

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14634

研究課題名（和文）エンドセリン受容体のシグナル伝達複合体の構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of endothelin receptors in complex with G-proteins

研究代表者

志甫谷 渉 (Shihoya, Wataru)

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・特別研究員

研究者番号：30809421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：エンドセリン受容体B型とB型選択的作動薬や部分作動薬、逆作動薬との複合体構造を決定した。G蛋白質との複合体の構造解析に向けては、受容体とGi蛋白質との複合体形成に成功した。PAC1受容体は神経に存在するGPCRであり、内在性ペプチドPACAPにより活性化される。PAC1受容体は摂食制御、精神疾患、涙液分泌において重要な役割を果たしており、有望な創薬標的である。そこで、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって、PACAP、ヒト由来PAC1受容体およびGs蛋白質からなるシグナル伝達複合体の構造を決定した。複合体構造からは、PAC1受容体によるPACAP認識機構の詳細が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAC1受容体は類似受容体VPAC1やVPAC2が存在するため、PAC1受容体選択的な薬剤の創出が困難だった。本研究により、PAC1受容体は細胞外ドメインによりリガンドの親和性を高める一方で、その受容体膜貫通部位との相互作用のみにより受容体可能であることが明らかになった。今後は、本構造情報を活用した、PAC1受容体の膜貫通部位と選択的に相互作用できる低分子薬剤の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：We determined the structure of the human ETB receptor in complex with ETB selective drugs. These structures elucidated the structural basis for the ETB-selective binding of the compounds. We have successfully formed a complex between the ETB receptor and Gi protein. PAC1R is a neural GPCR and is activated by the endogenous peptide PACAP. PAC1R plays an important role in feeding control, psychiatric disorders, and lacrimal fluid secretion and is a promising drug target. In this study, we determined the structure of the signaling complex consisting of PACAP, human PAC1 receptor, and Gs protein by single-particle analysis using cryo-electron microscopy. This structure revealed the detail of the PACAP recognition mechanism.

研究分野：構造生物学

キーワード：GPCR クライオ電子顕微鏡 PACAP G蛋白質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19(共通)

1. 研究開始当初の背景

GPCR は 7 回膜貫通型の受容体であり、ヒトにおいて 800 を超える種類が存在する。GPCR は発生や神経伝達、臭い・光の感知や血圧制御など、人間のありとあらゆる生命現象に関与しており、それ故重要な創薬標的である。GPCR は種類に応じて、モノアミンや脂質、ペプチドホルモン、蛋白質といった様々なシグナルを細胞外側に面している結合ポケットで受容し、構造変化を起こすことで活性化される。活性化した GPCR は、選択的に一つないし複数種類の細胞内に存在する 3 量体 G 蛋白質($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$ サブユニットで構成)を活性化する(図 1)。この過程でシグナルが大きく増幅され、活性化された G 蛋白質が細胞内の蛋白質と相互作用し、下流のシグナル応答へと情報が伝達される。GPCR は G 蛋白質以外にもアレスチンを活性化し、GPCR の内在下に伴うシグナルの脱感作や、アレスチン下流シグナルの活性化に関わっている。

GPCR の G 蛋白質の α サブユニットにはいくつか種類が存在しており、異なる下流のシグナルカスケードをオンにする。 G_s は膜結合型アデニル酸シクラーゼに結合して活性させて cAMP の産生を促す一方、 G_i は逆に cAMP の産生を阻害する。 G_q は分子リレーを介してカルシウム濃度上昇や PKC の活性化する。他にも、 $G_{12/13}$ などが存在している。**大抵の GPCR は選択的にひとつないし複数の G 蛋白質の活性化**する。また、G 蛋白質またはアレスチンどちら一方を選択的に活性化する「バイアス型アゴニスト」も存在している。こうしたシステムが、アゴニスト刺激に伴う複雑な細胞応答を可能としている。

近年、GPCR の構造解析技術の発展に伴い約 40 種類の GPCR 構造が決定され、個々の GPCR の特異的なリガンド受容機構が解明されてきている。一方、GPCR の下流の G 蛋白質の活性化機構、特にシグナル選択性のメカニズムへの知見は乏しい。2011 年に B_2 アドレナリン受容体と G_s の複合体が決定されて以降、複数の GPCR- G_s の複合体構造が X 線結晶構造解析または低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析により決定されている(Rasmussen *et al.*, *Nature*, 2011)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、class A GPCR である**ヒト由来エンドセリン受容体 B 型(ETBR)および PAC1 受容体**に焦点を当てて、その G 蛋白質シグナル伝達の選択性を構造的見地から解明を目指す。具体的には X 線結晶構造解析や低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって、エンドセリン受容体 B 型と B 型選択的薬剤との複合体や、PAC1 受容体と PACAP の複合体構造を解明し、G 蛋白質の活性化メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

エンドセリン受容体 B 型については主に X 線結晶構造解析、PAC1 受容体についてはクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析を行った。PAC1R については、受容体を昆虫細胞で発現精製したのち、miniGsGbetaGgamma 三量体と混合して、シグナル伝達複合体をゲルろ過クロマトグラフィーによって単離した。精製蛋白質をグリッドにのせて、TITAN KRIOS 電子顕微鏡によって粒子を撮影した。その結果、分解能 3.9 Å で構造決定に成功した。

4. 研究成果

(1) エンドセリン受容体と B 型選択的作動薬との複合体の構造解析

エンドセリン受容体拮抗薬は高血圧やがんへの治療薬となる一方で、エンドセリン受容体 B 型選択的作動薬は血管弛緩薬として研究されている。エンドセリン受容体 A 型とは異なり、B 型の活性化は血管弛緩作用を示すためである。現在までに、エンドセリンの一部領域を欠損させて線状ペプチド化した、IRL1620 という B 型選択的作動薬が開発されている。IRL1620 はエンドセリン-1 と同等の親和性で B 型に結合できるのに対して、A 型には全く作用せず、10 万倍以上の高い B 型選択性を示す。IRL1620 は

抗がん剤や放射線治療による効能を高める併用療法として、臨床試験が行われている。B 型選択的作動薬は他にもエンドセリン-3 が存在するが、B 型選択性は 100 倍程度であり弱い。

我々は、エンドセリン受容体 B 型と B 型選択的作動薬である IRL1620 および ET-3 の複合体の結晶化に成功し、それぞれ、分解能 2.7 および 2.0 で構造を決定した(図 1)。特に ET-3 結合型構造については、BL32XU の自動データ収集システム ZOO を使うことで高分解能を追求し、現時点で作動薬結合状態の GPCR 構造の世界最高分解能を誇る。こうした構造から水分子を含めたエンドセリンと受容体の相互作用の詳細が明らかになり、B 型選択性のメカニズムの一端を解明した。詳細な構造比較とそれに指南された機能解析によって、IRL1620 は受容体を完全に活性化できない部分作動薬であることを示した。こうした成果は、IRL1620 には B 型選択的作動薬として改善の余地があることを示すと共に、構造情報に基づいた IRL1620 の改変や低分子化につながる事が評価され、*Nature Communications* 誌に掲載された。

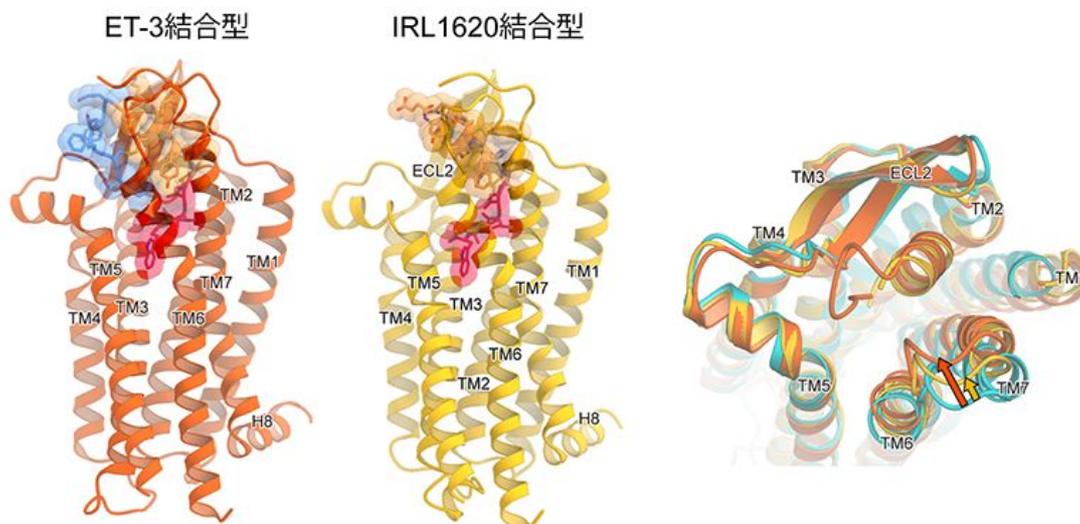


図 1 作動薬結合型のエンドセリン受容体 B 型の構造

(2) エンドセリン受容体と B 型選択的逆作動薬との複合体の構造解析

エンドセリン受容体拮抗薬は、今日までボセンタンを基に開発が進められている。そのため、エンドセリン受容体拮抗薬はみな類似した化合物骨格であり、多様性が少ない。薬理作用は化合物骨格に強く依存するため、エンドセリン受容体拮抗薬のさらなる臨床応用のためには化合物空間の拡張が必要である。ボセンタンとは異なる化合物骨格を持つ拮抗薬に、IRL2500 というものがある。IRL2500 はエンドセリンの C 末端の一部を模倣して作られた拮抗薬であり、ボセンタンとは大きく異なっている。

我々は、IRL2500 の結合様式を理解できれば、ボセンタン以外にも受容体を阻害し得る化合物骨格が同定できると考え、IRL2500 結合型のエンドセリン受容体 B 型の構造を分解能 2.7 で決定した。IRL2500 は ET-1 とは全く異なる結合様式であった。IRL2500 はボセンタンと同様に受容体の正電荷を持つアミノ酸と相互作用していたものの、IRL2500 は受容体の結合ポケットのより深い位置で相互作用しており、強固に不活性化状態を固定していた。このことから我々は、IRL2500 が単なる拮抗薬ではなく受容体の恒常的な活性をも抑制する、逆作動薬ではないかと考えた。機能解析を試みた結果、IRL2500 が逆作動薬であることを解明した。こうした成果はエンドセリン受容体拮抗薬の化合物空間を広げるのみならず、GPCR 一般の動作原理について理解を深めるものと評価され、*Communications Biology* 誌に掲載された。¹

(3) 精神疾患に関わる PAC1 受容体のシグナル伝達複合体の構造解析

PAC1 受容体はクラス B GPCR の一種であり、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) を受容する。PACAP 受容体としては、他にも類縁受容体 VPAC1 や VPAC2 が存在している。PAC1 受容体は中枢神経系および末梢組織に広く存在しており、様々な機能を有している。中でも、PACAP による PAC1 受容体経路の活性化は、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の根底にある異常なストレス応答を引き起こす。また、PAC1 遺伝子の多型は統合失調症と関連している。このことから、PAC1 受容体は多くの精神障害に対する薬物標的として研究されている。さらに PAC1 受容体は涙腺に発現しており、PACAP により活性化されて涙液分泌を促進作用する作用があるため、ドライアイ症候群の創薬標的にもなっている。しかし、PAC1 受容体を標的とした低分子薬剤は存在せず、そのリガンド認識メカニズムと受容体の構造は不明であり、さらなる受容体研究や医薬品開発が阻まれていた。

2018 年度に東京大学に設置されたクライオ電子顕微鏡を用いて PACAP リガンド、ヒト由来 PAC1 受容体、Gs タンパク質三量体からなるシグナル伝達複合体の立体構造を原子分解能で決定した。これにより、PACAP リガンドの認識機構と活性化した受容体によるシグナル伝達メカニズムを解明した。PAC1 受容体の膜貫通領域の構造は第 6 膜貫通ヘリックス (TM6) で大きく折れ曲がり、典型的なクラス B GPCR の活性化型構造を取っていた。

複合体構造中では、PACAP の N 末端側の 14 残基が PAC1 受容体の膜貫通領域と広範な相互作用を形成していた。特に PAC1R の TM1 及び TM7 と密な相互作用を形成しており、これらの相互作用が PACAP の認識に重要であることがわかった。一方で、PACAP は細胞外ドメインとは強固な結合が見られなかった。クラス B GPCR で最もよく研究されているグルカゴン 1 型 (GLP-1) 受容体では、細胞外ドメインとリガンドの強固な相互作用が見られることから、受容体の細胞外ドメインの機能解明を目指した。

PAC1 及び GLP-1 受容体の細胞外ドメインと相互作用できないようリガンドを作製し、東北大学の井上飛鳥准教授との共同研究により、細胞外ドメインの持つ機能の違いを解析した (図 2)。GLP-1 受容体は細胞外ドメインとリガンドの相互作用を失うと受容体の活性化自体が不可能になる一方で、PAC1 受容体では細胞外ドメインとリガンドの相互作用が失われても、全長のリガンドと同レベルまで受容体を活性化できた。これらの結果から、PACAP は PAC1 受容体の膜貫通領域との相互作用だけのみで受容体を完全に活性化可能であることが明らかになった。しかし、細胞外ドメインとの相互作用を失った PACAP リガンドは受容体との親和性が大きく低下することから、PAC1 受容体の細胞外ドメインはリガンドとの高い親和性を生み出すために重要であることが明らかになった。今後は、本構造情報を活用した、PAC1 受容体の膜貫通部位と選択的に相互作用できる低分子薬剤の開発が期待される。

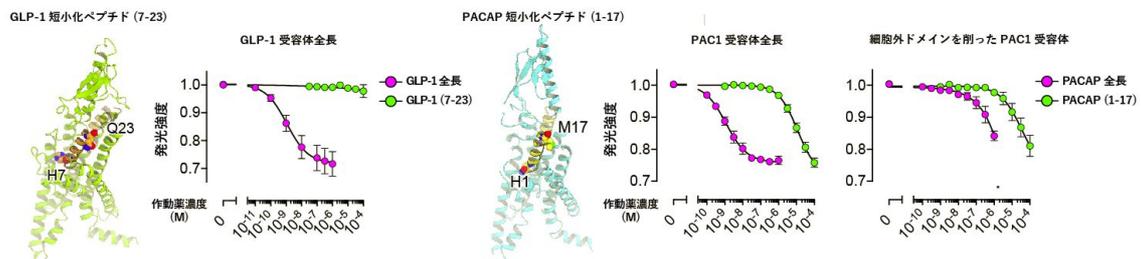


図 3 短小化ペプチドを用いた機能解析

受容体の膜貫通領域と相互作用する短小化ペプチドの機能評価。飛鳥准教授が開発した NanoBit G protein dissociation assay を用いて、発光強度の減少により G タンパク質の活性化能を検出している。GLP-1 短小化ペプチドは全く G タンパク質を活性化できない。一方、PACAP 短小化ペプチドは、量が多く必要だが、PACAP 全長と同程度まで G タンパク質を活性化できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wataru Shihoya, Tamaki Izume, Asuka Inoue, Keitaro Yamashita, Francois Marie Ngako Kadji, Kunio Hirata, Junken Aoki, Tomohiro Nishizawa, Osamu Nureki	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structures of human ETB receptor provide mechanistic insight into receptor activation and partial activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-07094-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagiri Chisae, Shihoya Wataru, Inoue Asuka, Kadji Francois Marie Ngako, Aoki Junken, Nureki Osamu	4. 巻 2
2. 論文標題 Crystal structure of human endothelin ETB receptor in complex with peptide inverse agonist IRL2500	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0482-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Kazuhiro, Shihoya Wataru, Nishizawa Tomohiro, Kadji Francois Marie Ngako, Aoki Junken, Inoue Asuka, Nureki Osamu	4. 巻 27
2. 論文標題 Cryo-EM structure of the human PAC1 receptor coupled to an engineered heterotrimeric G protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 274~280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41594-020-0386-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----