

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16217

研究課題名(和文) グレリン受容体の結晶構造解析：なぜオクタン酸グレリンが受容体を刺激できるのか？

研究課題名(英文) Crystal Structure Analysis of Ghrelin Receptor

研究代表者

椎村 祐樹 (Shimura, Yuki)

久留米大学・付置研究所・助教

研究者番号：40551297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オクタン酸修飾されたグレリンがどのようにしてグレリン受容体に認識されているのかを明らかにするために、グレリンと結合状態にあるグレリン受容体の立体構造を決定した。得られた構造情報から、グレリン受容体の結合ポケットは大小2つに分割された構造をしていることがわかった。そのうち大きなポケットにはグレリンのペプチド部が、小さなポケットにはオクタン酸部が配位していた。つまりグレリン受容体は、このリガンド結合ポケットの特徴を巧みに利用してオクタン酸修飾グレリンを認識していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グレリン受容体アゴニスト(アナモレリン)は、食欲の低下とそれに伴う体重や筋肉量の減少を示す、がん悪液質の治療薬として唯一認められている医薬品である。がんカヘキシアはがん患者の死因の1/4を占めているため、より効果のある医薬品開発が期待されている。グレリン受容体アゴニストはそれ以外にも拒食症や食欲不振といった病態に応用できる可能性があり創薬ターゲットとしての期待度が高い。本研究では、グレリンと結合状態にあるグレリン受容体の構造を決定し、それらの結合様式を明らかにした。これらの結果は、グレリン受容体を対象にした構造情報に基づいた医薬品開発を加速させると考える。

研究成果の概要(英文)：The ghrelin receptor (previously called GHSR) plays a central role in regulating appetite, making it an attractive target for treatment of obesity. The endogenous agonist ghrelin, found in the stomach promotes appetite and is responsible for opposing the signaling of leptin in the body. To clarify how octanoic acid-modified ghrelin is recognized by the ghrelin receptor, the structure of the ghrelin receptor in a ghrelin-bound state was determined. The structural information showed that the binding pocket of the ghrelin receptor is divided into two parts, a large and a small pocket. The large pocket contained the peptide portion of ghrelin, while the small pocket contained the octanoic acid portion. In other words, the ghrelin receptor recognizes octanoic acid-modified ghrelin by skillfully utilizing the characteristics of this ligand-binding pocket.

研究分野：内分泌学

キーワード：グレリン受容体 GPCR 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、研究代表者の所属研究室を主宰する児島将康教授らの研究グループによって発見されたペプチドホルモンである (Kojima *et al. Nature* 1999)。その生理作用は、摂食亢進や成長ホルモンの分泌促進、胃運動性の亢進、血圧降下などの多岐にわたることが知られている (Kojima and Kangawa *Physiological Reviews* 2005)。またグレリン遺伝子は、哺乳類に限らず鳥類や魚類、両生類などすべての脊椎動物に発現している (Kaiya *et al. J. Mol. Endocrinol* 2013)。したがってグレリンは、飢餓などの危機的状況下において、生命活動を抑制して生命維持を補助する、生物種に普遍的なホルモンであると考えられている。

グレリンは、これまでに発見されたペプチドホルモンで唯一、活性化に脂肪酸(オクタン酸)の修飾を必要とするホルモンである。ヒトグレリンは、28 アミノ酸で構成されるが、3 番目のセリン残基がオクタン酸で修飾されることによって初めて上記の生理活性を示す(図 1)。一方、オクタン酸修飾のないグレリンは、受容体に結合することができない。したがってグレリン受容体は、グレリンのオクタン酸修飾を認識するための特有の分子機構を備えているものと推測される。グレリン受容体は、G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) と呼ばれる 7 回膜貫通型受容体に分類される。350 種類以上存在する GPCR の中で、脂肪酸修飾の有無によってリガンドを認識している受容体はグレリン受容体しか報告されていない。そのため、活性型グレリン認識機構の解明は、グレリン研究において最も大きな研究課題のひとつである。研究代表者はこれまでに、アンタゴニストが結合したグレリン受容体の立体構造を X 線結晶構造解析法によって決定し、グレリン受容体のリガンド結合ポケットの構造的な特徴、すなわちポケット内で極性アミノ酸がイオン結合することによって、ポケットが大小 2 つに分割されている Bifurcated pocket を見出したが、脂肪酸認識機構の直接的な知見を得るに至っていない (Shiimura *et al. Nature Commun.* 2020)。

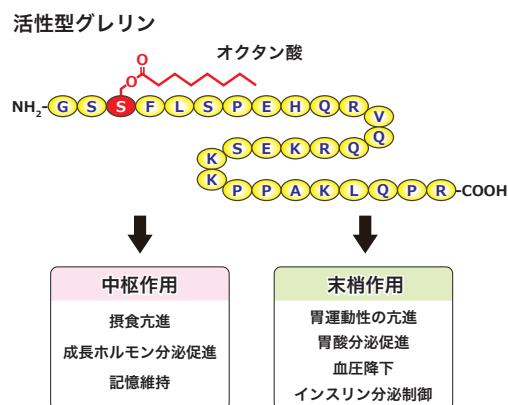


図 1. 活性型グレリンとその生理作用

研究開始当初、グレリン受容体アゴニストであるアナモレリンが、食欲の低下とそれに伴う体重や筋肉量の減少を示す、がん悪液質の治療薬として承認申請中であった (2022 年 1 月に承認)。アナモレリンは、がん悪液質に対する first-in-class の治療薬であり、グレリン受容体は創薬ターゲットとしても注目されている。したがってグレリン受容体のオクタン酸認識機構の解明は、生命現象の理解のみならず創薬応用にも重要な知見をもたらすものと考えられる。

2017 年に単粒子クライオ電子顕微鏡法 (Cryo-EM 法) を用いた GPCR の構造解析が初めて報告された (Liang *et al. Nature* 2017)。これまで GPCR の構造解析で主として用いられてきた X 線結晶構造解析法では、構造解析にタンパク質を結晶化する必要があるが、結晶化の戦略は確立されておらず、塩の種類や濃度、pH などの異なる 1000 を超える条件で網羅的に結晶化スクリーニングを行っていた。また結晶が得られた場合でも、回折実験において、構造解析に資する回折データが得られないことがあり、結晶化は GPCR 構造解析のボトルネックとなっていた。一方で Cryo-EM 法ではこの結晶化を必要としないので、精製したタンパク質をそのまま薄氷膜に包埋してタンパク質の品質を確認することができる。また X 線結晶構造解析法では難しかった GPCR 活性型構造の構造決定に適している。難点として、構造解析できる分子量に制限があり、およそ 100 kDa 以下のタンパク質では構造解析ができないことが挙げられる。GPCR の平均分子量はおよそ 40 kDa であるが、2017 年に報告された手法では、GPCR-G タンパク質三量体にさらに抗体を結合させることで分子量を大きくしてこの点を克服していた。そのため同様の手法で本研究課題を遂行することも可能であったが、研究開始までに Cryo-EM 法で構造決定された GPCR は 3 例しかなく、さらに実験には、高電圧の透過型電子顕微鏡が必要となるなど、研究手法が一般化されておらず実験に取り入れることが難しいこと、設備面での研究環境が整っていないことなどから従来の X 線結晶構造解析法で構造決定を行うことにした。

2. 研究の目的

本課題では、グレリン受容体のオクタン酸認識機構を明らかにするために、オクタン酸修飾グレリンが結合したグレリン受容体の立体構造を決定することを目的とした。

3. 研究の方法

① グレリン受容体活性型固定変異体の作製

酵母発現系と GFP 評価系を組み合わせたスクリーニングを行い、グレリン受容体を活性型に固定する変異体の作製を試みた。これまでに論文化されている GPCR 安定化変異体のおよそ 20 ヶ所の点変異を中心に、グレリン受容体のアミノ酸変異体を作製して、GFP の蛍光強度を指標に発現量を比較した。また細胞膜画分を抽出・可溶化して、蛍光クロマトグラフィーに展開することで単分散性についても評価した。

② アゴニストとの結合を促進する抗グレリン受容体抗体のスクリーニング

可溶性タンパク質である抗体は、結晶化の際のバインダーとして働き、結晶形成を促進することが知られている。実際に、研究代表者の先行研究でもグレリン受容体-抗グレリン受容体抗体複合体としてアンタゴニストが結合したグレリン受容体の立体構造を決定している。先行研究において、10 種類の抗グレリン受容体抗体を作出していた。そこで、アゴニスト共存化で、これらの抗グレリン受容体抗体がグレリン受容体の熱安定性を向上させるかどうか蛍光試薬で標識化したグレリン受容体-抗グレリン受容体抗体複合体の温度依存的な蛍光強度変化をサーマルサイクラーを使って測定した。

③ グレリン受容体の精製・結晶化・回折実験

グレリン受容体変異体を発現させた Sf9 細胞の細胞膜画分を抽出・可溶化した。その後、グレリン受容体に付与した His タグを用いた Ni アフィニティー精製および GFP を用いた GFP ナノボディ精製を行った。His タグおよび GFP は、アフィニティー精製後に 3C プロテアーゼによって切断した。アフィニティー精製したグレリン受容体は、サイズ分離カラムクロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography; SEC) によって単分散性のピークのみを回収した。精製グレリン受容体と 1.5 倍量の抗グレリン抗体を混和後、SEC によってグレリン受容体-抗グレリン受容体抗体複合体のピークを回収し、濃縮して結晶化に用いた。結晶化には、脂質キュービック相法を用いた。グレリン受容体-抗グレリン受容体抗体複合体と脂質を混和し、pH、塩の種類・濃度や沈澱剤の種類異なるバッファー中でグレリン受容体-抗グレリン受容体抗体複合体の結晶化を図った。その後、理化学研究所の大型放射光施設である SPring-8 で回折実験を行った。

④ グレリン受容体-G タンパク質三量体複合体の発現・精製

Sf9 細胞に、グレリン受容体および G_q タンパク質三量体を共発現させた。その際、グレリン受容体には Lg-Bit、G タンパク質の β サブユニットには Hi-Bit を付与しておき、Lg-Bit と Hi-Bit の近接効果によって、グレリン受容体と G_q タンパク質三量体が効率よく複合体形成するようにした。発現細胞の細胞膜画分を抽出・可溶化して、グレリン受容体に付与した His タグを用いた Ni アフィニティー精製および SEC によってグレリン受容体-G タンパク質三量体複合体を精製した。

⑤ Cryo-EM 法を用いたグレリン受容体-G_q タンパク質三量体複合体の構造決定

濃縮したグレリン受容体-G_q タンパク質三量体複合体を薄氷膜に包埋して、凍結グリッドを作製した。その後、凍結グリッドを透過型電子顕微鏡 (Tallos Arctica) 下で観測して、タンパク質単粒子像を取得した。取得した多数のタンパク質粒子像を画像解析ソフト (Rilion3.0) を用いて解析し、グレリン受容体-G_q タンパク質三量体複合体の立体構造を決定した。

4. 研究成果

当初、グレリン受容体活性型固定変異体および先行研究で作出した抗グレリン受容体抗体を用いて、X 線結晶構造解析法でグレリンと結合状態にあるグレリン受容体の立体構造の決定を試みていたが、発現量が高くかつ単分散性の良いグレリン受容体変異体を見出すことができなかった。そのため先行研究で用いたグレリン受容体安定化変異体と抗グレリン受容体抗体を使って結晶化を行った。その結果、2 つの条件で微小結晶が得られたため、結晶化条件を最適化して、SPring-8 で回折実験を行った。その結果、得られた微小結晶はタンパク質由来のものではないことがわかった。

そこで Cryo-EM 法を用いたグレリン受容体-G_q タンパク質三量体複合体の構造解析を行うことにした。実験は、2017 年に初めて Cryo-EM 法を用いて GPCR 構造を決定した Stanford University School of Medicine の Brian Kobilka 博士との共同研究で行った (国際共同研究加速基金 (A))。研究代表者の先行研究を基盤に、グレリン受容体-G_q タンパク質三量体複合体の精製を行い、薄氷膜グリッドを作製した。このグリッドを Cryo-EM Center (Stanford University) の透過型電子顕微鏡 (Tallos Arctica) で観察し、構造解析したところ、活性型グレリンと結合状態にあるグレリン受容体-G_q タンパク質三量

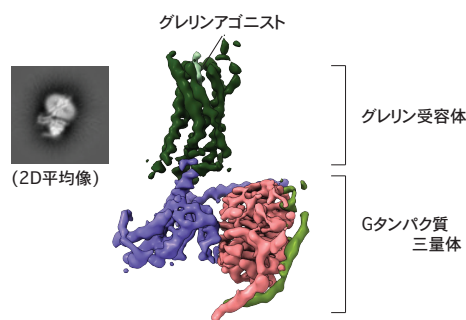


図 2. 構造決定したグレリン受容体-G_qタンパク質三量体複合体

体複合体を 4.5 Å 分解能で構造決定した (図 2)。Talos Arctica は、200 keV のスクリーニング用電子顕微鏡であるため、構造決定用の Titan Krios (有効電圧: 300 keV) でタンパク質単粒子像を取得すれば、さらに高分解能構造を得ることができると考える。

しかしながら 2021 年に、立て続けに Cryo-EM 法を用いたグレリン受容体-G タンパク質三量体構造が報告された (Wang *et al. Nature Commun.* 2021, Liu *et al. Nature Commun* 2021, Qin *et al. Nature Commun* 2022)。これらはいずれも活性型グレリンと結合しており、グレリン受容体は、Bifurcated pocket のうち大きなポケットで活性型グレリンのペプチド部を、小さなポケットでオクタン酸部を収納していることが明らかになった。これらの研究によって、グレリン受容体による活性型グレリン認識機構が解明された。そこで現在、本研究は、複数のグレリン受容体アゴニストとグレリン受容体の結合様式を明らかにすることで、グレリン受容体を標的とした創薬展開のための構造基盤獲得を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiimura Y., Horita S., Hamamoto A., Asada H., Hirata K., Tanaka M., Mori K., Uemura T., Kobayashi T., Iwata S., Kojima M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communication	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-17554-1	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 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 Muta Hiroko, Sugita Yasuo, Furuta Takuya, Shiimura Yuki, Ohshima Koichi, Nakashima Kazutaka, Sato Kensaku, Morioka Motohiro, Abe Hideyuki, Nozawa Takanori, Fujii Yukihiko, Kakita Akiyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of the ghrelin/growth hormone secretagogue receptor axis and its functional role in promoting tumor growth in primary central nervous system lymphomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/neup.12634	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 椎村祐樹, 堀田彰一朗, 浅田秀基, 濱本明恵, 田中みすず, 平田邦生, 小林拓也, 岩田想, 児島将康.
2. 発表標題 グレリン受容体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 第15回GPCR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎村祐樹, 堀田彰一朗, 浅田秀基, 平田邦生, 小林拓也, 児島将康, 岩田想
2. 発表標題 グレリン受容体の結晶構造解析による活性型グレリン認識機構の解明
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 椎村祐樹, 堀田彰一朗, 浅田秀基, 平田邦生, 小林拓也, 児島将康, 岩田想
2. 発表標題 X線結晶構造解析を基盤とした活性型グレリン認識機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第126回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiimura Y., Horita S., Hamamoto A., Asada H., Hirata K., Mori K., Kobayashi T., Iwata S., Kojima M.
2. 発表標題 Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor.
3. 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 佐藤貴弘, 椎村祐樹, 梶谷宇, 岩田想, 児島将康	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 4
3. 書名 生体の科学 増大特集 脳とからだ	

1. 著者名 椎村祐樹, 児島将康	4. 発行年 2021年
2. 出版社 亜鉛栄養治療研究会	5. 総ページ数 7
3. 書名 亜鉛栄養治療	

1. 著者名 Shiimura Y., Iwata S., Kojima M.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 SPRING-8/SACLA Research Frontiers Secretariat, JASRI	5. 総ページ数 2
3. 書名 Research Frontiers 2020	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【研究成果】食欲を刺激するホルモン（グレリン）の謎を世界で初めて解明 https://www.kurume-u.ac.jp/site/backno/20200819.html</p>
--

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
研究協力者	浅田 秀基 (Asada Hidetsugu)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	林 到炫 (Im Dohyun)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Stanford University School of Medicine		