

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03210

研究課題名(和文)血管収縮を調節するペプチドホルモン受容体の活性化機構の解明

研究課題名(英文)Studies of activation mechanism of vascular-constricting hormone receptor

研究代表者

土井 知子(Doi, Tomoko)

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00397580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：血管収縮を調節するエンドセリンホルモン受容体ETBRにおける内在性ホルモンET-1の作用機構の解明、ETBRと三量体Gi複合体構造の単粒子解析を行った。ET-1のヘリカル領域に存在するY13、F14は、ETBRのTM1-N末領域-TM7細胞外側と相互作用しETBRを活性構造へ移行させる重要なきっかけになっていることが判明した。複合体構造において観察された相互作用を、cell-based assay等によって検証し、ETBRが独自の活性構造安定化機構を使っている一方、共通の相互作用部位を介して各種のGタンパク質を活性化していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ETBRは創薬における標的受容体であり、心臓血管疾患、脳神経系疾患、がんなどの疾病と深くかかわる。しかしながら未だに非ペプチド性アゴニストが開発されていない。我々の研究が明らかにしたET-1結合型や阻害薬Bosentan結合型ETBR構造、ETBR-Gi複合体構造を利用してETBRのリガンド認識、活性化機構を解明することは、副作用が少ない、より選択的な作用薬の開発を加速するとともに、GPCRの活性化における新たな分子機構を提案できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The peptide hormone endothelin (ET-1) regulates vascular tone and humoral homeostasis. Y13 and F14 in the helical region of ET-1 interact with the N-terminal tail and extracellular side of TM7 in the endothelin type B receptor (ETB) and start signal propagation in the ETBR. The structure of ETBR bound to ET-1, a G-protein coupled receptor (GPCR) complexed with Gi1 and scFv16, a complex stabilizer was analyzed by cryo-EM and single-particle analysis. The interactions observed in the complex were analyzed by cell-based G-protein coupling assays, showing that the tip of C-terminal alpha-5 helix engages with the cytoplasmic end of TM7 and TM8, and that ETBR employs an original stabilization mechanism of the active conformation, while it utilizes the conserved common surface area to interact with Gi, Gq, and Gs.

研究分野：機能生物化学

キーワード：ペプチドGPCR シグナル伝達 三量体Gタンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペプチドホルモンのエンドセリン(ET)は、血管壁の緊張度や体液の恒常性を調節して生命活動に必須の生理機能を担う。エンドセリンB型受容体(ET_BR)を介する血管弛緩作用は、がんやアルツハイマー病、脳血管障害の治療に期待されるが、ET_BR 情報伝達の調節機構は十分に解明されておらず、ET_BR 選択的非ペプチド性アゴニストも開発されていない。申請者らはET_BR の結晶構造解析を行い内在性ペプチド ET-1 の結合様式を解明したが、ET-1 の ET_BR に対する作用機作を十分に解明できていない。本研究は、ET による ET_B 受容体の活性化機構を解明してアゴニストの必要条件を明らかにするとともに、ET-1 結合 ET_B-G タンパク質複合体の cryo-EM による単粒子解析と、ペプチド誘導体や変異受容体を用いて ET_BR と各種 G タンパク質やβ-アレスチンとの相互作用の解析を行う。本研究によって、ET_BR 選択的アゴニストの開発や他のペプチド受容体の活性化機構の解明を促進できると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、ET-1 の受容体に対する作用機構の解析と ET-1 結合 ET_B 受容体-G タンパク質複合体構造の解析を行って、小分子受容体とは異なる活性化機構やエンドセリン A 型受容体(ET_AR)と共通する活性化機構の解明、および ET_B アゴニストの必要条件を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Y13, F14 と相互作用する ET_BR 側の働きの解明

ET-1 (8-21) ペプチド誘導体を用いたペプチドマッピングにおいて、D8 および C 末領域 L17, D18, I20, W21 が高結合親和性ならびに高い potency に重要であると同時に、ヘリカル領域の Y13, F14 も ET_BR の完全活性化に必須である。これら残基が相互作用する ET_BR 側の残基について HEK293T 細胞に変異体を発現させ、その ET-1 結合親和性や G タンパク質活性性能を検討する。

(2) ET-1 結合 ET_B-G タンパク質複合体の cryo-EM による単粒子解析

三量体 Gi タンパク質、Gq タンパク質ならびに ET-1-ET_BR 複合体を昆虫細胞系で発現精製し、試験管内で両者の複合体形成を行って単離する。この粒子の単粒子解析を行う。

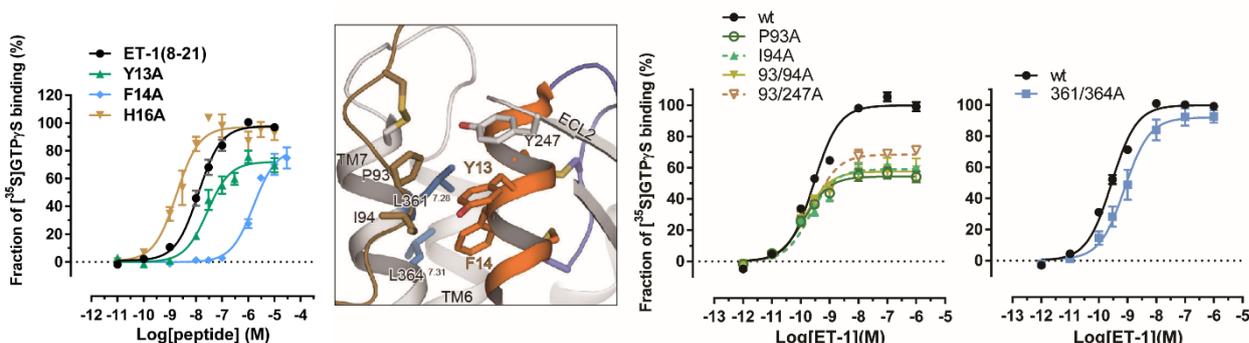
(3) 単粒子解析した構造をもとに、ET_AR、ET_BR それぞれにおいて、完全活性化構造の形成や安定化に必要な相互作用を cell-based G protein assay によって検討する。

(4) ET_AR のリガンド結合様式を、動物細胞に発現させた変異体を用いて、ET_BR と比較する。

4. 研究成果

(1) Y13, F14 と相互作用する ET_BR 側の働きの解明

ET-1-ET_BR 複合体の結晶構造から、ET-1 の Y13 は、N 末領域 P93, I94, ECL2 の Y247 近傍に位置している。これらの残基を Ala に変異した変異受容体と G_{i1} α subunit を共発現した HEK293T 細胞膜を用いて、[¹²⁵I]ET-1 結合親和性 K_d ならびに [³⁵S]GTPγS 結合による Gi 活性化能を測定した。



ET-1 の Y13 は、ET_BR の N 末領域 P93, I94 と相互作用しており、Ala 変異体では ET-1 親和性は変化しなかったが、G タンパク質活性化効率が半分程度に低下した。ET-1 の F14 は、TM7 の細胞外側 L361, L364, L365 と相互作用して、ET-1 結合親和性を低下させた。

ET_BR の N 末 P93, I94 領域は、不活性構造では TM1 のヘリックス構造内に位置し、ET-1 との結合に伴ってヘリックス構造を壊してフレキシブルループ構造に変化し、受容体中心方向に移動する。TM7 細胞外側も、ET-1 との結合に伴って受容体中心方向に移動する。

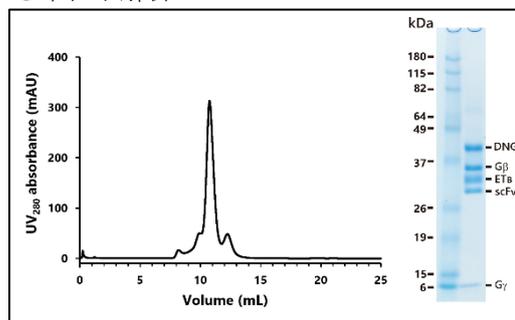
受容体と結合していない 21 残基のペプチド ET-1 は、8-17 部分がヘリカル構造を形成しており、その中央部分に存在する Y13, F14 は、ET_BR との相互作用の初期に、ET_BR の N 末領域と TM7 を

	Saturation binding		[³⁵ S]GTPγS binding		
	K _d (pM)	B _{max} (nM)	pEC ₅₀	E _{max}	n
wt	22.8 ± 1.9	56.4 ± 2.0	9.55 ± 0.05	99.8 ± 2.6	7
P93A	26.6 ± 5.1	61.7 ± 5.7	9.88 ± 0.09 ***	54.6 ± 2.6 ***	6
I94A	22.6 ± 0.3	69.1 ± 1.8	9.67 ± 0.08	58.9 ± 2.6 ***	6
93/94A	30.5 ± 1.2	55.1 ± 2.7	9.86 ± 0.14 ***	57.7 ± 4.3 ***	6
93/247A	26.9 ± 3.1	53.1 ± 0.4	9.58 ± 0.06	68.3 ± 2.4 ***	6
wt	22.2 ± 2.0	85.0 ± 0.7	9.55 ± 0.04	99.8 ± 2.1	6
361/364A	38.3 ± 7.6	97.2 ± 8.7	9.10 ± 0.10 ***	91.2 ± 4.6 **	6

受容体の中心方向に移動させ、活性構造への変化をスタートさせると考えられる。ET-1 の C 末 18-21 領域は、受容体の膜貫通コアドメインに深く入り込んで結合し、小分子リガンドと同様な構造変化をもたらすが、ET-1 のヘリカル領域は ET_BR の細胞外領域付近に作用して受容体の完全活性化に寄与しており、ET-1 の C 末領域に加え、Y13, F14 のような相互作用を供与できることが高い efficacy を持つアゴニストとして必要である。

(2) ET-1 結合 ET_B-G タンパク質複合体の cryo-EM による単粒子解析

三量体 Gi タンパク質、Gq/11 タンパク質、ET-1-ET_BR 複合体を安定化する単鎖抗体 scFv16 をそれぞれ昆虫細胞系を用いて調製し、ゲルろ過による複合体の精製を行った。Gi については α subunit に 4 残基のドミナントネガティブ変異を導入した DNGi も調製し、野生型 Gi と並行して複合体を単離した。ET-1-ET_BR-G11-scFv16 複合体は不安定で、解離が著しいために単離できなかった。このために、ドミナントネガティブ Gq α subunit, miniGq/s などを試みたが、解離を抑えることができなかった。

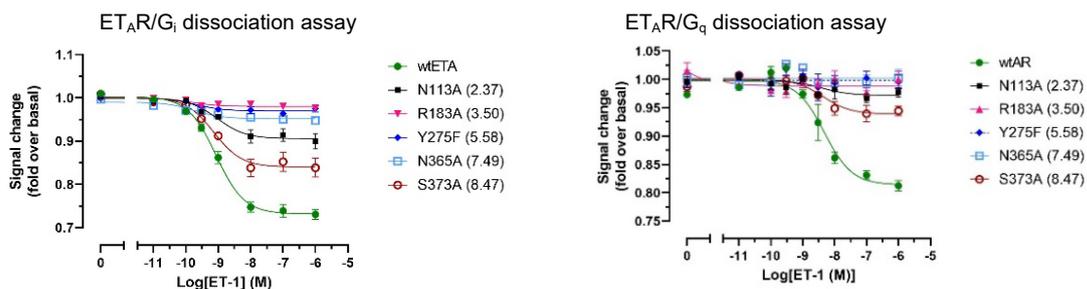


ET-1-ET_BR-Gi-scFv16 複合体を用いて、cryoEM による単粒子画像取得、単粒子構造解析を行い、3.2 Å 広域解像度のモデル構造を得た。この完全活性型モデル構造の ET-1 結合 ET_BR では、細胞質側 TM6 が受容体の外側方向に押し出されて中央部分にくぼみができ、保存された DRY モチーフの 199R^{3,50} がその中央方向を向き、保存された 293Y^{5,58} 並びに水分子を介して NPxxL モチーフの 382N^{7,49} と水素結合を形成し、それら親水性相互作用を保護するように疎水性の 386L^{7,53} が壁を作り、受容体細胞質側の表面構造が形成されていた。この受容体細胞質側のくぼみに向かって、Gi α subunit の C 末 $\alpha 5$ ヘリックスが入り込んで相互作用し、複合体が形成されていた。これまでに報告がある Gi 複合体とよく合致して受容体と Gi の接触表面が小さく、Gq 複合体を安定に単離することが困難であった理由もそのためと考えられる。現在、論文準備中であるために、詳細な構造を掲載することを控える。

(3) ET_AR、ET_BR における活性化構造の形成や安定化に必要な相互作用の解析

単粒子解析で得られた ET_BR 複合体のモデル構造をもとに、cell-based G protein assay 系を確立して、G protein 活性化に必要な相互作用を検討した。Gi, Gq 活性化を評価する G protein dissociation assay では、G protein α subunit, γ subunit に Luciferase large fragment, small fragment をそれぞれ導入した遺伝子を共発現させて検出できる Luciferase 由来の luminescence の輝度が、三量体 G protein 活性化に伴って解離する結果、減少する割合を検出することで、アゴニスト依存的な活性化の potency, efficacy を測定する。Gs 活性化の評価には、Gs 活性化の結果蓄積する cAMP を検出する cAMP Gloassay を用いた。

ET_BR 活性構造形成安定化に関わる 199R^{3,50}, 293Y^{5,58}, 382N^{7,49}, 386L^{7,53} の変異は、Gi, Gq, Gs 活性化能をほぼ消失させ、対応する ET_AR の変異についても同様な結果を示した。Gi α subunit の $\alpha 5$ ヘリックス末端が相互作用する 390S^{8,47}, 296M^{5,61}, 300M^{5,65}, 325V^{6,37} の変異は、Gi, Gs 活性化能を大きく損なった。さらに、これらの残基が相互作用している Gi α subunit 側の変異においても同様な結果が得られた。このことは、得られた複合体のモデル構造が適切であることを示している。また、これらの残基は Gi, Gq, Gs 間で保存されていることから、ET_BR は G α subunit 側の共通構造を利用して結合することで、promiscuous coupling を達成していることが示唆された。同様な変異体を ET_AR においても作成し、検討した (下図)。詳細な部分では多少の差異を観察したが、全体としては ET_AR についても ET_BR と同様な結果が得られ、ET_AR-G 複合体も、ET_BR と同様な様式で形成され、G タンパク質を活性化していると考えられる。



(4) ET_AR の ET-1、ボセンタン結合様式：動物細胞に発現させた変異体の [¹²⁵I]ET-1 結合阻害実験のよって、ET_BR と同様の残基が特異的な結合に重要であることを確認した。ET-1; K140^{2,64}, K166^{3,33}, K255^{5,38}, R340^{7,24}, Y352^{7,36}, Bosentan; Q165^{3,32}, K255^{5,38}, L259^{5,42}, W318^{6,48}, R326^{6,55}.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Tomoko Doi, Kohei Kikuta, and Kazutoshi Tani	4. 巻 59
2. 論文標題 Characterization of critical residues in the extracellular and transmembrane domains of the endothelin type-B receptor for propagation of the endothelin-1 signal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1718-1727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00158	査読の有無 有
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------