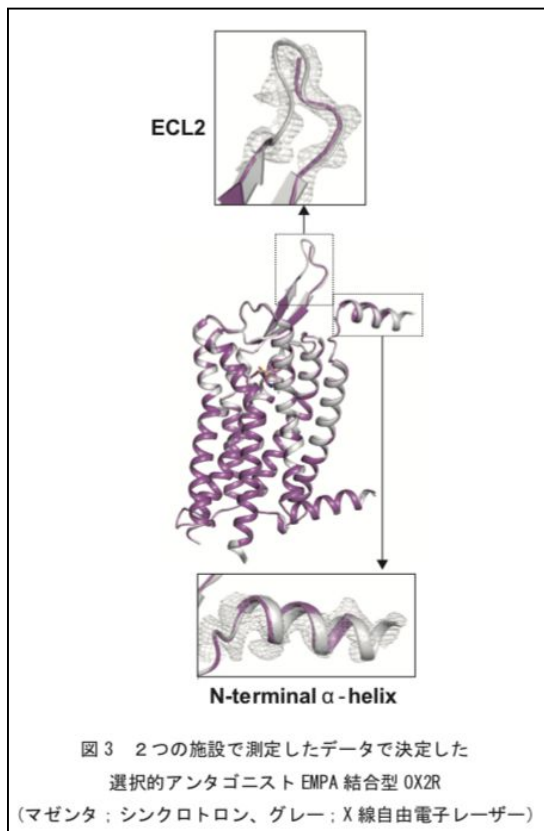
3. 研究の方法

膜タンパク質にモノクローナル抗体を結合させて親水性領域を付加することで膜タンパク質の結晶化のパッキングを向上する効果もあり、分解能の高いX線回折データを取得できる。また、膜タンパク質の構造解析で有効な手法として、脂質キュービック法(LCP法)が知られている。研究代表者は研究協力者であり、この分野の世界有数の

研究者であるスタンフォード大学の Brian Kobilka 教授の研究室でそのノウハウを身につけた。GPCR の結晶化は構造的に揺らぎが大きい GPCR の第三細胞内ループを T4 リゾチームなど安定な領域に置換することと脂質キュービック相法 (LCP 法) が有効であることが知られている。申請者らはこれらの手法を用いてアンタゴニスト存在下の OX2R の結晶をすでに得ていた。実際にこの領域に様々な融合体を導入することにより受容体の構造を安定化し、結晶化サンプルとした。これらの技術を総合して、OX1R、OX2R の活性型、不活性型構造を決定する。

4. 研究成果

我々は選択的アンタゴニスト結合型の OX2R の結晶構造を放射光と X 線自由電子レーザーを用いて、それぞれ 1.96Å、2.3Å 分解能で決定できた (図 3)。それらの内容をまとめて論文を執筆、投稿し、Structure に出版した。Rosenbaum らのグループが決定した選択的アンタゴニスト結合型の OX1R 構造と比較することで、EMPA の選択性の分子機構を詳細に解明することがで



きた。OX1R、OX2R の立体構造が明らかになったことから、構造情報をもとにした薬剤開発に有益な情報をもたらすことができた。今後はナルコレプシー治療薬開発を目指した研究の一環として活性型 OX2R の構造決定が期待される。一般に活性型 GPCR 構造は不活性型構造より、GPCR の動きが大きくなるので結晶化が難しいと考えられている。立体構造認識抗体が得られたことで構造を安定化でき、構造決定に有効なツールとなることが期待される。研究期間中に得られた抗体のうち、ひとつは OX2R 発現細胞に対するシグナル伝達の効果を検討したところ、シグナルを阻害するインバースアゴニスト能を有することがわかった。今後は、さらにスクリーニングを進めて、活性型構造決定に有用な抗体について検討する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Suno R, Terakado Kimura K, Nakane T, et al. (著者 24 名中 1 番目) "Crystal structures of human orexin 2 receptor bound to the subtype-selective antagonist EMPA" *Structure*, 26, 7-19 (2018) 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

Ryoji Suno, Shoji Maeda, Satoshi Yasuda, Sangbae Lee, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Shoichiro Horita, Maki S. Tawaramoto, Hirokazu Tsujimoto, Takeshi Murata, Masahiro Kinoshita, Nagarajan Vaidehi, Masaki Yamamoto, Brian K Kobilka, So Iwata, Takuya Kobayashi, "Crystal structure of rationally thermostabilized M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to the subtype selective antagonist AF-DX 384." GPCR workshop, Hawaii, U.S., 2017

Ryoji Suno, Kunio Hirata, Keitaro Yamashita, Hirokazu Tsujimoto, Maki S. Tawaramoto, Masaki Yamamoto, Daniel M. Rosenbaum, So Iwata, Takuya Kobayashi, "High-resolution crystal structures of human orexin 2 receptor bound to a selective antagonist EMPA." GPCR workshop, Hawaii, U.S., 2015

Ryoji Suno, Kanako Terakado Kimura, Takanori Nakane, Keitaro Yamashita, Junmei Wang, Takaaki Fujiwara, Yasuaki Yamanaka, Dohyun, Im, Shoichiro Horita, Hirokazu Tsujimoto, Maki S. Tawaramoto, Takatsugu Hirokawa, Eriko Nango, Kensuke Tono, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Yasumasa Joti, Makina Yabashi, Keiko Shimamoto, Masaki Yamamoto, Daniel M. Rosenbaum, So Iwata, Tatsuro Shimamura, and Takuya Kobayashi, "High-resolution crystal structures of human orexin 2 receptors bound to a selective antagonist EMPA." The 42nd Naito conference, Sapporo, 2016

Ryoji Suno, Kanako Terakado Kimura, Takanori Nakane, Keitaro Yamashita, Junmei Wang, Takaaki Fujiwara, Yasuaki Yamanaka, Dohyun, Im, Shoichiro Horita, Hirokazu Tsujimoto, Maki S. Tawaramoto, Takatsugu Hirokawa, Eriko Nango, Kensuke Tono, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Yasumasa Joti, Makina Yabashi, Keiko Shimamoto, Masaki Yamamoto, Daniel M. Rosenbaum, So Iwata, Tatsuro Shimamura, and Takuya Kobayashi, "Crystal structures of human orexin 2 receptors bound to the subtype-selective antagonist EMPA." 第 17 回日本蛋白質科学会年会、仙台、2017 年 6 月 20 日~22 日

Ryoji Suno, Hirokazu Tsujimoto, Maki

S. Tawaramoto, Kunio Hirata, Keitaro Yamashita, Masaki Yamamoto, Brian K Kobilka, So Iwata, Takuya Kobayashi, "X-ray crystallographic analysis of Muscarinic acetylcholine M2 receptor bound with N-methyl scopolamine (NMS)" 第 16 回日本蛋白質科学会年会、福岡、2016 年 6 月 20 日~22 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寿野 良二 (SUNO, Ryoji)
京都大学 医学研究科・特定助教
研究者番号：60447521

(2) 研究分担者

野村 紀通 (NOMURA Norimichi)
京都大学 医学研究科・助教
研究者番号：10314246

(3) 連携研究者

小林 拓也 (KOBAYASHI Takuya)
京都大学 医学研究科・准教授
研究者番号：20311730

柳沢 正史 (Masashi Yanagisawa)
筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構・教授

研究者番号：20202369

斎藤 毅 (Tsuyoshi Saitoh)
筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構・助
教
研究者番号： 80609933

(4)研究協力者
Brian K Kobilka (Brian K Kobilka)
スタンフォード大学 医学部・教授