

令和 2 年 12 月 18 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K18376
研究課題名(和文) ヒトGPCRであるドパミンD2受容体のX線結晶構造解析

研究課題名(英文) Structural Study of Human Dopamine D2 Receptor

研究代表者
林 到ヒョン (Im, Dohyun)
京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：50721883
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)：Gタンパク質共役受容体であるドパミン受容体(DRD)は、神経伝達物質であるドパミンを受容することで運動、知覚や情動などに関与することが知られており、脳神経疾患の治療薬の標的タンパク質として注目されている。本研究では、DRD2のX線結晶構造解析を行い、ドパミンが関与する神経伝達や脳神経疾患の理解を深めることを目指した。DRD2を特異的に認識する機能性抗体を生産し、複合体を形成することで結晶化に成功した。SPRING-8のマイクロフォーカスビームにて解析に必要なデータを取得し、最高分解能2.7Åで構造を決定することに成功した。今回決定した構造はリガンド非結合型の構造であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
脳神経疾患の治療薬の標的として最も重要なターゲットタンパク質の一つであるドパミン受容体の立体構造解明と向精神薬との結合様式の解明は、今後新たな薬剤の開発への展開ができることで社会に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The neurotransmitter dopamine controls numerous physiological functions in the brain and periphery via dopamine receptors in the G-protein-coupled receptor superfamily. Five dopamine receptors (DRD1-DRD5) are found in humans and DRD2 plays important pharmacological roles in numerous human disorders related to dopaminergic dysfunction, such as schizophrenia and Parkinson's disease. In this study, we generate the functional antibody, which specifically recognizes DRD2, and we determined the ligand-free DRD2 structure using this antibody. This structure is believed to clarify the drug binding mechanism by comparison with already known antipsychotics binding structures. We also believe that it can help understand the mechanism of dopaminergic dysfunction.

研究分野：構造生物学

キーワード：Gタンパク質共役受容体 GPCR X線結晶構造解析 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ドパミンが関与する神経伝達や脳神経疾患の理解に寄与するため、また、効果が高く副作用の少ないドパミン D2 受容体 (DRD2) 特異的薬剤の創出に役立つ構造情報を得るため、DRD2 の結晶構造解析を試みた。研究開始当初には 5 種類のドパミン受容体 (DRD) のうち、ドパミン D3 受容体のみ構造が明らかになっていた。G タンパク質共役受容体 (GPCR) の構造解析は極めて難しい標的タンパク質である。その原因は、GPCR の構造そのものが非常に不安定であるため安定に生産・精製できない、細胞外に存在する親水性領域が極端に少なく結晶性が悪いことが考えられる。DRD2 を含む GPCR の構造を解明するためにこれらの課題を克服する技術開発が期待されていた。

2. 研究の目的

統合失調症やパーキンソン症候群等の脳神経疾患の治療薬の標的タンパク質として注目されている DRD2 の X 線結晶構造解析を行い、ドパミンが関与する神経伝達や脳神経疾患の理解を深めることを目指した。統合失調症の治療薬である抗精神病薬は DRD2 に遮断薬として働く。特に現在主に使われている第二世代の抗精神病薬 (非定型抗精神病薬) は DRD2 だけではなく、セロトニン 2A 受容体も遮断することによって第一世代の定型抗精神病薬が持つ副作用 (錐体外路症状) が緩和されているが、他の類縁のアミン受容体にも結合する場合があります。眠気、口の渇きなどの副作用が生じる。本研究では、DRD2 と抗精神病薬との複合体構造解析を目指すことで、薬剤の正しい結合様式を理解の上、副作用の少ない抗精神病薬の開発に役立つことを目指す。

3. 研究の方法

本研究を遂行するために行った方法を以下に示す。DRD2 の安定化変異体を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 系による GFP ハイスループット法により作製、昆虫細胞を用いた大量生産、精製系の構築 (精製産物は抗体作製の抗原として使用) リポソームに再構築した DRD2 精製産物をマウスへ免疫し、脾臓細胞とミエロマを細胞融合させることでハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマが生産する抗体に対して各種スクリーニングを行い、DRD2 を特異的に認識する機能性抗体を選別した。膜タンパク質の結晶化において抗体フラグメントは、親水性表面に特異的に結合することにより親水性部分を多くし、結晶の形成を助ける役割をする新たな結晶化戦略である (図 1)。本研究におい

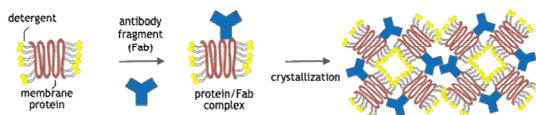


図 1. 抗体フラグメントを用いた膜蛋白質の結晶化戦略

ても DRD2 を特異的に認識する抗体フラグメントを用い、結晶化の効率向上を試みる。DRD2 の精製品と抗体の複合体を形成させた後、脂質キュービックフェーズ (LCP) 法により結晶化を行った。得られた結晶は大型放射光施設 (SPring-8) BL32XU のマイクロフォーカスビーム及び X 線自由電子レーザー (XFEL) 施設 (SACLA) で回折データを収集し、構造解析を行った。

4. 研究成果

DRD2 を特異的に認識する機能性抗体 Fab3089 を取得することに成功した。この抗体は、受容体に結合することでその熱安定性を向上させる安定性効果があることが確認された。さらに受容体の安定化を図るために、既存の融合タンパク質であるアポシトクロム b562 変異体 (bRIL) を改変した mb11G を創製し、変異体スクリーニングから得られた点変異導入体と組み合わせることで受容体の安定性が大幅に向上したものを得ることができた。これら安定化 DRD2 と Fab3089 の複合体を用いて LCP 結晶化を行うことで結晶を得ることができた (図 1)。これら結晶を用い

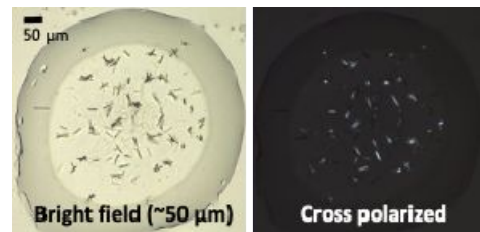


図 2. DRD2-Fab3089 複合体の結晶

て SPring-8 BL32XU にて回折実験を行った。今回、回折実験に使用した結晶はサイズが小さい微結晶であったため、マイクロフォーカスビームを利用し、結晶ごとに 10 度分の回折データを収集した。SPring-8 の KAMO システムを用いて各データ群のクオリティの評価・クラスタリングを行い、良質なデータのみを選別しマージすることで構造解析に必要なデータセットを揃えることができた。その後、分子置換、構造精密化などを行うことで DRD2 の立体構造を最大分解能 2.7 Å で決定することに成功した (図 2)。今回は、全ての実験において第二世代抗精神病薬のエチクロプリドの混入下で行い、エチクロプリドとの結合様式を解明することを試みた。しかしながら、明らかにした DRD2 の構造のリガンド結合ポケットにはエチクロプリドに相当する電子密度は見えておらず、リガンドフリーの状態であることが分かった。我々は、結晶化を促進するために用いた抗体 Fab3089 がエチクロプリドの結合を妨げていると判断している。今後追加の生化学実験を行うことで抗体とリガンドの結合の相関について追及することとともに、新たな抗精神病薬との結晶化を試み、薬物結合型の DRD2 の構造解明を目指す予定である。

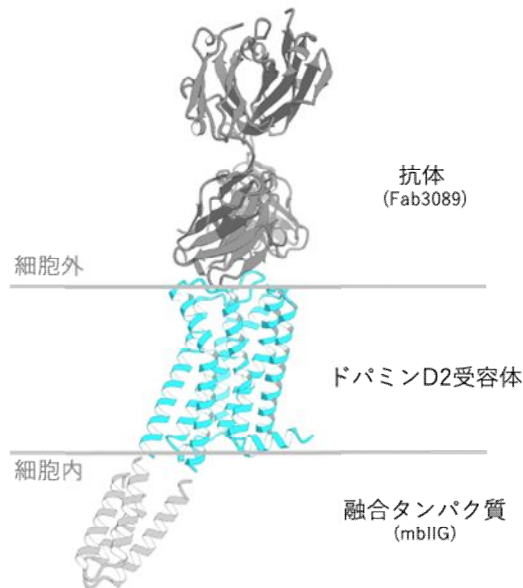


図 1 . DRD2-Fab3089 複合体の全体構造

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 3 件)

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. 2016. A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science*. 354(6319), 1552-1557 (査読あり)
DOI: 10.1126/science.aah3497

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. 2018. Crystal Structures of Human Orexin 2 Receptor Bound to the Subtype-Selective Antagonist EMPA. *Structure*. 26(1), 7-19 (査読あり)
DOI: 10.1016/j.str.2017.11.005.

Im D, Matsui D, Arakawa T, Isobe I, Asano Y and Fushinobu S. 2018. Ligand complex structures of L-amino acid oxidase/monooxygenase from *Pseudomonas* sp. AIU 813 and its conformational change. *Structure*. 26(3), 312-324 (査読あり)
DOI: 10.1002/2211-5463.12387

[学会発表] (計 3 件)

Im D, Ogasawara S, Tanaka Y, Suno C, Hino T, Murata T, Shimamura T and Iwata S, Structural analysis of agonist-bound adenosine A2a receptor using by functional antibody. The 12th GPCR conference, Tokyo, Japan, 2015 (Poster presentation)

Im D, Shimamura T, Iwata S. A first novel GPCR structure determined at SACL. 2017 International Symposium on Frontiers in structural biology for Drug Development, Pohang, Korea, 2017 (Oral presentation, Invited seminar)

Im D, Yamanaka Y, Fujiwara T, Nakane T, Uemura T, Mori C, Kimura K, Nango E, Hirata K, Yamashita K, Iwata S and Shimamura T. Structural insights into antipsychotics binding modes in dopamine D2-class receptors. Keystone Symposia: GPCR Structure and Function - Taking GPCR Drug Development and Discovery to the Next Level, Santa Fe, USA, 2018 (Poster presentation)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 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 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

林 到ヒョン (Im Dohyun)
京都大学大学院医学研究科・特定助教
研究者番号： 50721883

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()