

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22570110

研究課題名（和文）X線結晶解析による GCCase 受容体の作動機構の解明

研究課題名（英文）Structure and functional analysis of the GCCase receptor by x-ray crystallography

研究代表者

小川 治夫 (OGAWA HARUO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：40292726

研究成果の概要（和文）：

血圧・体液バランスの維持に不可欠な心房性利尿ペプチド(ANP)受容体に代表される、グアニル酸シクラーゼ(GCase)受容体が「ホルモンを認識する機構」と「膜を隔ててシグナルを伝達する機構」は、未だ解明されていない。そこで「ANP受容体の細胞外ドメインと様々なリガンド複合体との構造解析」と、「精製受容体を用いたキネティックス実験」を組み合わせることで、その解明に取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：

ANP receptor, which belongs to a member of guanylyl cyclase (GCCase) receptor family, plays a key role in the regulation of blood pressure and body fluid balance in our body. The mechanisms "how the GCCase receptor recognizes hormone" and "how the receptor transmits the hormone-binding signal to its intracellular domain" are still unknown. To elucidate the mechanisms, we performed x-ray crystallography of the ANP receptor extracellular domain complexed with ligands and kinetics experiments of the receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：受容体, ANP, ホルモン, 膜受容体, 膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

GCCase受容体は副腎、脳、肺、腸から嗅覚・網膜細胞にまで幅広く存在する、分子量約130Kの膜1回貫通型受容体である。2量体として機能し、細胞外にホルモン結合部位、細胞内にGCCaseドメインを持ち、ホルモンの結合に伴いGTPをcGMPに変換する。最も良く研究されているANP受容体は、心房より分泌され

体液バランスの調節や血圧の維持に必須なホルモンANPと、心室より分泌され同様の効能を持つ脳性利尿ペプチド(BNP)の受容体である。膜1回貫通型受容体として広く研究されているEGF受容体に比べ、GCCase受容体はクローニングされてからまだ20年あまりと研究が浅いが、その医療での貢献は極めて高い。実際、ANP・BNPそのものは心臓保護作用も併

せ持つ唯一の急性心不全治療薬であり、世界で数百億円の巨大な市場を持つ。だが、ANP・BNPとも、血中寿命は約30分であり、長寿命の誘導体が求められていた。GC-B受容体はC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の受容体であるが、この受容体の変異は、遠位中間肢異形成症(小人症の一種)の原因となり、そのアゴニストは治療薬に直結する可能性もある。GC-C受容体は、毒素原生大腸菌が生産する耐熱性エンテロトキシンの受容体としても知られる。特に幼児に致死的であるために発展途上国で深刻な問題である急性の下痢の大部分は、エンテロトキシンによるGC-C受容体の恒常的な活性化が原因とされる。この様に、GC受容体とリガンド複合体の構造解析は社会的にも強く要請されているが、機能と構造を結びつけた研究は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究では血圧・体液バランスの維持に不可欠な心房性利尿ペプチド(ANP)受容体に代表される、グアニル酸シクラーゼ(GCase)受容体のX線結晶解析を通じ、GCase受容体が「ホルモンを認識する機構」と、「膜を隔ててシグナルを伝達する機構」の構造的解明を目指す。また、構造情報とキネティックス実験とを組み合わせることにより、「GCase受容体の作動機構がEGF受容体に代表される他の膜1回膜貫通型受容体と大きく異なる理由」の解明を目指す。GCase受容体の構造解明は、心筋梗塞等の創薬などの社会的要請にも応えられる。

3. 研究の方法

ANP受容体、GC-B受容体の細胞外ドメインを大量発現・精製し、様々なリガンドとの共結晶を作成し、X線結晶構造解析を行った。また、得られた精製蛋白を用いて生化学実験を行ない、リガンド認識機構を調べた。また、全長受容体についてもアデノウイルス/哺乳類培養系を用いて大量発現し、精製条件の検討を行った。

4. 研究成果

(1)「ANP受容体細胞外ドメイン/リガンド複合体の構造解析」

ANP受容体細胞外ドメインと様々なリガンドとの共結晶を作成し、その構造解析に取り組んだ。取り組んだリガンドは、表1に示す通りで、ANPとその派生体が①～⑥の6種類、BNPが⑦と⑧の2種類、CNPが⑨の1種類、DNPとその派生体が⑩と⑪の2種類の、計11種類である。当初計画していた複合体は①, ②, ⑦, ⑧の4種類であったため、ANP受容体のリガ

ド認識機構を考える上で予想以上の展開を見せた。①, ②とANP受容体の複合体結晶からは、結晶化条件の検討と高輝度放射光施設SPring-8の利用により、分解能を2.1 Åにまで(図1a)、また、BNPに関しては分解能が2.2 Åと(図1b)飛躍的に上げることが成功した。この分解能では水分子もはっきりと解像でき、現在解析中ではあるが、ホルモンと受容体の結合には多数の水分子が関与していることが明らかになりつつある。また、それぞれのホルモンのC末端が受容体認識に大きな違いを与えていることも明らかになった。また、ANP/BNP以外のリガンドでも、当初申請書に記載していなかったアフリカに生息する毒蛇グリーンマンバの⑩DNPとの複合体結晶も得ることができるという、予想外の発展も見せた。DNPはANPやBNPと高いホモロジーを持つペプチドで、ANP受容体に結合し作用することが知られている。ヒト等にも未だ単離されていないものの、同様のペプチドの存在が指摘されている。環状構造以降のC末端の長さに特徴があり、ANPで5残基、BNPで6残基だが、DNPは15残基と長い。また、生体内のペプチド分解酵素に対する強い抵抗性を持つことや、ANPよりも高い活性を示すことから、創薬面で大いに注目されている。これもSPring-8で2.4 Å分解能のデータを得ることができ、現在解析中であるが、C末端の構造がANPともBNPとも大きく異なることが明らかになった(図1c)。以上の結果は「ホルモンを認識する機構」の理解に大きく寄与すると考えられるとともに、急性心不全の画期的創薬にも大いに貢献できると考えられる。一方、この分解能を持ってしても、リガンドが結晶中50%の占有率で2回対称を伴い受容体に結合しているため、正確なモデリングが困難であることも明らかになった。そこで、本研究の過程で、長さや生物種が異なる複数のリガンドを組み合わせることで、正確にモデリングを行なうという手法を開発した(図1d)。具体的には2つの異なるリガンド複合体結晶からのデータの $|F_{obs}| - |F_{calc}|$ マップを計算することで、アミノ酸が極端に異なる部分を可視化するというものである。また、C末端やN末端の正確なモデリングのためにも、C末端やN末端が欠損したリガンド(③, ④, ⑤)との共結晶の作成を行なった。これにより、これまで可視化不能であったN末端についてもモデリングが可能になりつつある。本手法は、モデリングが困難なペプチド複合体の結晶構造解析を行う際に有効な手法と考えられ、一般性も多いにあると考えられる。以上のリガンドとは別に、当初申請書に記載していなかった、ANPが2量体の構造をとるとされるβ ANPとの複合体結晶も得ることができた。β ANPの複合体構造ではANP複合体構造に比べホルモンを挟み込む受容体モノマー間の幅

が大きくなると予想されるため、受容体が「ホルモンを認識するメカニズム」を考える上でも有機的な構造であると考えられる。まだ分解能が4 Åとモデリングに十分でないため、今後結晶を改善し、分解能の向上に努める予定である。また、これも当初申請書に記載していなかったことであるが、本来はGC-B受容体のリガンドである⑨CNPとの複合体結晶も得ることができた。CNPはANP/BNPとは異なり、分子内SS結合以降のC末端を欠損しているためにANP受容体に結合できないのではないかと考えられてきたため、本結晶を得られたことは驚きであった。これも分解能が4 Åとモデリングに十分でないため、今後結晶を改善し、分解能の向上に努める予定である。

以上の様に、リガンド複合体の解析は大きな進展を見せた。現在解析を進めるとともに、その結果を論文にまとめている最中である。

上記の研究とは別に、ANP受容体のリガンド結合活性を制御する、分子内塩素イオンに関する研究も行った。塩素イオンがどの程度の時定数・結合定数でANP受容体に作用するかを明らかにするため、リガンドが結合した結晶を直接臭素イオン溶液に一定時間ソーキングし、臭素原子に特異的な波長でデータ収集を行った。その結果、ソーキング3時間後には塩素イオンが臭素イオンにほぼ置換されている事を確認した(図2)。これは、生体内でもリガンドが結合した受容体から塩素イオンが離れ、その結果リガンドが受容体から遊離し、受容体が非活性化状態になる可能性を示唆している。ソーキング後、様々な時間で結晶を凍結し高分解能でデータ解析することや、臭素イオン置換を行った結晶を逆に塩素イオン溶液にバックソークし経時変化を追う等の実験を行なうことを今後予定している。結果がまとまり次第、論文としてまとめる予定である。

表 1: 結晶化に成功したリガンド

	リガンド	長さ	生物種
①	rANP (1-28)	全長	ラット
②	hANP (1-28)	全長	ヒト
③	hANP (5-27)	5-27 残基	ヒト
④	hANP (5-28)	5-28 残基	ヒト
⑤	hANP (7-28)	7-28 残基	ヒト
⑥	β ANP	全長	ヒト
⑦	rBNP	全長	ラット
⑧	hBNP	全長	ヒト
⑨	hCNP	全長	ヒト
⑩	DNP	全長	グリーンマンバ
⑪	desDNP	30-31 欠損	グリーンマンバ

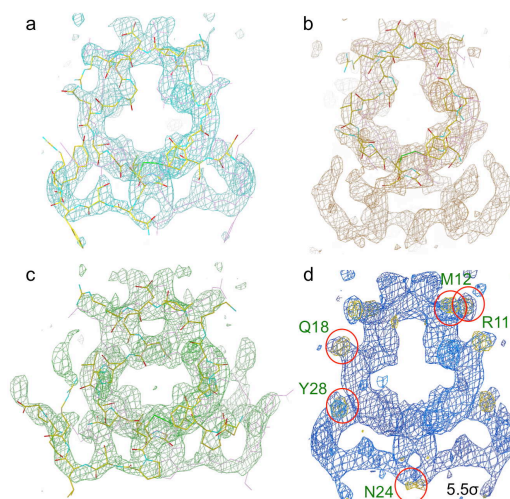


図 1: ANP 受容体に結合したリガンドの構造とその電子密度図。(a) ANP, (b) BNP, (c) DNP。リガンドはリング状の共通の骨格を持つことが分かる。一方、C末端にそれぞれの特徴があることも分かる。(d) ANPの電子密度図(青)に重ね合わせた $|F_{obs}| - |F_{obs}|$ マップ(黄)。リガンド間のアミノ酸の違いが、電子密度図の違いとして示すことができた。

Anomalous difference Fourier map (15σ)

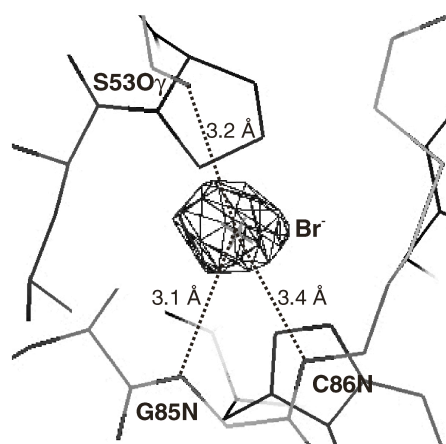


図 2: ANP 受容体/ANP 複合体結晶中、塩素イオン結合部位に塩素イオンに置き換わり結合した臭素イオン。臭素の異常分散を利用し、結合した臭素イオンのみを可視化した。15σでマップを描いた。

(2) 「GC-B受容体の発現・精製と、その機能構造解析」

GC-Bの細胞外ホルモン結合ドメインの発現・精製を行なったサンプルと、培養細胞に発現した全長受容体を用い、GC-B受容体リガンドに対する K_d 、並びに、 EC_{50} の計測を行なった。その結果、 EC_{50} は K_d に対し少なく

ともオーダーが1桁高いことが判明した。ANP受容体ではKdとEC50はほぼ同じことから、この結果は、GC-B受容体とANP受容体の間でリガンドを認識する機構が異なる可能性を示唆している。以上の結果は、発表論文(1)にまとめた。

一方、本解析に関しては、新たな展開を見せた。受容体のシグナル伝達には受容体が2量体を形成することが肝心であるが、これを直接定量的に観察する手法はこれまで無かった。そこで新しい手法の開発を行なった。精製蛋白と「blue-native-PAGE」とを組み合わせることで、ANP受容体とGC-B受容体のリガンドの結合に応じ2量体を形成することを直接観察できる簡便な系を構築することができた。この系を用いると、受容体リガンドを結合していない時にはモノマーの位置にバンドが確認できるが、リガンドを結合し2量体をとる場合には2量体の位置にバンドが確認できる。これを利用することで、従来研究が不可能であった、リガンドの変異(例えばANPのC末端を削る等)が2量体形成に影響を与えるかどうかを測定することが可能になった。実際、ANPのC末端を削ることがANP受容体の2量体形成に大きな影響を与えることが判明した。現在、本システムを活用し、ANP受容体とGC-B受容体リガンドを認識する機構の違いの詳細な解析を行っており、近く論文にまとめる予定である。

GC-B受容体の結晶化に関しては、CNPとの複合体結晶について取り組んでいるものの、未だ結晶を得ていない。GC-B受容体をCNP-アフィニティーカラムで精製後、さらにゲル濾過で精製を行い、余分な糖鎖をシアリダーゼで除去する等の工夫を行なったが、未だ沈殿が得られるのみであった。今後も結晶化の試みは継続する予定であるが、これまで取り組んではこなかったCNP非存在下での結晶化も試みる予定である。また、今回の結晶化に用いた受容体の配列についても(例えばC末端を少し削る等を行う等の)見直しを行うことを検討する予定である。

(3)「全長ANP受容体の発現・精製系の確立」

全長受容体を大量に得るために、ANP受容体を発現する変異アデノウイルスを作成し、変異ウイルスを大量調整・精製した。変異ウイルスをCOS1細胞に感染させ、発現させたANP受容体をウェスタンブロッティングで確認したところ、目的受容体の発現は確認された。だが、一方、多量の分解産物もラダーとして確認された。様々な細胞にウイルスを感染させ、最終的にCOS7細胞が分解産物も少なく、多量の受容体を得ることが可能である

ことが明らかになった。そこで、150mmの培養ディッシュ40枚のCOS7細胞に変異ウイルスを感染させ、72時間後に細胞を回収・破碎を行ない、膜断片を得た。精製のための準備として、可溶化のために最適な界面活性をスクリーニングしたところ、ドデシルマルトシドが効率よく受容体を可溶化できることが判明した。従って、大量精製を行なうための基盤を確立することには一応成功した。今後はこの系を用い、大量精製を行なうことを継続して行う予定である。

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)

Okamoto, N., Ogawa, H., Toyoshima, C. A new method for establishing stable cell lines and its use for large-scale production of human guanylyl cyclase-B receptor and of the extracellular domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **426**, 260-265 (2012) 査読有り

[学会発表] (計2件)

①小川治夫, 平田絢美, 杖田淳子, 豊島近, ANP受容体のホルモン認識機構, 第84回日本生化学会(2011年9/21-9/24, 国立京都国際会館)

②小川治夫, 安田絵美, 平田絢美, 杖田淳子, 豊島近, ANP受容体とホルモンの複合体のX線結晶構造解析II, BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会, 合同大会)(2010年12/7-12/10 神戸国際展示場)

[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

小川治夫 (OGAWA HARUO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：40292726

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：