

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06534

研究課題名(和文)GPCRの逆作動薬の合理的設計法の開発に向けて

研究課題名(英文)Toward rational design of inverse agonist of GPCRs

研究代表者

堀 哲哉 (Hori, Tetsuya)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・専任研究員

研究者番号：20344054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナトリウムイオンは、多くのクラスA GPCRの負のアロステリック因子として作用する。同イオン結合部位は、オーステリック結合部位に隣接するが、両結合部位が空間的に繋がっているGPCRもあれば、ナトリウムイオン結合部位が塞がっているGPCRもある。ベンズアミジン基はナトリウムイオンの作用を模倣してGPCRの活性を抑制するので、ベンズアミジン基をもつ化合物はそのGPCRの逆作動薬になり得る。本研究ではナトリウムイオン結合部位が塞がっているGPCRも、ベンズアミジンを含む化合物により活性が抑制され得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナトリウムイオン結合部位は多くのクラスA GPCRに存在し、隣接するオーステリック結合部位のアミノ酸配列は各GPCRで固有なので、ベンズアミジン基がナトリウムイオン結合部位に結合し、他の部位がオーステリック結合部位に結合するbitopicリガンドは、そのGPCRの逆作動薬になると提唱した。本研究は、その結果を受けて、多くのクラスA GPCRでベンズアミジン(派生)基が活性抑制基となり得ることを示すことができたので、創薬ターゲットとなり得るGPCRの逆作動薬の設計を促進することになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A Na<sup>+</sup> serves as a negative allosteric factor for many class-A GPCRs. A Na<sup>+</sup> binding site is located adjacent to an orthosteric binding site, and the two sites are continuous in some GPCRs but discontinuous in the other GPCRs. Since a benzamidine group suppresses a basal activity of GPCR by mimicking the activity of Na<sup>+</sup>, a bound compound with a benzamidine moiety can serve as an inverse agonist for the GPCRs. In this study, we revealed that a benzamidine compound can suppress a basal activity of GPCRs whether the Na<sup>+</sup> and orthosteric binding sites are continuous or not.

研究分野：構造生物学

キーワード：GPCR 逆作動薬 ベンズアミジン派生物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ナトリウムイオンはクラス A GPCR の負のアロステリック因子であることは 1973 年に報告され、それ以来ナトリウムイオンの機能を模倣する官能基を含む化合物はクラス A GPCR の逆作動薬になり得ると提唱されてきたが、実際にそのような化合物が公表されることはなかった。申請者らは、ロイコトリエン B4 受容体 (BLT1) とその逆作動薬である BIIL260 の複合体の結晶構造を解明したが、BIIL260 のベンズアミジン基は BLT1 の Na<sup>+</sup>結合部位に結合し、Na<sup>+</sup>-水分子クラスターが不活性状態の BLT1 の立体構造を安定化させる分子機構をベンズアミジン基が模倣していることを明らかにした。そこで、ベンズアミジン基ならびにその派生物が Na<sup>+</sup>結合部位に結合し、他の部位がオーソステリック結合部位に結合する化合物は、それぞれのクラス A GPCR の逆作動薬になると提唱した。

### 2. 研究の目的

Na<sup>+</sup>結合部位に隣接してオーソステリック結合部位が存在する。不活性状態のクラス A GPCR の構造は少なくとも 55 種報告されているが、22 種は両結合部位が連続した穴として存在するが、27 種は別々の不連続な穴として存在する。つまり、不連続な穴の GPCR は Na<sup>+</sup>結合部位が閉じており、溶媒領域とは隔離されている。その場合、Na<sup>+</sup>結合部位とオーソステリック結合部位に跨って結合するリガンドが実際に当該 GPCR に結合するのかどうか疑問である。そこで、本申請研究では、実際にベンズアミジン基を含む化合物がそのような GPCR にも結合するのかが実験的に検証することにした。

### 3. 研究の方法

実験はすべて TGF- $\alpha$ -shedding アッセイを用いて 3 種の実験を行った。(1) オーソステリック結合部位と Na<sup>+</sup>結合部位が不連続な  $\beta$ 1 アドレナリン受容体 ( $\beta$ 1AR) に対して、 $\beta$ 1AR の既存の逆作動薬であるカラゾロールとリンカーを介してベンズアミジン基を結合させ、アゴニストによる  $\beta$ 1AR 依存的なシグナルに対する同化合物の阻害活性を観察した。(2) また、ベンズアミジン基が最も適した官能基であるかどうか確認するために、基底状態のシグナルがよく観察できた代表的な GPCR として 5-HT<sub>2B</sub> セロトニン受容体に対し、7 種のベンズアミジン派生物を対象に、アゴニスト依存的活性と基底状態の活性に対する阻害能を確認した。(3) 最後に、196 種のクラス A GPCR に対して、(2) で使用したベンズアミジン派生物が基底状態の活性を抑制することを確認した。この実験では、2 種の濃度の 7 種のベンズアミジン派生物に対して基底状態の活性抑制能を評価した。

$\beta$ 1AR とカラゾロール-ベンズアミジン化合物に対し、ドッキングの評価を AutoDock4 で行った。

### 4. 研究成果

( 1 )  $\beta$ 1AR に対する実験。 $\beta$ 1AR は代表的な GPCR でありよく研究されている。結晶構造や電顕構造も多数報告されているが、いずれも  $\text{Na}^+$  結合部位とオーソステリック結合部位は不連続な構造をとっており、 $\text{Na}^+$  結合部位は閉じて溶媒領域とは接触していない。ただし、申請者らはベンズアミジン分子がアゴニストに対して負のアロステリック因子となるという実験結果を既に報告しており (Hori2018)  $\text{Na}^+$  結合部位は常に閉じているわけではなく、境界に存在するアミノ酸側鎖の構造変化により、開いたり閉じたりしているものと考えている。そこで本申請研究では、 $\beta$ 1AR の既存の逆作動薬であるカラゾロールとベンズアミジンをリンカーを介して結合させ (以下同化合物を Car-Ben とする)  $\beta$ 1AR のアゴニスト依存的活性を Car-Ben が阻害するかどうかを確かめた。カラゾロールは  $\beta$ 1AR のオーソステリック結合部位に結合することは既に明らかになっており、仮に Car-Ben が  $\beta$ 1AR の活性を阻害すれば、オーソステリック結合部位と  $\text{Na}^+$  結合部位に同時に結合することが示唆される。その場合、仮に報告されている構造では閉じていても、実際には Car-Ben は  $\beta$ 1AR の構造変化により両部位に結合することができていると考えられる。実験の結果、Car-Ben は  $\text{IC}_{50}=1.1\mu\text{M}$  で  $\beta$ 1AR のアゴニスト依存的活性を阻害した。この親和性は、カラゾロール(4.8nM)とベンズアミジン分子(0.95mM)の間であった。

また、Car-Ben が  $\beta$ 1AR の  $\text{Na}^+$  結合部位とオーソステリック結合部位に結合することをサポートするために、プログラム AutoDock4 で Car-Ben の  $\beta$ 1AR に対するドッキングを行った。リガンド結合範囲は  $\beta$ 1AR の  $\text{Na}^+$  結合領域から細胞外側領域の広い範囲を指定した。また、 $\text{Na}^+$  結合領域とオーソステリック結合部位の間に存在する 3 つのアミノ酸の側鎖を可変残基として指定した。Car-Ben はすべての可動な結合を回転できるように指定した。ドッキングの結果、Car-Ben のカラゾロールの部分が  $\beta$ 1AR / カラゾロール複合体結晶構造中のカラゾロール分子とよく重なり、Car-Ben のベンズアミジンの部分が  $\text{Na}^+$  結合領域に存在した構造を得ることができた。ドッキング結果の  $\beta$ 1AR/Car-Ben 複合体と BLT1/BIIL260 の構造を重ね合わせた時、Car-Ben のベンズアミジンの部分は BLT1/BIIL260 のベンズアミジンの部分とよく重なり、Car-Ben のベンズアミジンのアミジン基は  $\beta$ 1AR のアスパラギン酸 (残基 2.50) と相互作用できる位置にあった。また、 $\beta$ 1AR の  $\text{Na}^+$  結合部位とオーソステリック結合部位の間の 3 つの可変側鎖のうち、一つ (アスパラギン酸 (残基 3.32)) は  $\chi_1$  軸に対するロータマー回転をし、他の 2 つの側鎖はわずかな構造変化をしていた。これらの構造変化により  $\text{Na}^+$  結合部位とオーソステリック結合部位は連続した穴となった。この結果、結晶構造や電顕構造では  $\text{Na}^+$  結合部位が閉じている GPCR に対しても、ベンズアミジンは作用しうると考えられる。

( 2 ) ベンズアミジン基がクラス A GPCR の基底状態の活性を抑制する最も最適な官能基であるとは限らない。そこで、基底状態の活性がよく確認できた 5-HT<sub>2B</sub> 受容体 (セロトニン受容体) に対し、7 つのベンズアミジン派生物によるアゴニスト依存的・非依存的活性の阻害能を確認した。ベンズアミジン派生物は以下のとおりである。(i)benzamidine, (ii)1H-pyrazole-1-carboximidamide, (iii)Pyrrolidine-1-carboximidamide, (iv) N'-Hydroxybenzimidamide, (v)Cyclohexanecarboximidamide, (vi)Cyclopropylmethanediamine, (vii)amirolide。アッセイの結果、化合物(i)、(v)、(vii)は 5HT-2B のアゴニスト依存・非依存的活性をより高親和的に抑制し、

他の化合物は抑制の程度は低く親和性もより低かった。化合物(i)はベンズアミジンである。化合物(vii)はアミロライドで、多くの GPCR の活性を抑制するという結果が報告され、アッセイとドッキングの結果から  $\text{Na}^+$  結合部位に作用していると考えられている分子である。化合物(v)は(i)と同様にアミジン基を持つが、化合物(i)はベンゼン環構造をもつが化合物(v)はシクロヘキサン構造をもつ。化合物(vii)はベンゼン環構造を持つがアミンや CL 基が付加し、アミジン基もよりかさ高いカルボニルグアニジウム基をもつ。一方で、化合物(ii)と(iii)は5員環構造を、化合物(vi)は3員環構造をもつ。また、化合物(iv)はベンゼン環にアミジン基ではなくアミドキシム基をもつ。これらの結果 5-HT<sub>2B</sub> 受容体に対しては、6員環構造をもつ化合物がより適しているものと考えられる。

(3) 5-HT<sub>2B</sub> 受容体に対して実験を行った7つのベンズアミジン派生物について、192種のクラスA GPCR に対する抑制の確認実験を行った。抑制を簡便に確認するために、各ベンズアミジン派生物について2種の濃度にて抑制を確認した。まず、159種のGPCRで基底状態の活性が確認できた。そのうち153種のGPCRで活性抑制が確認できた(96.2%)。活性抑制値を基底状態の活性で規格化した値について、2つの化合物間での抑制値を比較したときに、各化合物(i)-(iii)と(v)の間で抑制値に正の相関があった。特に化合物(iii)と(v)の間では相関係数が0.92と強い相関が観察された。また、各GPCRについて抑制度の大きさを化合物を順位付けしたとき、化合物(iii)が抑制順位1位であるGPCRの数が最も多かった。ほとんどのGPCRで化合物(i)-(iii)と(v)は抑制順位1-4位であり、5位と6位はそれぞれ化合物(v)と(vi)が最も多かった。アッセイで基底状態の活性が確認できたGPCRのうち、不活性状態の構造解析がなされているGPCRは55種である。これらをナトリウムイオン結合部位が閉じているGPCRと繋がっているGPCR別に規格化された活性抑制度を比較したが、いずれの化合物についても活性抑制度に特に傾向が見られなかった。これらの実験結果から、結晶構造中で両部位が繋がっていても、ベンズアミジン化合物はナトリウム結合部位に結合してGPCRの活性を抑制することができると考えられる。また、化合物(i)-(iii)と(v)が活性抑制度に関してはより優れていると考えられる。

この結果をアッセイで使用したGPCRのグループと共役するGタンパク質、内在性アゴニスト別に分類して、活性抑制されたGPCRの割合と規格化された活性抑制度の違いを考察した。GPCRのグループと各化合物に対して、活性抑制されたGPCRの割合と、規格化された活性抑制度の平均値をプロットした。化合物(i)-(iii)と(vi)は、(iv)と(vi)、(vii)に比べて活性抑制された割合は前者は50%以上、後者は50%以下でおおよそ分類でき、また活性抑制度の平均値は、前者が-0.26以下、後者が-0.26以上で分類できる。活性抑制されるGPCRの割合を50%、平均の活性抑制度を-0.26を基準値とし、共役するGタンパク質と内在性アゴニスト別に分類されたGPCRについて、基準値から外れたGPCR群を探索した。その結果、化合物(ii)はG<sub>s</sub>で反応するGPCRは、G<sub>q</sub>やG<sub>i</sub>で反応するGPCRに比べて抑制度の平均値が低いのにに対し、化合物(iv)と(vi)は逆にG<sub>s</sub>と反応するGPCRの抑制度の平均値が高かった。また、化合物(i)と(ii)は、低分子化合物を内在性アゴニストとするGPCRに対

して抑制度の平均値は低く、化合物(vii)は、アミンを内在性アゴニストとする GPCR に対して抑制度の平均値は他の GPCR より高かった。化合物(vii)はこれまでアミン系 GPCR に対する活性抑制の報告が数多く報告されており、今回の結果と矛盾しないと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 中村元直, 堀 哲哉, 宮野雅司	4. 巻 94
2. 論文標題 最近のGPCR創薬 -GPCRの構造ゲノム創薬 の発展とさらなる創薬研究にむけて	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 496-506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀 哲哉
2. 発表標題 ナトリウムイオンによるGPCRの活性抑制機構を模倣する逆作動薬の合理的設計に向けて
3. 学会等名 日本生化学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tetsuya Hori and Shigeyuki Yokoyama	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Academic press	5. 総ページ数 18
3. 書名 Ions as GPCR allosteric modulators	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------