

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18486

研究課題名(和文) 抗パーキンソン病薬の設計に向けた作動薬結合型ドーパミンD1受容体の構造機能解析

研究課題名(英文) Structure and functional study of the agonist-bound dopamine D1 receptor for the development of antiparkinson

研究代表者

藤原 孝彰 (Fujiwara, Takaai)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：70712751

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)：ドーパミンD1受容体は、パーキンソン病などの神経変性疾患に対する治療薬の重要な標的分子である。本研究では、安定なD1受容体の発現コンストラクトを作製し、発現コンストラクトの精製方法を検討した。作製した組み換えD1受容体は、良好な純度で精製できることが確認できたため、今後、D1受容体の結晶化および構造解析を達成することが期待された。また、ドーパミンと異なる生体アミン受容体として、ヒスタミンH1受容体の構造解析に成功し、2種類の抗ヒスタミン薬の結合様式の詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The dopamine D1 receptor is one of the drug target for neurodegenerative disorders including Parkinson's disease. The structural information of the D1 receptor provides insights into the ligand recognition, which leads to the development of the novel drug for the treatment of Parkinson's disease. The aim of this study is to reveal the structure of the D1 receptor bound to an agonist as a potential antiparkinson drug. We designed expression constructs of the D1 receptor with fusion proteins into the disordered loops of the receptor. Then, we solubilized engineered receptor constructs and purified them. Further investigation for improvement of the yield of the purified receptors allows to accomplish crystallization and the following structure determination of the D1 receptor hereafter. On the other hands, we successfully crystallized the histamine H1 receptor, and determined the structures of the H1 receptor bound to the ligand, which revealed the interaction manner of the ligand.

研究分野：構造生物化学

キーワード：構造生物 膜タンパク質 X線結晶構造解析 Gタンパク質共役受容体 アミン受容体 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

脳内のドーパミンは、生物に快をもたらす行動や情動と深く関わるため、ドーパミン受容体の機能障害によって、深刻な社会問題となるパーキンソン病などの神経変性疾患や統合失調症などの精神疾患が引き起こされる。パーキンソン病は、線条体に分布する D<sub>1</sub> 受容体の機能減退に伴うドーパミン伝達不足に起因すると考えられ、D<sub>1</sub> 受容体の機能を促進する作動薬（アゴニスト）がパーキンソン病に対する典型的な治療薬として利用されてきた。しかし、D<sub>1</sub> 受容体を標的としたパーキンソン病治療薬は、妄想や幻覚といった統合失調症の陽性症状を誘発することが知られ、正常に機能する D<sub>2</sub> 受容体に非選択的に薬剤が作用し、機能を亢進させることが原因の可能性がある（図1）。実際、統合失調症の陽性症状に対して処方される治療薬の多くは、D<sub>2</sub> 受容体の機能を抑制する拮抗薬（アンタゴニスト）である。したがって、アゴニスト結合型 D<sub>1</sub> 受容体の立体構造を決定することが、D<sub>1</sub> 受容体に対して選択的に作用する候補化合物を合理的に設計する上で重要である。

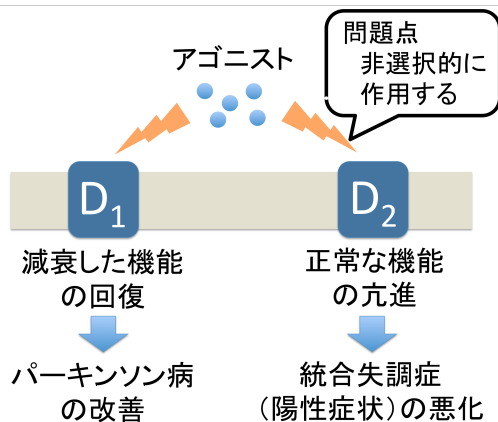


図1 ドーパミン受容体作動薬の薬理活性

## 2. 研究の目的

ドーパミン D<sub>1</sub> 受容体の機能を促進する薬剤は、パーキンソン病などの神経変性疾患に対する治療薬として処方される。しかし、これらの治療薬の多くは、ドーパミン D<sub>2</sub> 受容体に非選択的に作用することで、副作用を誘発することが懸念される。D<sub>1</sub> 受容体の立体構造を原子レベルで決定し、リガンドの結合様式を明らかにすることは、D<sub>1</sub> 受容体に対する選択性が高い薬剤を合理的に設計する上で重要である。本研究では、アゴニスト結合型 D<sub>1</sub> 受容体の結晶構造を決定し、リガンド結合試験と組み合わせ、リガンド認識に重要なアミノ酸残基を特定する。そして、D<sub>1</sub> 受容体を標的とした新規薬剤の開発を推進するための基盤情報を得る。また、他のアミン系受容体の立体構造を決定し、D<sub>1</sub> 受容体との構造を比較することで、基質選択性に対する理解を深化させる。

## 3. 研究の方法

### (1) 安定な発現領域の探索

D<sub>1</sub> 受容体は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のひとつである。GPCR は、活性状態と不活性状態の動的平衡状態となるため、均一な高次構造を形成することができる発現領域を探索する必要がある。そのために、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* による相同組み換えを利用して、発現領域の異なる複数のヒト由来組み換え D<sub>1</sub> 受容体を発現させる。蛍光ゲルろ過法 (fluorescence-detection size-exclusion chromatography: FSEC) により、発現させた標的タンパク質の単分散性を評価することで、作製した多数の発現コンストラクトの中から、良好な性状を示すものを選抜する。

### (2) 大量発現、精製

安定な発現領域を決定した時点で、メタノール資化性酵母 *P. pastoris* と昆虫細胞 *sf9* を発現宿主とした標的タンパク質の大量発現を行う。次に、超遠心分離により回収した膜画分から、界面活性剤を用いて標的タンパク質を抽出する。抽出した標的タンパク質は、リガンドを含む緩衝液を用いて、アフィニティ精製を主体とした方法で高純度に精製する。

### (3) 結晶化

結晶化を試行するのに十分量 (1 mg 程度) の精製標品が得られた場合には、脂質キュービック相 (LCP) 法により、標的タンパク質を脂質二重膜に再構成させたキュービック相を形成させる。Mosquito などの微量結晶化セットアップロボットを使用して、沈殿剤の種類や濃度、pH 等を変化させた自作の結晶化組成液とキュービック相を混合することで、結晶化の初期条件を探索する。初期結晶が得られた結晶化組成液に添加剤を加えたり、タンパク質濃度等を検討することで、結晶化条件を最適化する。

### (4) 回折測定、構造解析

一般的に膜タンパク質は、疎水性領域が界面活性剤で覆われており、結晶中のパッキングに関与する親水性表面が少ないため、可溶性タンパク質と比較して結晶が得られにくく、得られた場合でも、微細 (10-50 μm 程度) な結晶にしか成長しないことが多い。そこで、兵庫県にある大型放射光施設 SPring-8 の BL32XU における高輝度のマイクロフォーカス X 線ビームや SACLA における X 線自由電子レーザー (X-ray free electron laser: XFEL) を併用して、多数の微小結晶から回折データを収集する。その後、種々の構造解析プログラムにより、得られた回折像からの回折強度測定、分子置換法による位相決定、モデル構築、構造精密化などを行い、立体構造を決定する。得られた立体構造を基に、リガンドの結合様式を明らかにする。

#### (5) 変異体解析

得られた立体構造を基に、リガンドの認識に関与するアミノ酸残基を変異したコンストラクトを部位特異的変異導入により作製する。作製した発現プラスミドを *P. pastoris* に導入して、細胞膜に発現させる。細胞膜から抽出した膜画分に対して、放射性同位体標識されたリガンドを含有するリガンド溶液を作用させることで、*in vitro* の競合阻害試験を行う。計時的に放射線量を測定することで結合定数を算出し、リガンド認識に対する当該アミノ酸残基の寄与を生化学的に検証する。

#### (6) 類縁アミン受容体の構造解析

上記の研究手法によるドーパミン D<sub>1</sub> 受容体の構造解析が難航する場合には、同手法にしたがって、標的受容体の立体構造の比較対象となる他のアミン系受容体の構造解析を行い、アミン系受容体間におけるリガンドの選択性に関する構造学的知見を得る。

### 4. 研究成果

#### (1) ドーパミン D<sub>1</sub> 受容体の安定な発現領域の候補を選定した。

一般的に GPCR は、膜貫通領域外のループが構造上不安定であることが知られている。本研究では、これまでに構造解析された GPCR の発現コンストラクトを参考に、cytochrome b<sub>562</sub>RIL (bRIL) または好熱菌由来 glycogen synthase (PGS) を GPCR の N 末端と細胞内第 3 ループ (ICL3) の片方または両方に融合したコンストラクトを作製した。作製した組み換え発現コンストラクトに対して、FSEC により単分散性を試験した結果、N 末端と ICL3 の両方を可溶性タンパク質で置換したコンストラクトはいずれも良好な単分散性を示した (図 2)。

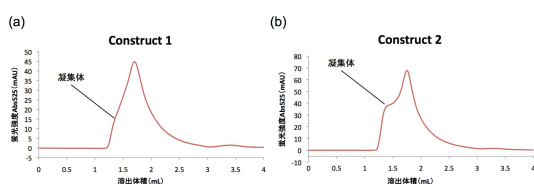


図 2 コンストラクトによる単分散性の違い  
N 末端と ICL3 の両方に可溶性タンパク質を融合したコンストラクト (a)、ICL3 のみに可溶性タンパク質を融合したコンストラクト (b)

次に、これらのコンストラクトに対して、熱安定性を向上させる点変異を導入した変異体を作製することで、標的受容体のさらなる安定性の向上を図った。作製したコンストラクトに対して同様に、FSEC による性状解析を行った結果、点変異導入前後で単分散性の顕著な改善は見られなかったものの、導入した点変異の種類によって受容体の発現量が向上するコンストラクトを探索すること

ができた。結果として、可溶性タンパク質の融合箇所や点変異の導入パターンを変えることで、研究期間内に 100 種類以上の発現コンストラクトを作製し、その中から、大量発現と精製を行うのに適した複数種のコンストラクトを選抜した。

#### (2) ドーパミン D<sub>1</sub> 受容体の精製条件を検討した。

まず、選抜した発現コンストラクトを *P. pastoris* にて大量発現させた。発現時の培養温度を検討した結果、18~20 °C で発現させた場合に発現量、単分散性ともに良好であることが示された (図 3)。

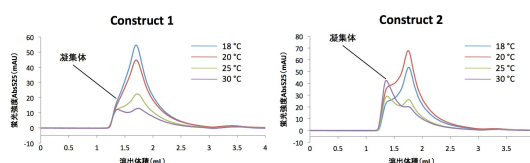


図 3 培養温度による単分散性の違い

リガンド分子存在下で、界面活性剤であるドデシルマルトシド (DDM) を用いて、発現させた標的受容体を細胞膜から抽出した。抽出した受容体をヒスチジンタグとの親和性を利用した精製により、良好な純度で精製した。しかし、精製標品の収量が低く、結晶化に利用するには至らなかった。GFP の蛍光強度に基づく標的タンパク質の総発現量と DDM による可溶化後の標的タンパク質の量の比較から、大部分の発現タンパク質が可溶化されずに沈殿することが低収量の原因と考えられた。そこで、発現宿主として *Sf9* 細胞を用いたり、可溶化時のリガンドの種類や濃度を検討することで可溶化効率の改善を試みた。結果として、根本的な収量の改善には繋がらなかったが、より高い安定性を有する発現コンストラクトを選抜することができれば、確立した精製手法に準拠して精製標品を得ることが期待される。

#### (3) ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の構造を決定し、リガンドの結合様式を解明した。

D<sub>1</sub> 受容体の構造解析と並行して、D<sub>1</sub> 受容体との構造比較の対象となるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の構造解析を進めた。8 種類の化合物との複合体の精製および LCP 法による結晶化に成功した (図 4)。すなわち、H<sub>1</sub> 受容体と多様な化合物との複合体の生産基盤を確立したと言える。

SPring-8 の BL32XU と SACLA の XFEL を利用することで、得られた微小結晶から回折データを収集した。結果として、2 種類の化合物と H<sub>1</sub> 受容体との複合体の立体構造を 2.7 Å および 3.0 Å 分解能で決定し、化合物の詳細な結合様式を明らかにした (図 5)。得られた立体構造を他のアミン系受容体の立体構造と比較することで、基質選択性に関与する残基を示した。これらの成果は、2016 年の日本

結晶学会年会にて発表した。さらに、もう一種類の化合物においては、3.0 Å 分解能の X 線回折データを取得し、現在、構造精密化を進行中である。以上の成果により、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の構造学的研究を大きく進展させることが期待される。

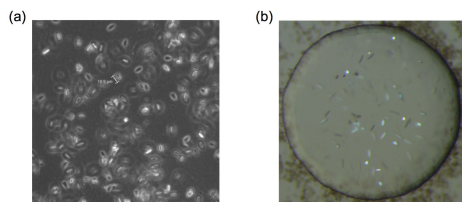


図4 オロパタジン結合型 H<sub>1</sub> 受容体の結晶 (a) とドキセピン結合型 H<sub>1</sub> 受容体の結晶 (b)

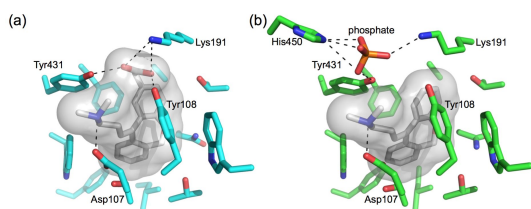


図5 オロパタジンの結合様式 (a) とドキセピンの結合様式 (b)

## 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)  
(査読あり)

Nango E., et al. (員数 45 名, 研究代表者は 22 番目に記載),

A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin.

*Science*, **354**, 1552-1557 (2016)

DOI 10.1126/science.aah3497

[学会発表](計 1 件)

学会名: 日本結晶学会 2016 年度年会

発表年月日: 2016 年 11 月 17, 18 日

場所: 茨城県立県民文化センター (茨城県・水戸市)

発表タイトル: ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体による抗ヒスタミン薬の認識機構

発表者名: 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 孝彰 (TAKA AKI, Fujiwara)

京都大学大学院医学研究科・特定研究員

研究者番号: 70712751

### (4) 研究協力者

島村 達郎 (TATSURO, Shimamura)

森本 志保 (SHIHO, Morimoto)