

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19349

研究課題名(和文) 分子量の小さいGPCRのクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析の挑戦

研究課題名(英文) Structure determination of GPCRs using CryoEM.

研究代表者

島村 達郎 (Shimamura, Tatsuro)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：90391979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜上に存在するGタンパク質共役型受容体(GPCR)は、シグナル伝達機構で働き、生命に必須な様々な機能に関係している。GPCRは、多くの病気に関係しているため、30%以上もの医薬品がGPCRをターゲットとしている。本研究計画では、GPCRに抗体を結合させることで分子量を大きくし、クライオ電子顕微鏡法により構造解析を行うことを目的とした。GPCRにしっかりと結合する抗体の作製に成功したが、電子顕微鏡でGPCR-Fab複合体を観察したところ、クライオ電子顕微鏡用のグリッド作製時にFabとGPCRが分離してしまっていることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な生命現象に関わっているGPCRは、機能的にも創薬ターゲットとしても重要な膜タンパク質である。従来のX線結晶構造解析の手法に加え、クライオ電子顕微鏡法でもGPCRの構造解析が可能になると、GPCRの立体構造が解明できる可能性が高まり、GPCRの機能の解析や、合理的な創薬に役立つ。本研究計画では、実際にクライオ電子顕微鏡法でGPCRの構造を決定するには至らなかったが、研究の過程で培った経験は、電子顕微鏡を用いた膜タンパク質の構造解析に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptors (GPCRs) are important drug targets. By binding a Fab fragment, we tried to determine the structures of GPCRs by electron microscopy. Unfortunately, the antibody was observed to be dissociated from GPCRs during the cryo-electron microscopy grid preparation. As a result, we have not succeeded to determine the structure of GPCRs by electron microscopy.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造解析

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上に存在する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、ヒトには 800 種類以上存在する。GPCR は、ホルモン、神経伝達物質、光、匂い、味などの細胞外からのシグナルを細胞内に伝えるシグナル伝達機構で働き、生命に必須な様々な機能に関係している。このようなことから GPCR は、高血圧症、パーキンソン病、不安症、花粉症など、多くの病気に関係しているため、30%以上もの医薬品が GPCR をターゲットとしている。GPCR は、細胞外からのシグナルや医薬品が結合するとその立体構造を変化させ、シグナルを細胞内に伝える活性型や、シグナルをブロックする不活性型になる。

タンパク質に作用する薬を開発する時には、ターゲットとなるタンパク質の立体構造が分かっていると効率的に薬剤設計ができる。実際にインフルエンザの治療薬タミフルは、ターゲットとなるインフルエンザウイルスのタンパク質の立体構造情報を利用した Structure Based Drug Design の創薬手法を用いて合理的にデザインされた。

既に述べたように GPCR は重要な創薬ターゲットであるため、その立体構造を X 線結晶構造解析の手法により解明しようとする研究が世界中で行われてきた。しかし GPCR は、その柔軟性のため不安定な点や大量発現が難しい点などが原因で結晶化が難しい。2007 年以降、画期的な GPCR の結晶化方法がいくつか発表され、我々の発表したヒスタミン H1 受容体 (Nature 2011) や アデノシン A2a 受容体 (Nature 2012) などの立体構造も含め、その後の数年間で約 30 種の GPCR の立体構造が発表された。しかしその後は新たな構造発表数も減り、結晶化が難しい GPCR の新しい構造解析手法の開発が期待されていた。

クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析は、タンパク質を急速に凍結し、非晶質な氷の薄い層に閉じ込められたタンパク質について、様々な方向を向いた電子顕微鏡像を取得し、それらを分類することでタンパク質の立体構造を決定する。電子顕微鏡用の試料の作製方法や、電子を検出するカメラなどの技術進歩により、この数年、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析ではデータの高分解能化が飛躍的に進んだ。また、測定対象となるタンパク質も小分子量化が進み、2016 年には、3.8 Å の分解能で、電子顕微鏡の理論的な分子量の下限 (100kDa) より小さい分子量 (93kDa) のタンパク質の構造が発表された。この 93kDa という値は、GPCR に抗体の Fab 断片を結合させた複合体の分子量と同等である。また、小さい膜タンパク質である GPCR は分子の形状に大きな特徴が無いが、GPCR に Fab 断片を結合させると特徴のある形状となり、電子顕微鏡画像上の分子の方位の認識に有利となると考えられた。我々は、アデノシン A2a 受容体の構造解析研究 (Nature 2012) などで、立体構造認識抗体を結合させて結晶化に成功しており、GPCR の抗体作製の経験も有していた。

2. 研究の目的

最近の創薬シーズ探索では、標的タンパク質の立体構造に基づく計算機を利用した薬物設計が利用されるようになり、GPCR の構造情報の取得は喫緊の課題となっている。分子量の小さい GPCR は、X 線結晶構造解析により構造決定されてきたが、大量発現が難しい点や、構造上の柔軟性のため GPCR が不安定な点などが原因で GPCR の結晶化は難しく、新しい構造解析手法の開発が期待されている。電子顕微鏡を用いたタンパク質の構造解析の利点は、結晶構造解析よりサンプル必要量が少ない点、結晶を用意する必要がない点などである。欠点としては、分解能が低い点や、分子量の大きなタンパク質しか研究対象にならない点などが挙げられた。しかしながら最近では、サンプル交換・回収、自動撮影など、操作性が向上したクライオ電子顕微鏡の開発や、動画撮影法の導入、優れた解析ソフトの開発などが相まって、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、これまでより小分子量のタンパク質が高分解能で構造解析されるようになってきた。理論的な予測では、電子顕微鏡を用いて近原子分解能で観察できるタンパク質の分子量の下限は、安定なタンパク質を用いた場合に ~100kDa とされている。従来では分子量が小さすぎて電子顕微鏡の研究対象とならなかった GPCR (分子量 40kDa 程度) について、以下に示す手法と、最新のクライオ電子顕微鏡技術を用いることで単粒子解析に挑戦し、電子顕微鏡を用いた GPCR の構造解析技術を確認することが本研究計画の目的である。

3. 研究の方法

GPCR をクライオ電子顕微鏡の単粒子解析で構造解析するためには、測定する分子を大きくする必要がある。GPCR の分子量 (40kDa 程度) と電子顕微鏡の測定可能分子量の下限 (100kDa 程度) には、60kDa 程度の分子量のギャップがある。これを解消するため、以下の方法を考えた。まず、GPCR の 7 本の膜貫通ヘリックスのうち、5 番目と 6 番目のヘリックスをつなぐループ領域に T4 リゾチームなどの固い構造を持つ水溶性タンパク質を挿入させる。GPCR は、このような融合タンパク質でもリガンド結合活性が保持されることが知られており、GPCR の X 線結晶構造解析研究ではこのような融合タンパク質で構造解析されている。次に、GPCR 本体、場合によっては融合させる水溶性タンパク質に対する抗体を作製し、その Fab 断片 (分子量 ~50kDa) を作製した融合タンパク質に結合させる。これにより分子量は 100kDa を超えることになる。Fab 断片を 2 個結合させればさらに分子量は大きくなる。

GPCR の発現については、これまで我々が行ってきた GPCR の構造解析研究と同様に、昆虫細胞や酵母の発現系を用いる。抗体は、精製した GPCR をリポソームに再構成して立体構造を保

ったままマウスに免疫し、2種類のスクリーニングを経て、立体構造を認識する抗体を取得する。

4. 研究成果

数種類の GPCR について5番目と6番目のヘリックスをつなぐループ領域に BRIL を挿入した融合タンパク質を作製した。これらを昆虫細胞を用いて大量発現させ、アフィニティー精製により純度よく精製した。典型的な例を以下の図1に示す。このようにして精製したサンプルをマウスに免疫し、数種類の抗体を取得した。この抗体と GPCR の複合体のゲルろ過の結果を図2に示す。GPCR と抗体 Fab 断片の複合体では、ピークの位置が移動している。

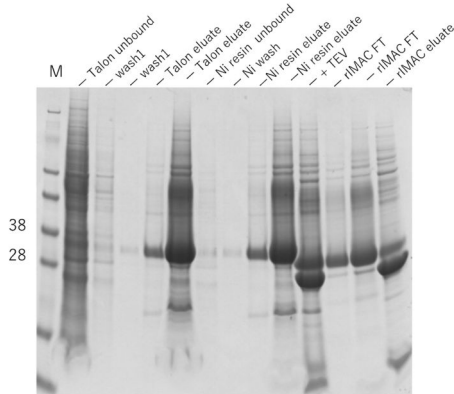


図1 SDS-PAGE

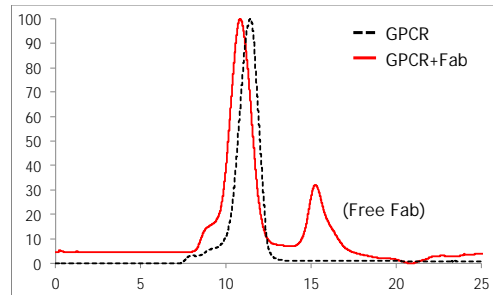


図2 ゲルろ過

まず、精製した GPCR-Fab 複合体をネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡(日立 HT7700)で観察したところ、直径が 2.0 nm 程度の複合体粒子が分散していることが確認できた(図3)。

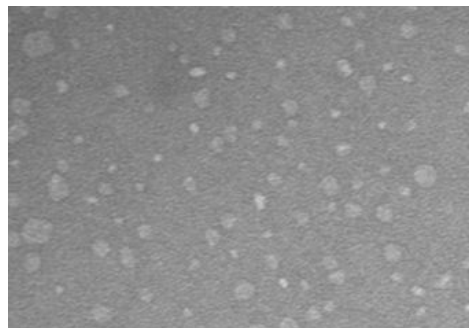


図3 GPCR-Fab 複合体の透過型電子顕微鏡による観察

同様な複合体について、電子顕微鏡(Thermo Fisher Scientific Glacios)で観察を行った。2D classification を行った結果の一例を図4に示す。画像からは、Fab が結合していると思われる粒子を見出すことは出来なかった。その結果、現在までに電子顕微鏡を利用した GPCR の単粒子解析は成功していない。クライオ電子顕微鏡での観察用に、急速凍結によりクライオグリッドを作製するが、その際に Fab が GPCR から外れてしまった可能性が考えられた。このような現象は、他の膜タンパク質-Fab 複合体でも観察されている。これらに対処するため、クライオグリッド作製条件の検討や、GPCR の可溶化に用いる界面活性剤の検討、異なる抗体の検討などを進めている。

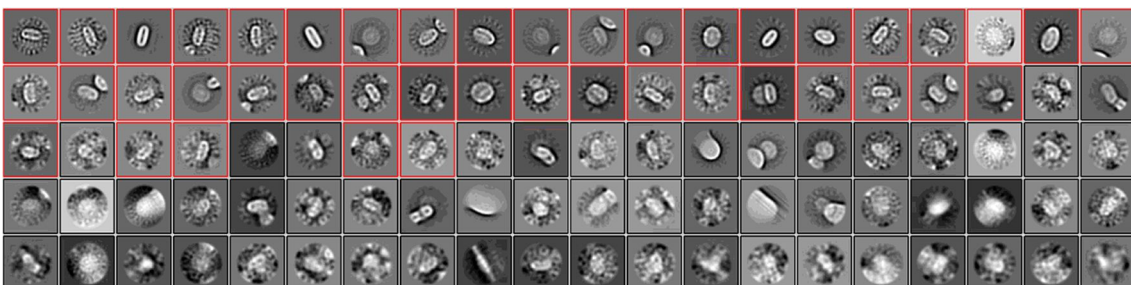


図4 2D classification

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimura Kanako Terakado, Asada Hidetsugu, Inoue Asuka, Kadji Francois Marie Ngako, Im Dohyun, Mori Chihiro, Arakawa Takatoshi, Hirata Kunio, Nomura Yayoi, Nomura Norimichi, Aoki Junken, Iwata So, Shimamura Tatsuro	4. 巻 26
2. 論文標題 Structures of the 5-HT2A receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 121 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-018-0180-z	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 Asada Hidetsugu, Horita Shoichiro, Hirata Kunio, Shiroishi Mitsunori, Shiimura Yuki, Iwanari Hiroko, Hamakubo Takao, Shimamura Tatsuro, Nomura Norimichi, Kusano-Arai Osamu, Uemura Tomoko, Suno Chiyo, Kobayashi Takuya, Iwata So	4. 巻 25
2. 論文標題 Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 570 ~ 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-018-0079-8	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 Jackson Scott M., Ivanova Ekaterina, Calabrese Antonio N., Polyakova Anna, Sharples David J., Shimamura Tatsuro, Cameron Alexander D., Henderson Peter J. F., et al.	4. 巻 1
2. 論文標題 Structure, Substrate Recognition, and Mechanism of the Na ⁺ -Hydantoin Membrane Transport Protein, Mhp1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Biophysics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-642-35943-9_10091-1	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 該当する
1. 著者名 Shimazu Yoshiaki, Tono Kensuke, Tanaka Tomoyuki, Yamanaka Yasuaki, Nakane Takanori, Mori Chihiro, Terakado Kimura Kanako, Fujiwara Takaaki, Sugahara Michihiro, Tanaka Rie, Doak R. Bruce, Shimamura Tatsuro, Iwata So, Nango Eriko, Yabashi Makina	4. 巻 52
2. 論文標題 High-viscosity sample-injection device for serial femtosecond crystallography at atmospheric pressure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Crystallography	6. 最初と最後の頁 1280 ~ 1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600576719012846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takenoya Mihoko, Shimamura Tatsuro, Yamanaka Ryuji, Adachi Yuya, Ito Shinsaku, Sasaki Yasuyuki, Nakamura Akira, Yajima Shunsuke	4. 巻 75
2. 論文標題 Structural basis for the substrate recognition of aminoglycoside 7-phosphotransferase-Ia from <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 599 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X19011105	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 Asada Hidetsugu, Inoue Asuka, Ngako Kadji Francois Marie, Hirata Kunio, Shiimura Yuki, Im Dohyun, Shimamura Tatsuro, Nomura Norimichi, Iwanari Hiroko, Hamakubo Takao, Kusano-Arai Osamu, Hisano Hiromi, Uemura Tomoko, Suno Chiyo, Aoki Junken, Iwata So	4. 巻 28
2. 論文標題 The Crystal Structure of Angiotensin II Type 2 Receptor with Endogenous Peptide Hormone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 418 ~ 425.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.12.003	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shimamura T.
2. 発表標題 Structure of orexin receptor determined using X-ray free electron laser.
3. 学会等名 AsCA 2018/Crystal32 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dohyun Im, Tatsuro Shimamura, So Iwata
2. 発表標題 A first novel GPCR structure determined at SACLA
3. 学会等名 International Symposium on Frontiers in structural biology for Drug Development (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Dohyun Im, Tatsuro Shimamura, et al.
2. 発表標題 Structural insights into antipsychotics binding modes in dopamine D2-class receptors
3. 学会等名 Keystone Symposia: GPCR Structure and Function (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----