

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07172

研究課題名(和文) 化学療法・放射線治療を促進するエンドセリンB型受容体アゴニストの創薬展開

研究課題名(英文) Studies of prerequisites for ETB agonists to accelerate anti-cancer therapy

研究代表者

土井 知子 (Doi, Tomoko)

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00397580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血管収縮を調節するエンドセリンホルモン受容体ETBの熱安定化変異体を確立したことで、内在性アゴニストET-1 結合型ならびに阻害薬Bosentan結合型ETBの結晶構造が得られた。これら構造と生化学的、薬理的解析から、ET-1のC末5残基はETBの膜貫通領域に深く結合し、高い親和性と活性化能に寄与していること、一方、ヘリカル領域のY13, F14との相互作用はETBの完全活性化に必須であることが明らかとなった。また、膜貫通領域の水素結合ネットワーク構造はアゴニスト結合に伴って変化し、それらの特異的な相互作用はETBの完全活性化に必須であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ETB経路は、その血管弛緩作用から抗がん剤の効果を高め副作用を低減させる作用が、がん治療において期待されている。しかしながら未だにETB作用薬の非ペプチド性アゴニストが開発されていない。我々の研究が明らかにしたET-1結合型や阻害薬Bosentan結合型ETB構造を利用してリガンド認識、活性化機構を検証することは、独自のより選択的なETB作用薬の開発を加速して、がん治療法の進歩に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The peptide hormone endothelin regulates vascular tone and humoral homeostasis. The endothelin type B receptor (ETB), a G-protein coupled receptor (GPCR) was thermostabilized by introducing 4-5 mutations, which allowed crystallization of ET-1-bound and an antagonist, bosentan-bound ETB structures. Based on these structures, structure-function studies of ETB were carried out biochemically and pharmacologically. The results showed that the C-terminal 5 residues of ET-1 bound to the ETB transmembrane core tightly, responsible for high-affinity binding and high potency, whereas Y13 and F14 in the helical region of ET-1 were prerequisites for the full activation of ETB via interactions near the extracellular side. Furthermore, the hydrogen-bond networks observed in the transmembrane region of ETB changed from the bosentan-bound to the ET-1 bound structures and the interactions formed among these residues were essential for the full activation of ETB receptor.

研究分野：機能生物化学

キーワード：ペプチドGPCR シグナル伝搬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エンドセリン経路は、血管壁の緊張度や体液の恒常性を調節して、生命活動に必須の生理機能を担う。特に、エンドセリン B 型受容体(ET_BR)を介する血管弛緩作用は、毒性の高い抗がん剤のがん細胞への浸透を促進し正常細胞中の濃度を低下させることから、化学療法や放射線治療の効果を向上させ副作用を低減でき、がん治療において期待されている。しかし、現状では ET_BR 選択的アゴニストは、静脈内投与が必要なペプチド性 IRL1620 に限られ、非ペプチド性アゴニストは未だに開発されていない。申請者は、ET-1 結合および非結合 ET_BR 結晶構造解析を行って、内在性アゴニスト ET-1 の結合様式を解明した。しかしながら、21 残基の ET-1 ペプチドが広範な領域で受容体に結合することから、高い親和性や選択性に重要な相互作用、受容体を活性化構造に、あるいは不活性化構造に誘導する相互作用などが解明されていない。

2. 研究の目的

本研究計画では、独自の構造解析から示唆される分子認識機構を基に、ET_BR 変異体を調製する生化学的解析や阻害剤を用いる薬理的解析の手法を組み合わせ、ET_BR のリガンド選択性や不活性化構造の安定化機構、アゴニストによる活性化機構を明らかにし、ET_BR 選択的非ペプチド性アゴニストの開発を促進させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ET_BR リガンド選択性、高親和性の分子機構の解明

解析された ET-1 結合構造を基に、相互作用残基の変異体のリガンド親和性を、ET-1、ET-3 について検定する。リガンド親和性は ET_BR 変異体を HEK293T 動物細胞に発現させ、その細胞膜の [¹²⁵I]ET-1 結合を競合実験によって定量し、GraphPad Prism によってそれぞれの IC₅₀、pIC₅₀ 等を解析する。構造解析によって同定された ET-1 相互作用部位は 30 を超え、どの相互作用がアゴニスト活性発現に必要十分かを評価するには、ある程度数のリガンドと相互作用残基の変異の検討が重要であると考えられる。

(2) アンタゴニスト K8794 および Bosentan 結合 ET_BR の結晶構造の解析

ET_BR の熱安定化変異体を用いて、阻害剤結合受容体の結晶化による構造解析を共同研究で行う。得られた構造を基に、リガンド結合部位の確認を変異体による競合実験によって行う。また、ET-1 結合 ET_BR の構造との比較を行い、受容体活性化による構造変化を観察する。

(3) ET-1(8-21)ペプチド誘導体を用いて、活性化に影響を与える残基を特定する。

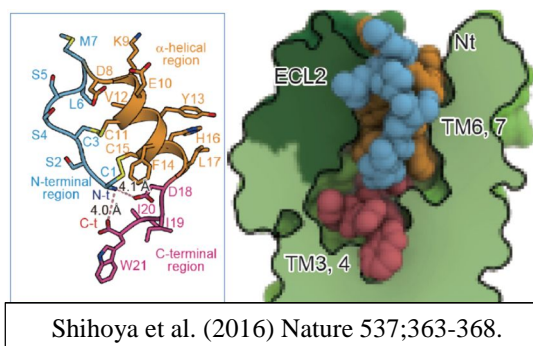
野生型 ET_BR と Gi タンパクをナノディスクに再構成し、ET-1(8-21)ペプチドの Ala 誘導体を用いて、活性化に影響する残基を同定する。

(4) ナノディスク再構成系を用いる ET_BR 変異体による G タンパク質活性化能の定量解析

ET_BR 変異体を昆虫細胞に発現させ精製した後にナノディスクに再構成し、Gi タンパクを加えて ET-1 依存性活性化能を測定する。変異体による pEC₅₀ や E_{max} を解析し、efficacy や potency を検討する。

4. 研究成果

(1) ET_BR リガンド選択性、高親和性の分子機構の解明



ET-1 結合構造(左図)から、受容体の細胞外領域、膜貫通領域を含む広い領域と ET-1 が相互作用していることがわかった。それぞれの相互作用部位を点変異した 30 種類の変異体を HEK293T 細胞に発現させ、その細胞膜を用いて ET-1、ET-3 による [¹²⁵I]ET-1 結合競合実験を行った。その結果、ET-1 結合において点変異はいずれも 10 倍未満の小さな欠損で、大きな結合欠損を引き起こさなかった。しかしながら、ET-3 に対しては、K161^{2,64}、K182^{3,33}、K273^{5,38}、R357^{7,24} の 4 残基が 100 倍

前後の大きな親和性減少を示した。このことは、

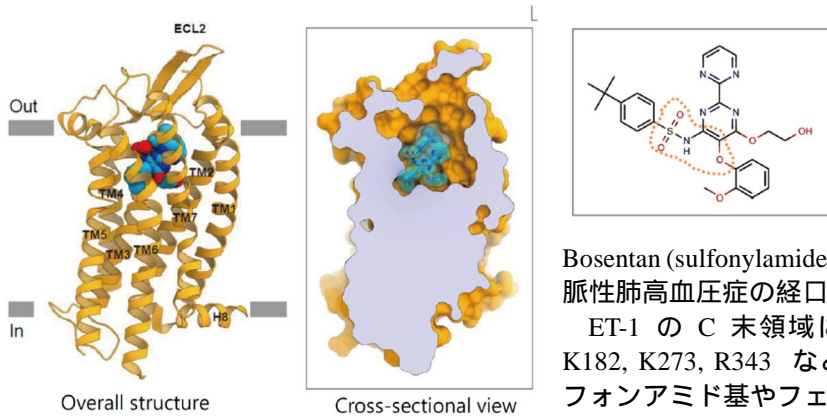
ET-1 は ET_BR の結合ポケットにぴたりとはまり、全体として強い結合親和性を得ている

多くの相互作用部位は ET-1(8-21)領域に集中していて、ET_BR にとっては ET-1(8-21)部分が結合の基本的な親和性を担う領域になっている。ET-1 の N 末領域 ET-1(1-7)は、受容体の外部に露出している、ET-1 のヘリカル領域 ET-1(8-16)は、受容体の細胞外領域から膜貫通領域にかけて広く相互作用している、ET-1 の C 末領域 ET-1(17-21)は、受容体膜貫通ドメインの結合ポケ

ットに深く結合して K161, K182, K273, R343 など多くの塩基性側鎖と相互作用している。

ET-3 は ET_BR に対して ET-1 と同等の親和性を示すが、両者で配列の異なる ET-1(1-7)部分の影響を受けて、K161^{2,64}, K182^{3,33}, K273^{5,38}, R357^{7,24} の 4 残基が ET-3 に対する結合親和性に重要な働きをしている。

(2)アンタゴニスト Bosentan 結合 ET_BR の結晶構造の解析



Bosentan 結合 ET_BR
Nat.Struct.Mol.Biol.(2017) 24, 758-764.

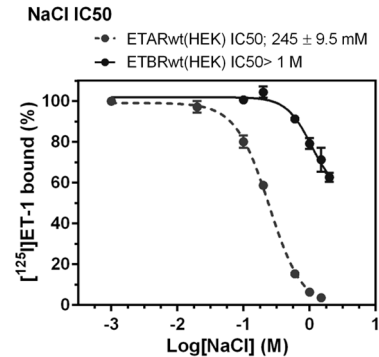
Bosentan (sulfonamide 誘導体、上図)は、肺動脈性肺高血圧症の経口治療薬である。

ET-1 の C 末領域に結合する残基(Q181, K182, K273, R343 など)が、Bosentan のスルホンアミド基やフェノキシエーテル部分と相互作用しており、それらの変異によって結合親和性が 100 倍程度低下した。阻害薬 Bosentan は、

作動薬 ET-1 と同様な結合部位を使って ET_B に結合し、受容体の活性化を妨げている。

Bosentan 結合構造と ET-1 結合構造を比較すると、ヘリックス 6, 7 が受容体中央部分に向かう動きに差がみられた。この違いは、最終的に細胞質領域の構造変化に繋がっていると考えられる。さらに、細胞質側に近い膜貫通領域における親水性残基と水分子を含む水素結合ネットワークが観察されたが、このネットワーク構造にも Bosentan 結合型と ET-1 結合型構造に差がみられた。

多くの A 型 GPCR の阻害剤結合構造において、膜貫通領域の水素結合ネットワーク中に Na⁺ が観察され、Na⁺ が不活性化構造の安定化に寄与していることが示唆されている。ET_B の ET-1 結合における Na⁺ 依存性を調べると、ET_B の ET-1 結合は Na⁺ の影響をほぼ受けないことが判明した。また、Bosentan 結合構造中にも Na⁺ は観察されず、ET_B の不活性化構造は Na⁺ なしでも水分子を含む水素結合ネットワークによって安定化されていると考えられる。一方、ET_A の ET-1 結合は Na⁺ 濃度 245mM 程度の IC₅₀ を示し、Na⁺ によって安定化されていると考えられる。



(3)ET-1(8-21)ペプチド誘導体を用いたペプチドマッピング

ET-1(8-21)の 14 残基中、システインを除く 12 残基について 1 残基ずつアラニンに置換したペプチド誘導体を用いて、ET_B に対する親和性ならびに ET_B の Gi 活性化能への影響を調べた。ET_B は昆虫細胞に発現させて精製しナノディスクに再構成した。Gi は α_{i1} サブユニットを大腸菌で、βγサブユニットを昆虫細胞で発現させて精製した。その結果、結合親和性や G タンパク活性化の高い potency には D8, L17, D18, I20, W21 による相互作用が重要な役割を果たし、ET_B の完全活性化には ET-1 のヘリカル領域にある Y13, F14 が必須であることが明らかとなった。

(4)ナノディスク再構成系を用いる ET_BR 変異体による G タンパク質活性化能の定量解析

膜貫通領域で観察された親水性残基と水分子を含む水素結合ネットワーク構造は、Bosentan 結合型と ET-1 結合型構造に違いがある。特に活性化に伴う構造変化と関連していると考えられたヘリックス 1, 2 と 7 の間で水素結合を形成する N119^{1,50}, D147^{2,50}, N378^{7,45}, N382^{7,49} と直接ヘリックス 6 の構造変化に関わる W336^{6,48} について、Gi 活性化能を検討した。それら変異体を昆虫細胞に発現させ精製を行ってナノディスクに再構成した。その結果、D147A, N382A 変異体は著しく活性化能が減少し、W336A, N378A 変異体も E_{max} が 60~80% 程度に減少した。これらから、活性構造中で観察された水素結合ネットワークは活性構造の形成や安定化に重要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shihoya Wataru, Nishizawa Tomohiro, Yamashita Keitaro, Inoue Asuka, Hirata Kunio, Kadji Francois Marie Ngako, Okuta Akiko, Tani Kazutoshi, Aoki Junken, Fujiyoshi Yoshinori, Doi Tomoko, Nureki Osamu	4. 巻 24
2. 論文標題 X-ray structures of endothelin ETB receptor bound to clinical antagonist bosentan and its analog	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 758 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nsmb.3450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 土井知子、谷一寿	4. 巻 262
2. 論文標題 エンドセリン受容体の初期活性化機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 812-813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Okuta, K. Tani, S. Nishimura, Y. Fujiyoshi & T. Doi.	4. 巻 428
2. 論文標題 Thermostabilization of the Human Endothelin Type B Receptor.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J. Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 2265-2274.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2016.03.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 W. Shihoya, T. Nishizawa, A. Okuta, K. Tani, N. Dohmae, Y. Fujiyoshi, O. Nureki, & T. Doi.	4. 巻 537
2. 論文標題 Activation Mechanism of Endothelin ETB Receptor by Endothelin-1	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 363-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nature19319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Doi, K. Kikuta, K. Tani	4. 巻 59
2. 論文標題 Characterization of critical residues in the extracellular and transmembrane domains of the endothelin type-B receptor for propagation of the endothelin-1 signal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1718 - 1727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tomoko Doi
2. 発表標題 Endothelin Receptor-Ligand binding and conformational changes
3. 学会等名 International GPCR Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土井知子
2. 発表標題 エンドセリン受容体の構造と機能
3. 学会等名 第2回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会6月2-3日 さっぽろ芸文館 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 土井知子
2. 発表標題 エンドセリン受容体のリガンド認識機構の研究
3. 学会等名 薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Kurihara, T.Doi,C.T. Gordon, J. Amiel, H. Kurihara
2. 発表標題 Human Mutations in Endothelin A Receptor Provide an Insight into Structural rearrangement in GPCR
3. 学会等名 Molecular Pharmacology Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西澤知宏, 志甫谷涉, 奥田明子, 谷一寿, 藤吉好則, 濡木理, 土井知子
2. 発表標題 エンドセリン-1によるエンドセリンB受容体の活性化機構
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 栗原由紀子、北沢太郎、小谷理紗、Christopher T. Gordon、河村悠美子、益田将、土井 知子、Jeanne Amiel、栗原裕基
2. 発表標題 GPCR エンドセリン A 受容体変異マウスによるヒト希少疾患の病態解明と予後の推測
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 志甫谷涉、西澤知宏、奥田明子、谷一寿、藤吉好則、濡木理、土井知子
2. 発表標題 エンドセリン受容体B型によるエンドセリン認識の構造基盤
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 志甫谷 渉、西澤知宏、奥田明子、谷一寿、藤吉好則、濡木理、土井知子
2. 発表標題 結晶構造から明らかになった、エンドセリン-1 によるエンドセリン受容体 B 型の活性化機構
3. 学会等名 第54回生物物理学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 志甫谷 渉、西澤知宏、奥田明子、谷一寿、藤吉好則、濡木理、土井知子
2. 発表標題 臨床薬ボセンタンの結合したエンドセリン受容体B型の結晶構造
3. 学会等名 第11回日本ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

T. Doi (2019). Structure and activation of endothelin ETB receptor by endothelin [Video file]. In The Biomedical & Life Sciences Collection, Henry Stewart Talks. Retrieved September 26, 2019, from https://hstalks.com/bs/4022/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	谷 一寿 (Tani Kazutoshi) (20541204)	三重大学・医学系研究科・特任教授 (14101)	