

令和 6 年 9 月 30 日現在

機関番号：37104

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2021～2023

課題番号：20KK0359

研究課題名（和文）Cryo-EM法を用いたグレリン受容体-Gqタンパク質複合体の構造解析

研究課題名（英文）Cryo-EM structure of the ghrelin receptor coupled to an engineered heterotrimeric G protein

研究代表者

椎村 祐樹（Shiimura, Yuki）

久留米大学・付置研究所・助教

研究者番号：40551297

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：本課題では、グレリン受容体を標的とした創薬を加速させることを目的として、アゴニストが結合したグレリン受容体-Gqタンパク質複合体の構造決定を試みた。アゴニストとして、グレリン受容体作動薬で唯一承認されているアナモレリンを用いた。アナモレリン存在下でグレリン受容体-Gqタンパク質複合体を発現・精製して、クライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いてその立体構造を決定した。得られた構造情報からアナモレリンの結合様式を解明するとともに、細胞実験によって、アナモレリンがグレリン受容体のスーパーアゴニストとして作用してい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

食事量の減少と極端な痩せを示すがん悪液質は、がん死因の22%に直接関連していることが知られている。グレリン受容体作動薬のアナモレリンが、このがん悪液質に対して本邦で唯一承認されている一方で、グレリン様作用から想定される筋力増強作用が微弱であるとして欧米諸国では承認されていない。このことからアナモレリンはさらに改良の余地があることが示唆される。本研究は、アナモレリンとグレリン受容体の結合様式を可視化することで、グレリン受容体標的薬の開発を支援する構造情報を取得することに成功した。これによって構造情報を基盤とした創薬展開が可能となり、がん悪液質に対するよりよい治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：I attempted to determine the structure of an agonist-bound ghrelin receptor-Gq protein complex to facilitate ghrelin receptor-targeted drug design.

Anamorelin, the only approved ghrelin receptor agonist in Japan, was used as the agonist for structure determination. The ghrelin receptor-Gq protein complex was expressed in Expi293 cells, and purified in the presence of anamorelin. Subsequently, its structure was determined at 3.2-angstrom resolution using cryo-EM single particle analysis. Based on the obtained structural information, I performed a mutant analysis of the ghrelin receptor and elucidated the binding mode of anamorelin to the ghrelin receptor. Additionally, cell-based experiments revealed that anamorelin acts as a super agonist of the ghrelin receptor.

研究分野：構造生物学

キーワード：グレリン受容体 GPCR Cryo-EM

## 1. 研究開始当初の背景

グレリンは、胃から分泌されるペプチドホルモンで G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のひとつであるグレリン受容体に結合することによって、成長ホルモンの分泌促進、摂食亢進および体温調節作用などの生理作用を示す。2021 年にグレリン受容体作動薬であるアナモレリンが、食欲不振とエネルギー代謝亢進による骨格筋減少を主症状とする、がん悪液質の治療薬として初めて本邦で承認された。またグレリン受容体標的薬は、その多彩な生理作用から、治療法の確立していない、摂食障害や老化などさまざまな疾患や病態への適応が期待されている。一方で、アナモレリンの承認は日本のみに限局されており、欧米ではグレリン様作用から推測される筋力増加作用が十分でないとして承認に至っていない。

近年の構造生物学分野の技術革新は、創薬標的タンパク質の可視化を容易にして、そのリガンド結合様式や活性化メカニズムの理解を促した。特にクライオ電子顕微鏡法の高度化は、立体構造決定成功率を上昇させるだけでなく、構造決定に至る期間の短縮にも寄与している。グレリン受容体研究も例外ではなく、私たちが 2020 年に X 線結晶構造解析法によってアンタゴニスト結合型のグレリン受容体の立体構造を報告して以降、立て続けにアゴニスト結合型グレリン受容体の立体構造がクライオ電子顕微鏡法によって決定されている (Nat. Commun. 2021 ほか 2 報)。このような背景にあって、構造生物学研究は GPCR 標的薬の開発に今後さらに活用されることが見込まれ、アナモレリンと結合状態にあるグレリン受容体の構造決定によって、グレリン受容体を標的とした創薬展開を加速できると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、アゴニストと結合状態にあるグレリン受容体の立体構造決定および構造情報を基盤としたグレリン受容体アゴニストのシグナル解析によって、グレリン受容体創薬に有益な情報の取得を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) グレリン受容体-G タンパク質複合体の発現・精製

グレリン受容体-G<sub>q</sub> タンパク質複合体を Expi293 細胞で共発現させた。トランスフェクションの 48 時間後に細胞を回収して、界面活性剤である MNG でグレリン受容体-G<sub>q</sub> タンパク質複合体発現細胞を可溶化した。2 種類の抗体、scFv16 と Nb35 は複合体の分子量を増やしてクライオ電子顕微鏡での観察を容易にすると考えられている。そこで、これらの抗体を古細菌で発現させて、Ni 精製によって調整した。グレリン受容体-G<sub>q</sub> タンパク質複合体をアフィニティー精製したのち、scFv16 および Nb35 と混和後、ゲル濾過クロマトグラフィーによってグレリン受容体-G<sub>q</sub> タンパク質-scFv16-Nb35 複合体を精製した。精製のすべてのステップはアナモレリン存在下でおこなった。

### (2) アナモレリン結合型グレリン受容体-G タンパク質複合体の構造解析

精製したグレリン受容体-G<sub>q</sub> タンパク質複合体をグリッドに展開後、液体エタン中で氷中に包埋した。この氷包埋サンプルの品質確認をスクリーニング用の 200 keV 電子顕微鏡である Talos Arctica で行った。その結果、良好な氷包埋サンプルが調整できていることが確認できたため、ハイエンド電子顕微鏡である Titan Krios (300 keV) で、グレリン受容体-G<sub>q</sub> タンパク質複合体の単粒子像を 300 万粒子以上取得した。その後、単粒子解析ソフトである Relion を用いて、取得した単粒子像からグレリン受容体-G<sub>q</sub> タンパク質複合体の 3 次元モデルを構築した。

### (3) 構造情報を基盤とした生化学実験

構造の正当性を担保するために、得られた構造情報からアナモレリンから 4 Å 以内にあるグレリン受容体アミノ酸を抽出した。これらのアミノ酸は、アナモレリンと相互作用する可能性があるため抽出したアミノ酸をそれぞれアラニンに変異させたグレリン受容体変異体を作製して、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を指標としたシグナルアッセイをおこなった。本来であれば、アナモレリンのラジオアイソトープ標識体を用いた結合実験をおこなう必要があるが、アナモレリン標識体は市販されておらず、トリチウム標識を委託した場合には 200 万円以上かかることから現実不可能と判断してその代替案としてシグナルアッセイを用いた。

### (4) アナモレリンのシグナル活性測定

アナモレリンは、グレリン受容体作動薬で唯一上市されている医薬品であり、内因性リガンドであるグレリンとは異なるシグナル活性を示す可能性がある。そこで、アナモレリンとグレリンペプチドのシグナル活性の違いを比較するために、グレリン受容体が共役する G タンパク質 (G<sub>s</sub>, G<sub>i/o</sub>, G<sub>q/11</sub> および G<sub>12/13</sub>) について個々に BRET アッセイをおこなった。この BRET アッセイでは、G タンパク質および GRK キナーゼに蛍光タンパク質を付与している。そのため前出の Ca<sup>2+</sup>シグナルアッセイと異なり、グレリン受容体の直下、その活性型構造変化を反映したシグナル活性を測定することができる。

## 4. 研究成果

### (1) グレリン受容体-G<sub>q</sub>タンパク質複合体と不活性型グレリン受容体との比較

クライオ電子顕微鏡単粒子解析によって、グレリン受容体-G<sub>q</sub>タンパク質複合体の立体構造を3.2 Å分解能で決定した。グレリン受容体は、典型的なGPCR構造で7回の膜貫通ヘリックス(TM1-7)と細胞内に両親媒性の短いヘリックス(H8)を有していた。またG<sub>q</sub>タンパク質は、グレリン受容体の細胞内側に結合していた(図1)。以前構造決定した不活性型のグレリン受容体と比較すると、TM6が8.6 Å外側にシフトしている一方で、TM7が4.6 Å内側にシフトしていることが確認できた。これはGPCRの活性化型シフトで見られる構造変化である。さらにGPCRの活性化に関わる重要な残基であるAromatic cluster (Phe272<sup>6.44</sup>, Trp276<sup>6.48</sup>, His280<sup>6.52</sup>, Phe279<sup>6.51</sup>およびPhe312<sup>7.42</sup>)やNPxxY motif (Asn319<sup>7.49</sup>, Pro320<sup>7.50</sup>およびY323<sup>7.53</sup>)の再配置も確認された(上付きの数字はBallesteros-Weinstein numberingを示している)。

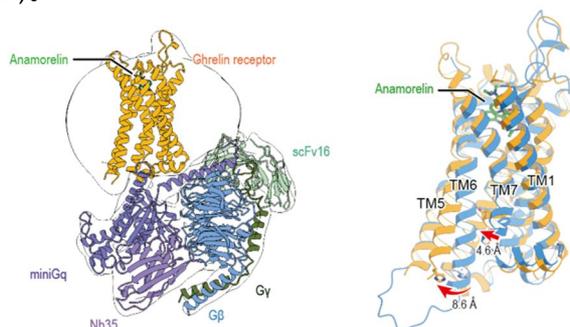


図1 アナモレリン結合型グレリン受容体-G<sub>q</sub>タンパク質複合体の全体構造(左)、構造決定した活性化型グレリン受容体(オレンジ)と不活性型グレリン受容体(青、PDBID: 6KO5)との比較

### (2) アナモレリンの結合様式

グレリン受容体のリガンド結合ポケットは、Glu124<sup>3.33</sup>とArg283<sup>6.55</sup>の塩橋によって2つに分かれた特徴的な形状(bifurcated pocket)をしている(図2A)。アナモレリンもこれまでに構造が報告されたグレリン受容体リガンド同様にbifurcated pocketの両方を満たすようにして配位していた。構造情報からアナモレリンと4 Å以内の距離にある17のアミノ酸(Asp99<sup>2.60</sup>, Arg102<sup>2.63</sup>, Leu103<sup>2.64</sup>, Gln120<sup>3.29</sup>, S123<sup>3.32</sup>, Glu124<sup>3.33</sup>, Ile178<sup>4.60</sup>, Leu181<sup>4.63</sup>, Leu210<sup>5.36</sup>, Met213<sup>5.39</sup>, Val214<sup>5.40</sup>, Ser217<sup>5.43</sup>, Arg283<sup>6.55</sup>, Phe286<sup>6.58</sup>, Asn305<sup>7.35</sup>, Phe309<sup>7.39</sup>およびPhe312<sup>7.42</sup>)を抽出した(図2B)。抽出したアミノ酸が実際にアナモレリンとの結合に関与するか確認するためにこれらのアミノ酸をアラニンに変異させたグレリン受容体変異体を作製して、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を指標としたシグナルアッセイをおこなった。その結果、アナモレリンとの結合に予想された複数のアミノ酸が関与することを明らかにした。特に塩橋を形成しているGlu124<sup>3.33</sup>とArg283<sup>6.55</sup>のアラニン変異体では、グレリン受容体のシグナル活性が完全に消失したことから、bifurcated pocketはグレリン受容体の活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

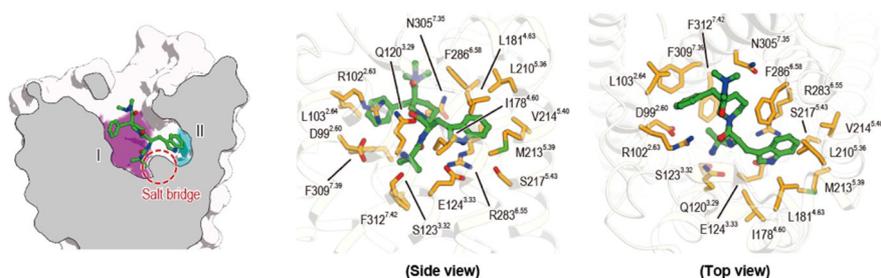


図2 アナモレリンの結合様式。アナモレリン(緑)は、グレリン受容体のリガンド結合ポケットに見られる塩橋構造を跨ぐようにしてBifurcated pocketの両方を満たすように配位している(A)。アナモレリンから4 Å以内の距離にあるグレリン受容体のアミノ酸(B)。

### (3) アナモレリンのシグナル活性

Gタンパク質は、G<sub>s</sub>, G<sub>i/o</sub>, G<sub>q/11</sub>およびG<sub>12/13</sub>の4つのファミリーがあるが、グレリン受容体では、グレリンとの結合によってG<sub>i/o</sub>, G<sub>q/11</sub>およびG<sub>12/13</sub>シグナルが惹起されることが知られている。一方、アナモレリンではどのシグナルを駆動するかわかっていなかったためBRETアッセイによって検討した。その結果、アナモレリンもグレリンと同様にG<sub>i/o</sub>, G<sub>q/11</sub>およびG<sub>12/13</sub>シグナルを惹起することを明らかにした。また驚くことに、アナモレリンのシグナル活性はグレリンのシグナル活性より1.4倍以上高いことがわかった。つまりアナモレリンは、グレリン受容体のスーパーアゴニストであることを明らかにした。一方で、グレリン受容体の構造情報とアナモレリンのスーパーアゴニスト活性の関連付けを行うことはできなかった。これは、クライオ電子顕微鏡法で得られる構造情報が最安定化構造を反映したスナップショット

トであり、不安定で遷移的な構造変化を反映していないことが原因であると考えられた。

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 Sato Takahiro, Ida Takanori, Shiimura Yuki, Matsui Kazuma, Oishi Kanae, Kojima Masayasu	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 Frontiers in Endocrinology	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 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7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Y. Shiimura, S. Horita, A. Hamamoto, H. Asada, K. Hirata, K. Mori, T. Kobayashi, S. Iwata and M. Kojima
2. 発表標題 Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor
3. 学会等名 Keystone symposia（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 椎村祐樹、林到炫、浅田秀基、岩田想、児島将康
2. 発表標題 The cryo-EM structure of an agonist bound ghrelin receptor
3. 学会等名 心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Shiimura, Dohyun Im, Ryosuke Tany, Ryoji Kise, Hidetsugu Asada, So Iwata, Masuho Ikuo, Masayasu Kojima.
2. 発表標題 Insights into the structure of the agonist-bound ghrelin receptor.
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 椎村祐樹、林到炫、谷猪遼介、浅田秀基、増保生郎、松井一真、岩田想、児島将康.
2. 発表標題 構造情報に基づいたグレリン受容体アゴニストのシグナル活性の比較
3. 学会等名 第49回神経内分泌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 椎村祐樹
2. 発表標題 グレリン受容体のリガンド認識機構の構造基盤
3. 学会等名 第27回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Shiimura, Dohyun Im, Ryosuke Tany, Hidetsugu Asada, Kazuma Matsui, Masuho Ikuo, So Iwata, Masayasu Kojima
2. 発表標題 The structural feature of ghrelin receptor.
3. 学会等名 第44回日本肥満学会・第41回日本肥満症治療学会学術集会・日韓台合同シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 椎村祐樹、林到炫、浅田秀基、松井一真、岩田想、児島将康
2. 発表標題 グレリン受容体のリガンド認識機構および活性化機構の構造学的洞察
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤貴弘、井田隆徳、椎村祐樹、児島将康	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 循環器内科	

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	コビルカ ブライアン  (Kobilka Brian)	スタンフォード大学・Molecular and Cellular Biology・Professor	

	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
その他の研究協力者	増保 生郎  (Masuho Ikuo)		

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

米国	スタンフォード大学	サンフォード研究所		
----	-----------	-----------	--	--