

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840021

研究課題名(和文) 分子選択的創薬に向けたセロトニン受容体のX線結晶構造解析

研究課題名(英文) X-ray crystallographic analyses of human serotonin receptors for structure-based drug discovery.

研究代表者

木村 香菜子 (Kimura, Kanako)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：40726204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヒトセロトニン受容体の立体構造を解明することにより分子選択的創薬に向けた知見を得ることである。本研究期間においてセロトニン1B受容体と向精神薬の候補化合物であるGR127935複合体を3.2 Å分解能で、セロトニン2A受容体と統合失調症治療薬リスペリドンとの複合体構造を2.7 Å分解能で明らかにした。二つの構造を比較すると、薬剤の結合様式は大きく異なっており、GR127935は薬剤結合ポケットの浅い位置に、リスペリドンは薬剤結合ポケットの深部に結合していた。これらの立体構造を詳細に比較することによって、薬剤選択性を上げるための結合部位のホットスポットを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to understand the ligand-selectivity of human serotonin receptors that are targets of antidepressants and atypical antipsychotics. In this study, the crystal structure of serotonin1B receptor bound to a candidate compound of antidepressant, GR127935, was solved at 3.2 Å resolution and that of serotonin2A receptor bound to an antipsychotic drug, risperidone, was solved at 2.7 Å resolution. These two serotonin receptors had different ligand-binding modes. The ligand binding pocket of serotonin1B receptor was shallower than that of serotonin2A receptor. GR127935 had specific interaction with the transmembrane domain in serotonin1B receptor. The binding pocket of serotonin2A receptor had a cavity that is not observed serotonin1B receptor. These results provided a substantial information for understanding ligand selectivity, thereby helping development of safer and more effective medications that target serotonin receptors.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヒト膜タンパク質 X線結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

セロトニン受容体は精神疾患、肥満、頭痛等、様々な疾患の治療薬ターゲットである。ファミリー1 から 7 までに分類されサブタイプを含めると 13 種類存在する。そのほとんどが G タンパク質共役型受容体(GPCR)で、セロトニン 3 受容体のみイオンチャネルである。本研究の対象は向精神薬のターゲットの中心であるセロトニン 1 および 2 受容体で、いずれも GPCR である。GPCR の立体構造は不活性型と活性型の二つの構造に大別される。GPCR はアゴニストと結合することで活性型に構造変化し、G タンパク質や アレスチンとの結合が促進されることで細胞内のシグナル応答を変化させる。一方、アンタゴニストは活性化を阻害し、インバースアゴニストは basal の活性を下げる。X 線結晶構造解析によって受容体と薬剤の複合体の立体構造を明らかにすることは創薬に必要な知見であるが、研究開始当初においてはセロトニン受容体では、セロトニン 1B および 2B 受容体と偏頭痛薬エルゴタミン (アゴニスト) との複合体構造しか得られていなかった。

準備状況として、セロトニン 1B 受容体の大量発現系を構築し、ゲルろ過で単分散の精製標品が得られていた。結晶化を行ったところ、結晶が得られたが、分解能は 10 と低く、構造決定には不十分であった。また申請時点では、結晶化実験を行うに十分なセロトニン 2A 受容体の精製標品は得られていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、セロトニン受容体と向精神薬との複合体の立体構造の解明を目指し研究を開始した。セロトニン 1B 受容体と抗うつ薬の候補化合物である GR127935 との複合体およびセロトニン受容体と統合失調症治療薬リスパリドンとの複合体構造の取得を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 準備状況までに得られていたセロトニン 1B 受容体と薬剤の複合体の結晶は分解能が 10 と低く、解析には不十分であったため、より高い結晶化能を持つ変異体を探索した。またセロトニン 2A 受容体については結晶化実験を行うために十分な収量の精製標品を取得するための変異体の選定から実験を開始した。結晶化能の高い変異体の選抜は熱安定性の高い変異体を選抜することで取得した。熱安定性に重要だという研究報告のあるアミノ酸残基に変異を導入し、安定性の向上のために細胞内ループを削り、いくつかの細菌由来可溶性タンパク質を挿入し、キメラタンパク質を作製した。

(2) 安定な複合体が取得できたかどうかはゲルろ過の単分散性と蛍光物質である CPM を指標とした熱変性実験によって確認した。

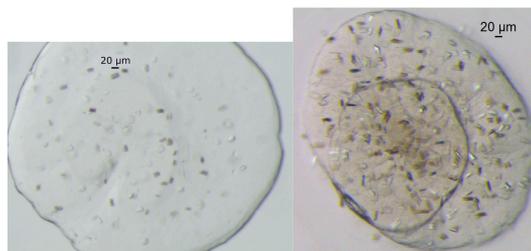
(3) 作製した変異体がりガンド結合能を保持

しているかを RI リガンドを用いた結合実験により確認した。

### 4. 研究成果

#### (1)セロトニン受容体結晶の取得と X 線結晶構造解析

結晶化は Lipidic Cubic Phase (LCP)法を用いて行った。結晶化条件を buffer、塩、沈殿剤(ポリエチレングリコール)の種類の組み合わせ約 1000 条件からスクリーニングし、最も質の良い結晶を選抜した(図 1)。得られた結晶を用いて SPring-8 ビームライン BL32XU にて X 線回折実験を行いデータを取得した。分子置換法により位相を決定し、精密化を行い、立体構造を決定した。決定した立体構造は、セロトニン 1B 受容体で 3.2 分解能、セロトニン 2A 受容体で 2.7 分解能であった。



セロトニン1B受容体 セロトニン2A受容体

図1. 得られたセロトニン受容体結晶

#### (2)リガンド結合実験

結晶化に用いた変異体のリガンド結合能を調べたところ、セロトニン 1B 受容体では GR1275743 に対する結合親和性が約 50 nM、セロトニン 2A 受容体では Ketanserin に対する結合親和性が約 12 nM であった。いずれも文献値と比較すると 5 倍から 10 倍程度結合が弱くなっているものの、高い結合能を保持していた(図 2)。

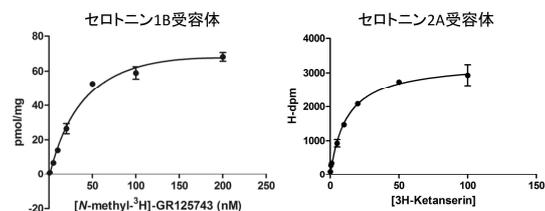


図2 結晶化に用いた変異体のリガンド結合実験

#### (3)セロトニン 1B、2A 受容体のリガンド結合部位の構造

##### セロトニン 1B 受容体

先行研究のセロトニン 1B 受容体と偏頭痛薬エルゴタミンとの複合体構造とを比較すると、その結合様式は大きく異なっていた(図 3 左)。GR127935 は結合ポケットに縦に伸びた状態で結合し、6 番目の膜貫通ヘリックス、および 3 番目の細胞外ループと相互作用していた。エルゴタミンはセロトニン 1B 受容体のアゴニストであるが、GR127935 はパーシャルアゴニストである。今後、さらなる解析

が必要であるが、リガンドの結合様式の違いが活性化の違いに与える可能性が示唆された。

#### セロトニン 2A 受容体

リスペリドンはセロトニン 2A 受容体のインバースアゴニストであり、エルゴタミンはセロトニン 2B 受容体のアゴニストであるため、受容体の全体構造は異なる。本研究においてセロトニン 2A 受容体とリスペリドンの複合体の立体構造を決定したことにより、セロトニン受容体で初めて不活性型構造を取得した。先行研究のセロトニン 1B、2A 受容体やヒスタミン受容体やアドレナリン受容体等のモノアミン受容体のリガンドとの結合様式と比較すると、リスペリドンはリガンド結合ポケットのより深部に結合していた(図3右、図中にはセロトニン 2B 受容体中のエルゴタミン構造を示した)。また、セロトニン 2A 受容体には4番目と5番目の膜貫通ヘリックス(図3右 TM4, 5)の間に他の受容体には無い特徴的なポアが存在していた。

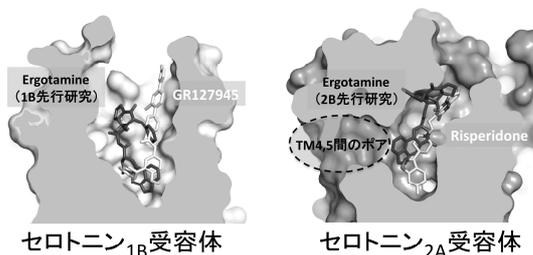


図3 構造解析により解明したセロトニン受容体の結合様式

#### (4)セロトニン 1B 受容体とセロトニン 2A 受容体の細胞外ループ構造の比較

細胞外ループ領域はGPCRの中でも多様性の高い領域で、アミノ酸配列、立体構造ともに受容体間の相同性は低い部分である。2011年の総説でもこの多様性が受容体の活性化に重要であると予想されている(Peeters M.C. *et al.*, 2011 *Trends Pharmacol. Sci.* 32 35-42)。

セロトニン 1B 受容体中の GR127935 およびセロトニン 2A 受容体中のリスペリドンは受容体の細胞外ループと相互作用していた。この二つの構造を比較してみると、細胞外ループの構造は大きく異なっていた(図4)。先行研究により立体構造が明らかになっているヒスタミン受容体やアドレナリン受容体等の他のモノアミン受容体と比較してもアミノ酸配列も立体構造も大きく異なっていた。さらなる研究が必要ではあるが、これらの相互作用はリガンド選択性に重要である可能性が示唆された。

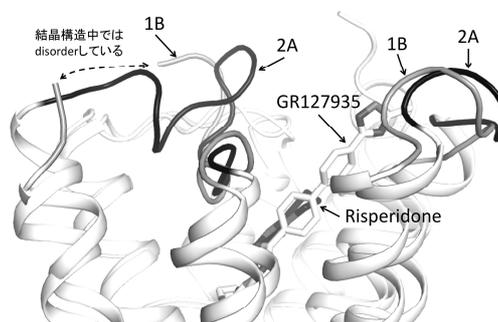


図4 GPCRの細胞外ループ構造の多様性 (セロトニン<sub>1B</sub>受容体とセロトニン<sub>2A</sub>受容体の比較)

#### (5)まとめ

セロトニン 1B 受容体と抗うつ薬候補化合物 GR127935、セロトニン 2A 受容体と統合失調症治療薬リスペリドンの複合体の立体構造を取得したことにより、向精神薬のリガンド選択性に重要な結合ポケットの分子構造を詳細に明らかにすることができた。この構造を用いることでドッキングシミュレーションや生化学実験を高精度で行うことが可能となり、選択性の高い薬剤の開発に重要な知見を得ることができた。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takanori Nakane, Shinya Hanashima, Mamoru Suzuki, Haruka Saiki, Taichi Hayashi, Keisuke Kakinouchi, Shigeru Sugiyama, Satoshi Kawatake, Shigeru Matsuoka, Nobuaki Matsumori, Eriko Nango, Jun Kobayashi, Tatsuro Shimamura, Kanako Kimura, Chihiro Mori, Naoki Kunishima, Michihiro Sugahara, Yoko Takakyu, Shigeyuki Inoue, Tetsuya Masuda, Toshiaki Hosaka, Kensuke Tono, Yasumasa Joti, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Makina Yabashi, Tsuyoshi Inoue, Osamu Nureki, So Iwata, Michio Murata, and Eiichi Mizohata, Membrane protein structure determination by SAD, SIR, or SIRAS phasing in serial femtosecond crystallography using an iododetergent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 13039-44 (2016) 査 読 有  
DOI:10.1073/pnas.1602531113

〔学会発表〕(計 2 件)

Takanori Nakane, Kanako Kimura, Eiichi Mizohata *et al.*,(申請者は 31 人中 14 番目の共著者) New Iododetergent for Rapid Experimental Phasing of Membrane Proteins in Serial Femtosecond Crystallography. 14th Conference of the

Asian Crystallographic Association, 2016,  
December ポスター発表、査読有

中根智、花島慎弥、鈴木守、齋木悠、  
林太一、垣之内啓介、杉山成、川竹悟  
史、松岡茂、松森信明、南後恵理子、  
小林淳、島村達郎、木村香菜子、森千  
寿、国島直樹、菅原道泰、高久陽子、井  
上茂之、榊田哲哉、保坂俊彰、登野健  
介、城地保昌、亀島敬、初井宇記、矢  
橋牧名、井上豪、濡木理、岩田想、村  
田道雄、溝端栄一、膜蛋白質の SFX  
による迅速位相決定を志向したヨウ素  
含有界面活性剤の開発 2016年11月17  
日 日本結晶学会平成 28 年度年会 ポ  
スター発表、査読有

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 香菜子(KIMURA, Kanako)  
京都大学・大学院医学研究科・特定研究員  
研究者番号：40726204

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し

### (4) 研究協力者

島村 達郎 (SHIMAMURA, Tatsuro)  
京都大学・大学院医学研究科・特定講師  
研究者番号：90391979