

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04338

研究課題名(和文) G蛋白質非依存的な情報伝達を行い、抗癌剤の標的であるケモカイン受容体の構造解析

研究課題名(英文) Trial for determining the structure of CXCR7

研究代表者

島村 達郎 (Shimamura, Tatsuro)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：90391979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ケモカイン受容体CXCR7は、様々ながん細胞で大量に発現しており、新たな抗がん剤の創薬ターゲットと考えられているGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。CXCR7の特徴としては、他のケモカイン受容体と配列上の類似性が高いにもかかわらずGタンパク質を介す情報伝達経路を持たず、アレスチンを介す情報伝達経路だけを持つことが挙げられる。本研究計画では、創薬や機能解明に役立てるため、CXCR7の構造解析を目指した。現状では、結晶が得られず、構造解析は成功していない。

研究成果の概要(英文)：Chemokine receptor CXCR7 is a member of G protein coupled receptors (GPCR) and a potential drug target. CXCR7 is highly expressed in cancer cells and mediates tumor metastasis. Uniquely, CXCR7 does not couple to G protein but to beta-arrestin. The aim of this project is to determine the 3D structure of CXCR7. Currently, we have not succeeded to obtain crystals of CXCR7.

研究分野：構造生物学

キーワード：結晶構造解析 Gタンパク質共役型受容体

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上に存在する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、シグナル伝達に関与し、細胞外からシグナルを受け取るとその立体構造を変化させ、シグナルを細胞内に伝える。このように生命に必須な役割を果たしていることから、GPCR は多くの病気に関係し、重要な創薬ターゲットでもある。GPCR は、細胞内に存在する G タンパク質を介して情報伝達を行うと考えられていたが、この他にも β アレスチンを介す経路も持つことが明らかになった。G タンパク質と β アレスチンを介す経路は、それぞれ異なる応答を引き起こす。GPCR をターゲットとするアゴニストには G タンパク質もしくは β アレスチンを介す経路の両方を活性化してしまい副作用を持つものが多いが (バランス型アゴニスト)、目的の経路だけを活性化し、副作用を抑えたバイアス型リガンドの開発が期待されている。GPCR の G タンパク質を介す情報伝達経路については、これまでの生化学的研究などに加え、GPCR と G タンパク質との複合体の立体構造が発表され、理解は進んでいる。一方で、 β アレスチンを介す情報伝達経路については、構造情報が無いことなどから理解は遅れており、バイアス型リガンドの開発の妨げにもなっている。

最近になり機能が解明されたケモカイン受容体 CXCR7 は、ケモカイン CXCL11 と CXCL12 を受容する GPCR である。CXCR7 は、脳腫瘍や肺がんなど様々ながん細胞で大量に発現しており、抗体で阻害するとがんの増殖・転移が抑制される。そのため、CXCR7 は新たな抗がん剤の創薬ターゲットと考えられている。CXCR7 の独特な特徴としては、他のケモカイン受容体と配列上の類似性が高いにもかかわらず G タンパク質を介す情報伝達経路を持たず、 β アレスチンを介す情報伝達経路だけを持つことが挙げられる。このようなことから CXCR7 は、 β アレスチンを介す情報伝達機構の構造基盤を解明する研究に適した GPCR である。

2. 研究の目的

近年、薬のターゲットとなるタンパク質の立体構造情報に基づく **structure-based drug design** により合理的に化合物を絞り込む創薬の手法が利用されるようになってきた。構造解析が非常に難しかった GPCR も、重要な創薬ターゲットであることから世界中の研究者がその立体構造解析を目指して研究を行い、様々な工夫により、構造解析の成功例が増えつつある。また、それらの構造を使った **structure-based drug design** も行われている。

本研究計画では、CXCR7 とリガンドとの複合体の立体構造解析を成功させ、効率的な抗がん剤の開発に役立つ構造情報を取得する。また、他の GPCR の構造との比較や変異体の機能解析を行い、 β アレスチンを介すバイアス型情報伝達機構の詳細を解明するとともに、G タンパク質を介す経路の構造情報と合わせ、

GPCR の複雑な情報伝達機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

GPCR は、構造が柔軟なため不安定で、そのままでは結晶化が困難である。そこで構造を安定化させるために以下の方法を用いた。まず、柔軟性の高い細胞内第 3 ループを構造のゆらぎが少なく安定な別のタンパク質へ置換した。このようなタンパク質としては、他の GPCR の構造解析で利用された T4 リゾチーム (T4L) や cytochrome b562RIL (bRIL)、rubredoxin などに加え、他の親水性タンパク質を利用した。更に、構造を固定するためにリガンドを結合させた。CXCR7 のリガンドは、親和性の高いものは市販されているものが少ないが、オランダの共同研究先からも提供された。オランダの共同研究先からは、いくつかの GPCR の構造解析で利用された小型の抗体であるナノボディーも提供された。このほか、CXCR7 に変異を導入することでも安定性の向上を試みた。これらの組み合わせで安定なコンストラクトを作製し、結晶化を試みた。ゲルろ過による単分散性と、CPM アッセイなどによる熱安定性で評価した。

4. 研究成果

CXCR7 の安定化のため、細胞内第 3 ループをいくつかの水溶性タンパク質に置換し、単分散性を比較した。その結果、bRIL もしくは T4L に置換した場合が、void の割合が低く、比較的良好な単分散性を示した。図 1 に代表的な単分散性の例を示す。

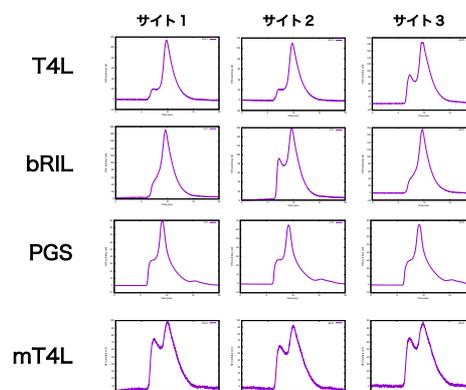


図 1 単分散性の例

変異導入による安定性の向上も試みた。変異導入部位は、他の GPCR の構造解析例を参考にし、2 重変異体や 3 重変異体も作製した。変異体の単分散性の例を図 2 に示す。野生型に比べ、単分散性が向上する変異体が複数同定できた。

安定なコンストラクトのスクリーニングでは、単分散性の評価に加え、熱安定性の評価も行った。熱安定性は当初は CPM アッセイで評価していたが、精製が必要なことから時間がかかっていた。そこで、途中からは蛍光ゲルろ過法を利用した (図 3)。蛍光ゲルろ過法によりスクリーニング効率が上がった。

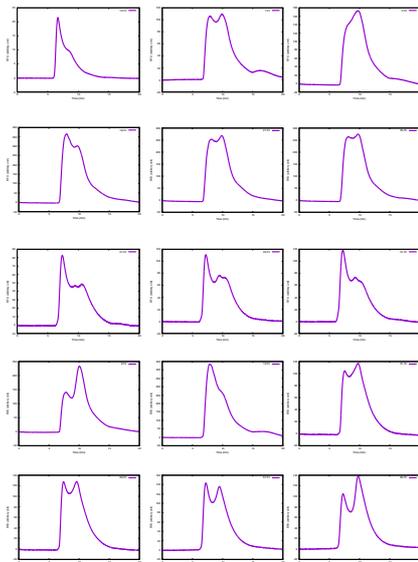


図2 変異体の単分散性の例

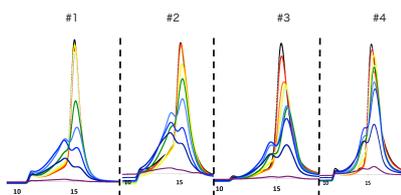


図3 蛍光ゲルろ過法による評価例

また、発現細胞の検討も行った。酵母細胞より昆虫細胞での発現が単分散性や熱安定性が良いことが確認できた (図4)。

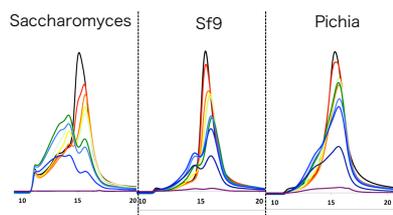


図4 発現細胞の検討

以上のような検討から、単分散性がよく、熱安定性の高いコンストラクトが得られた。それらのコンストラクトを大量発現させ、結晶化を試みた。結晶化の際には、低分子化合物の他、ペプチドや環状ペプチドとの複合体も試した。また、タンパク質にナノボディーを結合させた複合体も試した。現在までのところ、結晶は得られていない。

天然のリガンドであるケモカインの生産を試みた。大腸菌で発現させ、リフォールディングを行った。しかし、最終的に取得できる量が少なく、結晶化を試みる段階には至らな

かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8件)

① Suno R, Kimura KT, Nakane T, Yamashita K, Wang J, Fujiwara T, Yamanaka Y, Im D, Horita S, Tsujimoto H, Tawaramoto MS, Hirokawa T, Nango E, Tono K, Kameshima T, Hatsui T, Joti Y, Yabashi M, Shimamoto K, Yamamoto M, Rosenbaum DM, Iwata S, Shimamura T, Kobayashi T.

Crystal Structures of Human Orexin 2 Receptor Bound to the Subtype-Selective Antagonist EMPA.

Structure. 2018 Jan 2;26(1):7-19. e5.

doi: 10.1016/j.str.2017.11.005.

② Nango E, Royant A, Kubo M, Nakane T, Wickstrand C, Kimura T, Tanaka T, Tono K, Song C, Tanaka R, Arima T, Yamashita A, Kobayashi J, Hosaka T, Mizohata E, Nogly P, Sugahara M, Nam D, Nomura T, Shimamura T, Im D, Fujiwara T, Yamanaka Y, Jeon B, Nishizawa T, Oda K, Fukuda M, Andersson R, Båth P, Dods R, Davidsson J, Matsuoka S, Kawatake S, Murata M, Nureki O, Owada S, Kameshima T, Hatsui T, Joti Y, Schertler G, Yabashi M, Bondar AN, Standfuss J, Neutze R, Iwata S.

A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin.

Science. 2016 Dec 23;354(6319):1552-1557.

doi: 10.1126/science.aah3497.

③ Nakane T, Hanashima S, Suzuki M, Saiki H, Hayashi T, Kakinouchi K, Sugiyama S, Kawatake S, Matsuoka S, Matsumori N, Nango E, Kobayashi J, Shimamura T, Kimura K, Mori C, Kunishima N, Sugahara M, Takakyu Y, Inoue S, Masuda T, Hosaka T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Yabashi M, Inoue T, Nureki O, Iwata S, Murata M, Mizohata E.

Membrane protein structure determination by SAD, SIR, or SIRAS phasing in serial femtosecond crystallography using an iododetergent.

Proc Natl Acad Sci USA. 2016 Nov 15;113(46):13039-13044.

DOI: 10.1073/pnas.1602531113

④ Horita S, Nomura Y, Sato Y, Shimamura T, Iwata S, Nomura N. High-resolution crystal structure of the therapeutic antibody pembrolizumab bound to the human PD-1. Sci Rep. 2016 Oct 13;6:35297. doi: 10.1038/srep35297.

⑤ Kabe Y, Nakane T, Koike I, Yamamoto

T, Sugiura Y, Harada E, Sugase K, Shimamura T, Ohmura M, Muraoka K, Yamamoto A, Uchida T, Iwata S, Yamaguchi Y, Krayukhina E, Noda M, Handa H, Ishimori K, Uchiyama S, Kobayashi T, Suematsu M. Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. Nat Commun. 2016 Mar 18;7:11030. doi:10.1038/ncomms11030.

⑥ Nakane T, Song C, Suzuki M, Nango E, Kobayashi J, Masuda T, Inoue S, Mizohata E, Nakatsu T, Tanaka T, Tanaka R, Shimamura T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Iwata S, Sugahara M. Native sulfur/chlorine SAD phasing for serial femtosecond crystallography. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2015 Dec 1;71(Pt 12):2519-25. doi: 10.1107/S139900471501857X.

⑦ Nomura N, Verdon G, Kang HJ, Shimamura T, Nomura Y, Sonoda Y, Hussien SA, Qureshi AA, Coincon M, Sato Y, Abe H, Nakada-Nakura Y, Hino T, Arakawa T, Kusano-Arai O, Iwanari H, Murata T, Kobayashi T, Hamakubo T, Kasahara M, Iwata S, Drew D. Structure and mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5. Nature. 2015 Oct 15;526(7573):397-401. doi: 10.1038/nature14909.

⑧ Tono K, Nango E, Sugahara M, Song C, Park J, Tanaka T, Tanaka R, Joti Y, Kameshima T, Ono S, Hatsui T, Mizohata E, Suzuki M, Shimamura T, Tanaka Y, Iwata S, Yabashi M. Diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA (DAPHNIS): application to serial protein crystallography using an X-ray free-electron laser. J Synchrotron Radiat. 2015 May;22(3):532-7. doi:10.1107/S1600577515004464.

[学会発表] (計 4件)

① Dohyun Im, Tatsuro Shimamura, So Iwata
A first novel GPCR structure determined at SACLA
The International Symposium on Frontiers in structural biology for drug development

② 島村達郎
X線自由電子レーザーを用いたGPCRのシリアルフェムト秒構造解析.

日本薬学会第137年会 (2017.3.26) 仙台

③ 藤原孝彰、森本志保、山中保明、中根崇智、平田邦生、山下恵太郎、岩田想、島村達郎
ヒスタミン H1 受容体による抗ヒスタミン薬の認識機構
日本結晶学会2016年度年会(2016.11.17) 水戸

④ 島村達郎 X線自由電子レーザーを用いたGPCRの構造解析. 第16回日本蛋白質科学会年会 (2016.6.8) 博多

[図書] (計 1件)

① Shimamura T.
Overview of membrane protein purification and crystallization.
Advanced Methods in Structural Biology. 2016 105-122. Springer.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

菅 裕明 (SUGA, Hiroaki)
東京大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 00361668

山中 保明 (YAMANAKA, Yasuaki)
京都大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 10724049

野村 紀通 (NOMURA, Norimichi)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10314246

藤原 孝彰 (FUJIWARA, Takaaki)
京都大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 70712751

(4) 研究協力者

林 到ヒョン (IM Dohyun)