

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06531

研究課題名(和文) グレリンの脂肪酸修飾基は、なぜグレリン受容体の活性化に必要なのか？

研究課題名(英文) Why is the acyl-modification of ghrelin necessary for activity?

研究代表者

児島 将康 (Masayasu, Kojima)

久留米大学・付置研究所・教授

研究者番号：20202062

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)：われわれが立体構造解析に成功した拮抗薬を結合させたグレリン受容体は、TM6束とTM7束の間に広い隙間(クレバス)を持ち、この隙間にはフェニルアラニン残基を含む疎水性アミノ酸が豊富に含まれていることがわかった。したがって、このギャップ構造とグレリンのアシル酸部位との相互作用が、グレリン受容体を活性型に変換することに関与していると考えられた。しかし、グレリン受容体の活性化機構を解明するためには、アシル修飾グレリンと結合した活性型グレリン受容体の構造解析によるさらなる詳細が必要である。その後、われわれはがん悪液質治療薬のアナモレリンが結合したグレリン受容体の構造解析に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グレリンは、末梢投与により食欲増進を誘導する唯一のペプチドホルモンであり、さらに、成長ホルモン分泌促進、脂質代謝、エネルギー恒常性の維持、記憶形成、海馬の神経新生など幅広い生理作用を有しており、様々な疾患の治療薬への応用が期待されている。実際に現在では、グレリン様化合物のアナモレリンががん悪液質の治療薬として臨床の現場で使われている。今回の研究期間中に、アンタゴニストおよびアゴニスト(アナモレリン)が結合したグレリン受容体の立体構造解明に成功し、その結果は今後さらに高い生理活性をもつ化合物の合成デザインに有益な情報をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The ghrelin receptor has a large gap (we call it as crevasse), and this gap was found to be rich in hydrophobic amino acids, including phenylalanine residues. Therefore, the interaction of this gap structure with the acylate moiety of ghrelin was thought to be involved in the conversion of the ghrelin receptor to its active form. However, further details on the structural analysis of the active ghrelin receptor bound to acyl-modified ghrelin are needed to elucidate the activation mechanism of the ghrelin receptor. Subsequently, we have succeeded in structural analysis of the ghrelin receptor bound by anamorelin, a drug for the treatment of cancer cachexia.

研究分野：内分泌学、代謝学、ペプチド化学、生化学

キーワード：グレリン GPCR グレリン受容体 立体構造 結晶構造解析 アナモレリン がん悪液質

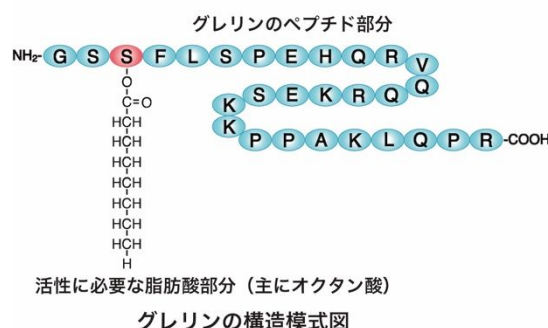
様式 C-19, F-19-1, 2-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(グレリンについて) グレリンは申請者らが1999年に発見したペプチドホルモンで、胃から分泌されて食欲刺激、摂食亢進、成長ホルモン分泌促進、海馬での神経発生などの作用を示す。

(グレリンの活性には脂肪酸修飾が必要である)

グレリンは、N末端から3番目のセリン残基が脂肪酸のオクタン酸によって修飾されているという特徴的な構造をしており(上図) しかもこの修飾がないと活性を示さない。このような脂肪酸で修飾されたペプチドホルモンは現在のところグレリンだけしか知られていない。なぜグレリンでは脂肪酸の修飾が活性発現に必要なのか、それを明らかにするためにはグレリン受容体とグレリンとの結合を三次元立体構造(3D構造)で解明する必要がある。しかしそれは本研究の開始当時、成功していなかった。



(不活性型のグレリン受容体構造から明らかになったこと) 申請者はグレリン受容体の活性化機構を明らかにするために、数年前からグレリン受容体の結晶構造解析を始めた。そして京都大学岩田想先生のグループとの共同研究によって、グレリン受容体にアンタゴニストが結合した不活性型の構造解明に成功した(未発表)。その結果、グレリン受容体は典型的なGPCRの3D構造を示すが、グレリンの脂肪酸修飾基の役割を示唆する特徴的な構造があることがわかった。

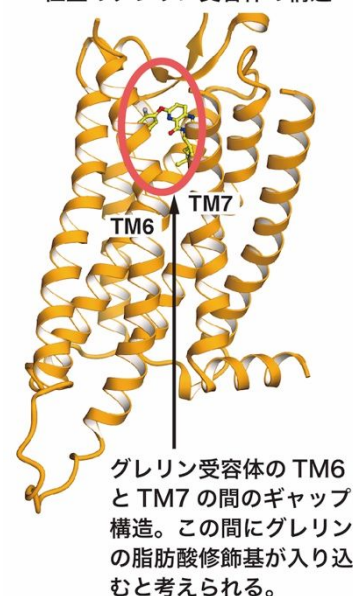
それは第6膜貫通領域(TM6)と第7膜貫通領域(TM7)の間のギャップ構造である。このギャップ構造を形成するアミノ酸には疎水性の高いフェニルアラニン残基が多く、ギャップ構造と脂質との相互作用が推測された。実際にいくつかの脂質性リガンドのGPCRにおいてはTM7とTM1の間(S1P1やEP4など)や、TM3とTM4の間(GPR40)、TM4とTM5の間(PAFR)にギャップ構造があり、このギャップ構造を通してリガンドが側面からリガンド結合ポケットにアクセスすると推定されている。グレリン受容体の場合はこのギャップ構造が、グレリンの脂肪酸修飾基と相互作用していると考えられる。またGPCR受容体の活性化に重要なTM6とTM7という膜貫通領域が関与しているために、グレリン受容体の活性化メカニズムへの関与も考えられた。

(解決すべき学術的「問い」) しかし、この結果はあくまでも推測にすぎず、グレリンの脂肪酸修飾基とグレリン受容体との相互作用を解明するには、グレリンとグレリン受容体が結合した状態の3D構造を解明する必要がある。しかし、どのGPCRについても内因性リガンドが結合した活性型受容体の3D構造を明らかにすることは現在でも困難な研究であり、グレリン受容体においてもまだ成功していなかった。

2. 研究の目的

(本研究の目的) 本研究の最終目標は、グレリンが結合した状態でのグレリン受容体の3D構造を解明することによって、グレリンの脂肪酸修飾の部分、どのようにして受容体の構造を不

申請者らが明らかにした不活性型のグレリン受容体の構造



活性型から活性型に変換するのか、そのメカニズムを解明することである。

グレリンはペプチド部分だけでなく、脂肪酸の修飾基がないと活性を示さないという特徴的な構造をしており、なぜ脂肪酸部分がグレリン受容体の活性化に必要なのかは不明であった。申請者らはこの疑問に答えるためにグレリン受容体の結晶構造解析を進め、まず不活性型の構造を解明した。その結果、TM6 と TM7 間のギャップ構造部分の疎水性アミノ酸と、グレリンの脂肪酸部分の相互作用によって、TM6 が活性型の位置に動き、それによって受容体が活性型に転換することが示唆された。このような膜貫通領域間のギャップ構造は脂質 GPCR にもみられることから、グレリン受容体はペプチド性 GPCR と脂質 GPCR の両方の特徴をもったハイブリッド型 GPCR である。ただしこのギャップ構造は、脂質 GPCR の場合はリガンドが受容体の側面からリガンド結合ポケットに侵入する経路であることが、グレリン受容体(リガンドは細胞膜表面側から侵入)とは異なっており、活性化機構の違いが示唆される。グレリンとグレリン受容体が結合した 3D 構造が解明されれば、グレリンの脂肪酸修飾基による受容体の活性化機構が明らかになり、GPCR の活性化機構に新しい知見をもたらすと期待される。

3. 研究の方法

グレリンが結合したグレリン受容体の 3D 構造の解明を、X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡による解析の二つで並行して進めていく計画を立てた。

(1) X 線結晶構造解析によるグレリンが結合したグレリン受容体の 3D 構造解明

X 線結晶構造解析によって活性型の 3D 構造が解かれた GPCR には、エンドセリン、ニューロテンシン、アンジオテンシンなどがある。これらはリガンド結合能が極めて高いもの(エンドセリン受容体, ETBR) や、アミノ酸置換などで受容体の熱安定性を高めたもの(ニューロテンシン受容体、アンジオテンシン II 受容体) で 3D 構造が解かれている。

そこでアミノ酸のランダム変異ライブラリーによって、リガンド結合能が高い高活性型のグレリン受容体や、熱安定性の高い受容体を探索し、グレリンと結合したグレリン受容体の結晶を形成する。クロンテック社の Diversify PCR Random Mutagenesis Kit を用いて、366 アミノ酸残基のグレリン受容体に 1~2 個の変異アミノ酸が入るようにする。これをプラスミドベクターに組み込み、培養細胞に発現させる。この発現細胞において IP3 基礎活性の測定や、グレリン添加による細胞内カルシウム濃度の変化を指標にして、高活性型のグレリン受容体を見出す。変異型グレリン受容体の熱安定性は蛍光ゲル濾過 (FSEC) によってチェックする。

予備的なスクリーニングの検討では、250 種類の変異型グレリン受容体クローンにおいて、高活性な 3 つの変異体を見出している。これらは Asp と Glu のアミノ酸ペア、Arg と Lys のアミノ酸ペアなど、同族のアミノ酸の置換によって受容体の活性が変化していた。

さらにスクリーニング数を増やすことと、DNA シークエンスによって見出した変異体クローンのアミノ酸置換部位を同定し、これらのアミノ酸変異を複数組み合わせることで、より高活性で熱安定性のよいグレリン受容体を見出していく。見出した高活性で熱安定性のよいグレリン受容体とグレリンとの結晶化を試み、結晶形成ができれば X 線による結晶構造解析を行っていく。

(2) クライオ電子顕微鏡によるグレリンが結合したグレリン受容体の 3D 構造解明

最近の膜タンパク質の 3D 構造解明には、クライオ電子顕微鏡を用いることが主流となってきた。しかしクライオ電子顕微鏡では、解析対象のタンパク質にはある程度の分子量が必要(60~70kDa 以上)であり、とくに膜タンパク質は界面活性剤ミセルに包まれていることもあって 110kDa 以上の分子量が必要である。そのため GPCR (平均の分子量は 40kDa 程度) の解析においては G タンパク質(分子量は 80kDa 程度)との複合体を形成して解析されていることが多い。したがってグレリン受容体の活性型の構造解析においても、G タンパク質(グレリン受容体の場合は主に Gq とカップリングしている)との複合体形成が必要である。

しかし G タンパク質の中でもグレリン受容体とカップリングする Gq タンパク質だけは、他の G タンパク質に比べて発現が非常に困難であり、これまでに Gq とカップリングした GPCR 受容体で 3D 構造が解かれた報告はまだない。

そこでクライオ電子顕微鏡による 3D 構造解析を目指して、グレリン・グレリン受容体・G タンパク質の複合体を形成するために、申請者らは次のような方法を考えている。

Gi/q の変異体を使って発現効率を高める

Gq の N 末端部分を Gi に置き換えた変異体（以下、Gi/q）では発現効率が上がることが知られている。Gi/q を昆虫細胞で発現させて精製し、別の昆虫細胞で発現し精製した G と G と G タンパク質複合体を形成させる。この G タンパク質複合体に、さらにグレリンとグレリン受容体との複合体を形成させる。複合体の形成においては、グレリン受容体、グレリン、G タンパク質とともに ATP ジホスフォヒドロラーゼであるアピラーゼ (apyrase) を加えることで、G タンパク質から放出された GDP を GMP へと加水分解し、GDP がグレリン受容体・G タンパク質複合体と再結合して解離させるのを防止する。さらに G と G の接合面を認識するモノクローナル抗体（共同研究先より入手済み）によって GTP S による G タンパク質のヘテロトリマー解離を阻害する。これによってグレリン受容体と G タンパク質複合体がより安定になることが期待される。

Gq の タンパク質とグレリン受容体を同じ昆虫細胞に同時に発現し複合体として精製する

予備的な検討では、昆虫細胞においてグレリン受容体・G タンパク質を同時に発現させることができ、細胞の抽出物から複合体の精製が可能であることを確かめており、複合体の発現効率と精製効率を上げるために、ベクターの混合比率や、精製方法の検討を行う予定である。

分子シャペロン Ric8A を使って Gq の発現を高める

Ric8A という分子シャペロンを共発現させると Gq タンパク質の発現量が劇的に増加することが知られている (Chan et al. JBC 286, 2011)。そこで昆虫細胞を使って Ric8A と共発現させることで Gq の発現量を増加させ、単一のものに精製する。

Gi とのカップリングで解析する

グレリン受容体は Gq カップリングが主であるが、Gi ともカップリングする。実際に申請者は褐色脂肪細胞の培養系において、グレリン添加による cAMP 産生抑制が百日咳毒素によってキャンセルされることから、グレリン受容体が Gi とカップリングすることを確認している。これまでの研究では Gi は培養細胞系において発現が良好であり、 μ オピオイド受容体やニューロテンシン受容体などでは Gi との複合体を形成してクライオ電顕による活性型の構造解明に成功している。そこでグレリン受容体の場合も Gi とのカップリングを行い、活性型の構造を明らかにする。

（試料が調製できたあとの実際の構造解析について） グレリンと活性型受容体との結晶化がうまくいった場合は、Spring-8 において、X 線回折を行う。グレリン・グレリン受容体・G タンパク質の複合体の形成に成功したときには、BIND α （創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム）を通じてクライオ電子顕微鏡での解析に進めていく。

以上の研究によって、摂食亢進ホルモン「グレリン」の脂肪酸修飾基はなぜ受容体活性化に必要なのかを明らかにする計画である。

4. 研究成果

われわれは本研究期間中に、アンタゴニストを結合させたグレリン受容体の高分解能結晶構造についての論文発表を行った。これはグレリン受容体の立体構造が解明された最初の論文である。

その結果、グレリン受容体はTM6束とTM7束の間に広い隙間（クレバス）を持ち、この隙間にはフェニルアラニン残基を含む疎水性アミノ酸が豊富に含まれていることがわかった。したがって、このギャップ構造とグレリンのアシル酸部位との相互作用が、グレリン受容体を活性型に変換することに関与していると考えられた。

また、明らかになったグレリン受容体の立体構造から、グレリン受容体はペプチドホルモンGPCRと脂質GPCRの両方の性質を持っていると考えられた。グレリン受容体の結合ポケットは2つの空洞（キャビティIとキャビティII）に分岐しており、アミノ酸を変異させた受容体の活性解析の結果から、グレリンの結合にはキャビティIがより重要であると判断された。NTSR1、ETBR、AT2受容体などのペプチドホルモンGPCRでは、リガンド結合ポケットの極性アミノ酸が内因性リガンドのペプチドコアを認識するのに重要であることがわかっている。グレリン受容体の場合、キャビティIの極性アミノ酸がグレリンのペプチド部分を認識する核となっており、キャビティIIの極性アミノ酸のアラニン変異は受容体活性を消失させたことがその証左である。

一方、多くの脂質型GPCRでは、膜貫通領域の間にある広い隙間が脂質リガンドのアクセスルートとして機能することが提案されている。しかし、グレリン受容体の場合、ギャップ構造（クレバス）はグレリンがリガンド結合ポケットに入るためのアクセスルートではなく、グレリンのアシル修飾のための認識部位であると思われる。この考えは、ギャップ領域の疎水性アミノ酸の変異、特にF279、F309、F312といったフェニルアラニン残基の変異の結果からも支持される。典型的な脂質GPCRとして知られるS1P1受容体やCB1受容体では、リガンド結合ポケットの位置がグレリン受容体のキャビティIの位置に相当する。このように、グレリン受容体では、リガンド結合ポケットの疎水性環境が、脂質GPCRがその脂質リガンドの疎水性部位を収容するように、グレリンのアシル酸部位を収容すると考えられる。

以上の結果から、グレリン受容体のギャップ構造はTM6とTM7で構成されており、その動きによってGPCRのコンフォメーションが活性型に変化すると考えられた。従って、グレリン受容体の活性化機構を解明するためには、アシル修飾グレリンと結合した活性型グレリン受容体の構造解析によるさらなる詳細が必要であった。

そのため、次にわれわれはグレリンそのものが結合した状態の活性型グレリン受容体の構造解析に取り組んだ。しかし残念ながら我々の不活性型グレリン受容体の構造解明の1年後に3つの研究グループにより、グレリンが結合した活性型グレリン受容体の構造が解明され先に論文発表されてしまった。

やむなく研究の方向転換をし、われわれはその後、がん悪液質治療薬のアナモレリンが結合した構造解析に取り組み、成功した。現在、発表論文を準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato T, Oishi K, Koga D, Ida T, Sakai Y, Kangawa K, Kojima M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Thermoregulatory role of ghrelin in the induction of torpor under a restricted feeding condition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97440-y	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 Sakai N, Ohno H, Yoshida M, Iwamoto E, Kurogi A, Jiang D, Sato T, Miyazato M, Kojima M, Kato J, Ida T.	4. 巻 559
2. 論文標題 Characterization of putative tachykinin peptides in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 197-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.063	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 -
1. 著者名 Sato T, Ida T, Shiimura Y, Matsui K, Oishi K, Kojima M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Insights Into the Regulation of Offspring Growth by Maternally Derived Ghrelin.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 852636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.852636	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 Shiimura Yuki, Horita Shoichiro, Hamamoto Akie, Asada Hidetsugu, Hirata Kunio, Tanaka Misuzu, Mori Kenji, Uemura Tomoko, Kobayashi Takuya, Iwata So, Kojima Masayasu	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-17554-1	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 Neale Joshua P. H., Pearson James T., Thomas Kate N., Tsuchimochi Hirotsugu, Hosoda Hiroshi, Kojima Masayasu, Sato Takahiro, Jones Gregory T., Denny Adam P., Daniels Lorna J., Chandrasekera Dhananjie, Liu Ping, van Rij Andre M., Katare Rajesh, Schwenke Daryl O.	4. 巻 10
2. 論文標題 Dysregulation of ghrelin in diabetes impairs the vascular reparative response to hindlimb ischemia in a mouse model; clinical relevance to peripheral artery disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70391-6	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 児島将康
2. 発表標題 食欲刺激ホルモンのグレリン：その歴史から臨床応用まで
3. 学会等名 心血管内代謝週間2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児島将康
2. 発表標題 食欲を刺激するホルモン「グレリン」の最新研究
3. 学会等名 第21回日本亜鉛栄養治療研究会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児島将康
2. 発表標題 食欲刺激ホルモンのグレリン：その歴史から臨床応用まで
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔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
研究 分 担 者	椎村 祐樹 (Shiimura Yuuki) (40551297)	久留米大学・付置研究所・助教 (37104)	

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