

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05000

研究課題名(和文)Gタンパク質共役型受容体のリガンド多様性に関する構造的基盤の研究

研究課題名(英文)Structural study for ligand recognition in G-protein coupled receptors

研究代表者

西澤 知宏(Nishizawa, Tomohiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：80599077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)のリガンド認識、および活性化機構の構造的な基盤を明らかにした。エンドセリン受容体に関しては、ペプチドアナログであるエンドセリン-3、IRL-1620、臨床的に用いられている阻害剤であるボセンタンとそのアナログであるK-8794と様々な作動薬、拮抗薬の結合した構造を明らかにすることで詳細の分子機構の解明に至った。他にもnon-EDGファミリーに属するLPA受容体であるLPA6、クラスBに属するペプチド受容体であるPACAP受容体などの構造を明らかにし、GPCRにおける普遍性と、その差異を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)はヒトを含む真核生物において細胞間でのシグナル伝達に関わる重要な膜タンパク質ファミリーである。既存の承認薬の30%はGPCRを標的するのに対して、いまだに構造の明らかになっていない受容体の数は多い。本研究では、血圧調節に関わるペプチド受容体であるエンドセリン受容体、細胞増殖などに関わる脂質受容体であるLPA6、神経における重要なシグナル伝達分子である下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)の受容体などに関して、構造を明らかにした。これらの情報は、構造をもとにした薬剤開発などにつながることで期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed the structural basis for the ligand recognition and activation of G-protein coupled receptors (GPCRs), by solving the structures of various receptors. In this research, we have successfully obtained the structures of endothelin receptor subtype-B (ETB), non-EDG LPA receptor LPA6, and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor, and the structural comparison revealed similarity and diversity of GPCRs.

研究分野：構造生物学

キーワード：GPCR X線結晶構造解析

## 様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

GPCR とそれを介した G タンパク質活性化によるシグナル伝達は視覚, 嗅覚のような感覚受容から血圧の調節, 神経伝達まで, 我々のからだの中で起こる様々な生理現象において重要な役割を担っている。すでに臨床応用されている薬剤のうち約 30% が GPCR を標的としたものであるように, GPCR によるシグナル伝達は創薬研究の標的として非常に重要な位置を占める。

GPCR はクラス A から F までの 6 つのグループに大きく分けられており, ヒトではリガンドや機能が不明なオーファン受容体を含む約 1000 種類が見つかっている。6 つのクラスの中でも最大のクラスである「クラス A (rhodopsin-like)」に分類される GPCR の生理学的リガンドは, アミンのような小分子からペプチドのような大きなものまで非常に多様性に富んでいる。また, クラス A GPCR による G タンパク質活性化機構には一定の共通性はあるものの, その分子機構の詳細はそれぞれの受容体によって異なる。したがって, それぞれの受容体におけるリガンドとの相互作用, リガンド結合による受容体活性化に伴う構造変化を明らかにすることは GPCR を標的とした薬剤開発において特に重要である。近年になり, 脂質膜中で膜タンパク質の結晶化を行う Lipidic Cubic Phase (LCP) 法の開発など実験手法におけるブレイクスルーによって GPCR の高分解能構造が多く報告されるようになり, これらの立体構造情報は新たな薬剤の開発や, 副作用の軽減などの薬理的性質の改善に直接的に用いられている。しかし, 現在までに構造情報が報告されている受容体は約 30 個程度にとどまっており, GPCR 全体の量からするとわずかな数% に満たないため, そのリガンド認識, および G タンパク質活性化機構における受容体間の普遍性と差異などに関しては多くの疑問が残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では, GPCR の中でも最大のグループであり, リガンド多様性における幅の広いクラス A GPCR に属する受容体を標的として, X 線結晶構造解析により複数状態の立体構造を明らかにし, リガンド認識, および G タンパク質活性化機構における受容体間の普遍性と差異を明らかにすることで, 薬剤開発などの基盤となる情報を得ることを目的とする。

#### (1) エンドセリン受容体の構造解析

エンドセリン受容体は, 21 アミノ酸からなるペプチドであるエンドセリンを受容して, 下流へとシグナルを伝達する。申請者はこれまでの研究において ET<sub>B</sub> 受容体がエンドセリン-1 に結合した状態, およびリガンド非結合状態の構造をそれぞれ報告し, エンドセリン-1 の結合による ET<sub>B</sub> 受容体活性化における構造変化を明らかにした。しかしながら, ボセンタンに代表されるようなエンドセリン受容体に対する非ペプチド性の小分子アンタゴニストは, ペプチドであるエンドセリン-1 との共通の化学骨格を持たない。そのため, その結合様式は未解明のままであった。本研究ではボセンタンとその類似体と受容体の複合体構造を明らかにすることで, 受容体活性化阻害機構, ペプチド性リガンドにおける相互作用との相違点などを明らかにする。また, ET<sub>B</sub> 特異的に結合するペプチド異性体と ET<sub>B</sub> の複合体構造を明らかにし, それらを比較することでサブタイプ間のアゴニスト選択性, 下流の G タンパク質シグナルにおける違いを明らかにする。

#### (2) LPA 受容体

申請者はさらに, リガンド認識に関する構造情報が非常に限られている脂質結合性 GPCR に注目して研究をすすめた。生体内において脂質分子は細胞膜の形成やエネルギー源として用いられるだけでなく, 様々な生理現象におけるシグナル分子としてはたらいっている。中でもリゾフォスファチジン酸 (LPA) に代表されるリゾリン脂質は細胞分化, 細胞増殖などに関わる重要な細胞増殖因子である。これらのリゾリン脂質は, 血管内皮細胞などから分泌された酵素によって産生され, 細胞表面で発現する GPCR である LPA 受容体を介して細胞内へとシグナルを伝える。LPA 受容体は EDG (Endothelial Differentiation Gene) ファミリーと non-EDG ファミリーに大きく分けられており, この 2 つのファミリーは進化的に離れておりアミノ酸配列相同性も低いことから, 異なるリガンド認識機構をもつと考えられている。EDG ファミリーに属する受容体である LPA1 の立体構造は報告されていたが (Hanson M. A. et al. Science 2012), non-EDG ファミリーの受容体に関する構造情報はいまだ不明であった。本研究では non-EDG ファミリーに分類される LPA 受容体に注目し, その構造解析を行うことで, P2Y ファミリー受容体における脂質リガンドの認識機構, および活性化機構を明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

構造解析のために Lipidic Cubic Phase (LCP) 法と呼ばれる方法で結晶化を行った。この方法では, 精製した GPCR を疑似的な脂質環境に再構成した状態で結晶化を行うため, 生理的条件下に近い状態での構造を明らかにできる。さらにこの方法では非常に密な結晶パッキング相互作用が形成されやすいために高分解能の構造解析ができるという利点が知られている。精製した受容体に様々なアンタゴニストを添加した状態で LCP による結晶化を行った。LCP による結晶は一般的に小さく, 解析が難しい。そこで回折実験には大型放射光施設 SPring-8 におけるマイクロフォーカスビーラインを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) エンドセリン受容体の構造解析

臨床薬として用いられているボセンタンなど, 非ペプチド性アンタゴニストと受容体の相互作用を明らかにするため, ボセンタンと ET<sub>B</sub> 受容体複合体の結晶構造解析を行った。結晶のサイ

ズが 10-20  $\mu\text{m}$  と非常に小さかったために、単一の結晶からデータ収集を行うことが困難であった。そこで、SPRING-8 マイクロフォーカスビームライン BL32XU における自動測定により、約 200 個程度の結晶からそれぞれ 5-10 度ずつの回折データ収集を行い、それらのデータをマージすることで構造解析を行ったところ、ボセンタンは受容体の結合ポケットの奥に突き刺さるようにして結合することがわかった。エンドセリン-1 の結合様式と比較してみたところ、驚くべきことにボセンタンはエンドセリン-1 の C 末端の形状を模倣するようにして受容体と相互作用していることが明らかになった(図 1)。その一方で、ボセンタンの置換基の一つが受容体の TM6 の方向に突き出しており、活性化に必要な TM6 の内側への動きを阻害していることがわかった。このような相互作用はボセンタンによるアンタゴニストとしての性質を説明するものであった。

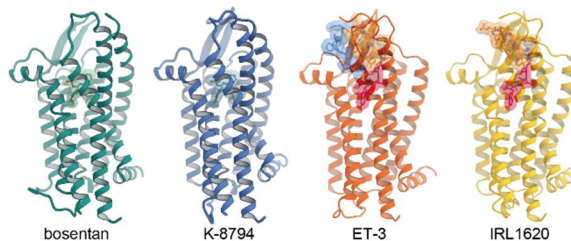


図 1 エンドセリン受容体とリガンドの複合体構造

ボセンタンは  $\text{ET}_A$  と  $\text{ET}_B$  受容体に同程度の強度で結合する「サブタイプ非選択性」のアンタゴニストであるが、ボセンタン誘導体の中には一方のサブタイプのみに強く結合するものが報告されている。このような、受容体における選択性を明らかにするため、K-8794 とよばれる  $\text{ET}_B$  選択的なボセンタン誘導体と  $\text{ET}_B$  受容体複合体の結晶構造解析を行った。K-8794 は基本的にボセンタンと同じ結合様式を示していることがわかった。K-8794 に導入されている大きな置換基は TM2 の方向に伸びていたが、 $\text{ET}_A$ ,  $\text{ET}_B$  受容体における変異体解析の結果から、この置換基と受容体のアミノ酸との間で特定の強い相互作用は形成していないことがわかった。一方で、 $\text{ET}_B$  受容体に対しても親和性の低い誘導体には、この部位に大きな置換基が見られることから、 $\text{ET}_A$ ,  $\text{ET}_B$  受容体ではポケットのこの部分におけるスペースに違いがあり、 $\text{ET}_B$  受容体は、大きな置換基も収納できるようになっており、より幅広い薬剤に結合できるということが明らかになった。

さらに、エンドセリン受容体におけるペプチド性のリガンドにおける活性化機構を明らかにするため、 $\text{ET}_B$  受容体特異的なペプチドアゴニストであるエンドセリン-3、および IRL1620 と  $\text{ET}_B$  受容体の複合体構造を明らかにした。IRL1620 はエンドセリンペプチドの一部を改変したペプチド性アゴニストであるが、その詳細を調べたところ、エンドセリンペプチドとは異なり、受容体の活性化レベルがやや低く、部分作動薬 (partial agonist) であることがわかった。構造を比較したところ、活性化には IRL1620 の結合した構造では、活性化に関わる受容体中央の水素結合が一部不活性型の特徴を保持しており、これが IRL1620 の活性化レベルの低下につながっていることが分かった。

## (2) LPA 受容体の機能構造解析

non-EDG ファミリーに属する LPA 受容体の遺伝子スクリーニングを行い、安定な挙動を示す LPA 受容体の探索を行ったところ、ゼブラフィッシュのもつ LPA6 の安定性が高いことを見出した。結晶化のために、フレキシブルな細胞内ループに安定なタンパク質である T4L を挿入したコンストラクトを作製し、昆虫細胞による発現系を用いて精製した LPA 受容体タンパク質を LCP 法による結晶化を行った。リガンド非存在下で得られた結晶を用いて、BL32XU において自動測定を行い、最終的に 3.2Å 分解能で構造結成に成功した(図 2)。明らかになった LPA 受容体は一般的な GPCR に見られる 7 本の膜貫通ヘリックスからなるフォールドを示していたが、TM4 と TM5 の膜貫通ヘリックスの間に大きくあいた疎水性の溝があり、この溝には脂質のアシル鎖に由来する強い電子密度が観測された。結合した脂質の頭部に相当する電子密度は観測できなかったが、受容体中央のポケットには複数の正荷電性アミノ酸が位置しており、これらの残基のアラニンへの変異は G タンパク活性化能を低下させることがわかった。したがって、LPA6 受容体は膜貫通領域にある疎水性の溝とポケット中央の正荷電性アミノ酸の両方で LPA のような負電荷の頭部をもつ脂質を認識していることが明らかになった。non-EDG ファミリーの LPA 受容体は、その配列相同性から、機能的には大きく異なる ATP 受容体を含む P2Y ファミリーに分類されている。そこで、LPA6 の構造を、P2Y ファミリーにおけるヌクレオチド受容体である P2Y1 と P2Y12 の結晶構造と比較を行ったところ、いずれの受容体でも基質のもつリン酸部分を受容体の TM6 に位置する正荷電アミノ酸によって認識されることという予想外の共通点を見出した。

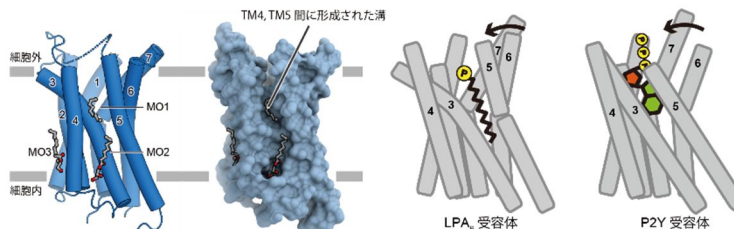


図 2 LPA 受容体の構造と活性化機構モデル

### < 引用文献 >

- R Taniguchi, *et al.* Structural insights into ligand recognition by the lysophosphatidic acid receptor LPA 6, *Nature*. 548, 356-360 (2017)
- W Shihoya, *et al.* X-ray structures of endothelin ETB receptor bound to clinical antagonist bosenstan and its analog, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 758 (2017)
- W Shihoya, *et al.* Crystal structures of human ET B receptor provide mechanistic insight into receptor activation and partial activation *Nat. Commun.* 9, 1-11 (2018)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Taniguchi Reiya, Inoue Asuka, Sayama Misa, Uwamizu Akiharu, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Yoshida Masahito, Tanaka Yoshiki, Kato Hideaki E., Nakada-Nakura Yoshiko, Otani Yuko, Nishizawa Tomohiro, Doi Takayuki, Ohwada Tomohiko, Ishitani Ryuichiro, Aoki Junken, Nureki Osamu	4. 巻 548
2. 論文標題 Structural insights into ligand recognition by the lysophosphatidic acid receptor LPA6	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 356 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nature23448	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 Lee Yongchan, Nishizawa Tomohiro, Takemoto Mizuki, Kumazaki Kaoru, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Minoda Ayumi, Nagatoishi Satoru, Tsumoto Kouhei, Ishitani Ryuichiro, Nureki Osamu	4. 巻 3
2. 論文標題 Structure of the triose-phosphate/phosphate translocator reveals the basis of substrate specificity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 825 ~ 832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-017-0022-8	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 Miyuchi Hirotake, Moriyama Satomi, Kusakizako Tsukasa, Kumazaki Kaoru, Nakane Takanori, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Dohmae Naoshi, Nishizawa Tomohiro, Ito Koichi, Miyaji Takaaki, Moriyama Yoshinori, Ishitani Ryuichiro, Nureki Osamu	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis for xenobiotic extrusion by eukaryotic MATE transporter	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01541-0	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 Kobayashi Kazuhiro, Shihoya Wataru, Nishizawa Tomohiro, Kadji Francois Marie Ngako, Aoki Junken, Inoue Asuka, Nureki Osamu	4. 巻 27
2. 論文標題 Cryo-EM structure of the human PAC1 receptor coupled to an engineered heterotrimeric G protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 274 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41594-020-0386-8">https://doi.org/10.1038/s41594-020-0386-8</a>	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7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tomohiro Nishizawa
2. 発表標題 X-ray crystal structures of the human endothelin type-B receptor (ETB)
3. 学会等名 15th Chinese Biophysics Congress (2017 ICBC) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西澤知宏
2. 発表標題 X線自由電子レーザーによって見えてきたチャネルロドプシンのイオン透過機構
3. 学会等名 第40回分子生物学会 (ConBio 2017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西澤知宏
2. 発表標題 植物鉄イオン輸送体VIT1の構造が明らかにした鉄イオン輸送における戦略機構
3. 学会等名 The 91st Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiro Nishizawa
2. 発表標題 Membrane Transporter Dynamics Revealed by CryoEM
3. 学会等名 The 92nd Annual Meeting of The Japanese Biochemical Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Nishizawa
2. 発表標題 Structural Insights Into Tetraspanin Function
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference CROSS-SCALE BIOLOGICAL STRUCTURE: FROM MACROMOLECULAR COMPLEXES & ORGANELLES TO CELLS & TISSUES (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西澤知宏
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による膜輸送体構造解析
3. 学会等名 CBI Annual Meeting 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Nishizawa
2. 発表標題 Structural biology of membrane transporters
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 71st JSCB & 19th PSSJ (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----