

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08534

研究課題名（和文）エンドセリン異常症に基づくGPCR活性化機構の解明とGqシグナルの病態への関与

研究課題名（英文）Mechanism of GPCR activation based on endothelin abnormalities

研究代表者

栗原 由紀子（Kurihara, Yukiko）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・講師

研究者番号：80345040

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）：ヒトの脱毛を伴う顎顔面骨形成不全症の一部に、GPCRであるエンドセリンA受容体 遺伝子異常が発見され、我々はその一塩基変異モデルマウス等の作成と薬理学的実験を施行し、機能獲得変異であることを見出した。その1アミノ酸変異によってどのようにして機能獲得するかを動力学シミュレーションを用いてその構造変化から明らかにした。303番目のグルタミン酸からリジンへの変異ではヘリックス間の水素結合が消失することでアロステリックにリガンド結合部位の状態を変化させ、129番目のチロシンからフェニルアラニンへの変異ではNa-waterポケットを縮小させることにより、親和性を上げ機能獲得したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎顔面骨形成不全症は希少疾患であるが、その原因遺伝子のエンドセリンA受容体はGPCRであるので、その変異による疾患発症メカニズムを明らかにすることは、生体で重要な役割を果たしているGPCR一般の活性化メカニズムを解明に大きく貢献することになる。これにより、薬剤の3-4割を占めるといわれているGPCRの創薬に貢献する。

研究成果の概要（英文）：Mutations of G-protein-coupled receptors (GPCRs) cause various human diseases. We present a patient with Mandibulofacial Dysostosis with Alopecia (MFDA) and mouse models carrying causative mutations in the gene encoding endothelin A receptor (ETAR), a class A GPCR. Additional mutagenesis and pharmacological experiments revealed the causative mutations as gain-of-function, dependent on the ligand endothelin3. To elucidate how amino acid substitutions far from the ligand binding site increase affinity, we use molecular dynamics simulation. The ETAR-E303K mutation, situated at the intracellular end of transmembrane helix 6, leads to G-protein-mediated enhancement of agonist affinity. The ETAR-Y129F mutation reduces the Na-water network, thereby affecting the extracellular portion of helices in favor of ET3 binding.

研究分野：分子生物学、発生生物学

キーワード：GPCR エンドセリン 希少疾患

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、循環作動物質、神経作動物質、ホルモン、サイトカインなどの細胞外刺激の作用を仲介する細胞膜受容体で、医薬品の最も大きなターゲットである。創薬においても、リガンド結合の特異性(ドラッグデザイン)のみならず、GPCRの構造変化と活性化の関係は主要なポイントである。一方、生体内の循環作動物質の受容体として例えば、アドレナリン受容体、アンギオテンシン受容体、エンドセリン受容体は構造上の相同性が高く、同じロドプシン型 class A に属する GPCR である。これらは心血管の生理活性調節に大変重要であり、心不全、高血圧、肺高血圧等のターゲットとなっていることは周知の事実である。その細胞内シグナル伝達に関しては今まで多くの知見が積み重ねられ解明が進んできているが、受容体蛋白質そのものの構造、特に細胞膜脂質二重層内での受容体蛋白の構造と動きに関しては、近年の解析技術の発展により解明され始めてきているがまだ未知の部分も多い。特に膜内での GPCR の動きと機能の関係、すなわちリガンド結合による G 蛋白結合部位の構造変化や、G 蛋白等の結合によるリガンド結合部位の構造変化とその動的メカニズムを明らかにすることが、病態発症メカニズムの理解にも創薬の基盤としても重要な意味を持っている。

近年ヒトにおいて、Mandibulofacial Dysostosis with alopecia (MFDA;脱毛を伴う顎顔面骨形成不全症)の一部に、class A GPCR であるエンドセリン A 受容体(EDNRA/ET_AR)遺伝子異常が発見された。我々はその一塩基変異モデルマウス等を作成したところ、顎顔面の骨、眼瞼、耳介の表現型は非常によくヒトの形態異常を模倣していたことから、その変異が原因であること明確になった。

2. 研究の目的

ヒトで形態異常を呈することが明らかな遺伝子変異をもとに、ET_AR の活性化機構の動的メカニズムを明らかにし、class A GPCR に共通する活性化機構の一端を解明する。class A GPCR は生理活性調節に重要な役割を果たしているのでそのメカニズムの解明は創薬において基本的な考え方を提示するのに貢献する。さらに、この GPCR の活性異常が成人病の発症に影響を及ぼすかを我々が作成したモデルマウスを解析することによって推測することを目的とする。

3. 研究の方法

変異受容体の薬理的評価

各種 ET_AR 変異発現ベクターを作成し、HeLa 細胞に発現させ ET₁, ET₃ に対する反応を Gq の下流因子である細胞内カルシウムやイノシトール 3 リン酸の代謝産物のイノシトール 1 リン酸 (IP₁) により評価した。また、基礎活性測定も行った。

MD シミュレーションによる動態評価

ETBR の結晶解析データをテンプレートに ET₃ 結合 ET_AR、Na 結合 ET_AR のホモロジーモデリングを行った。ET_AR は正常の他に Y129F, E303K 変異とそれらに加え R326Q, R326E 変異も導入して MD シミュレーションを行い解析した。

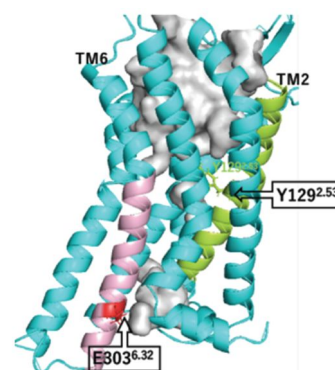
変異老化マウスの表現型

ET_AR-Y129F, ET_AR-E303K 変異マウスを同腹(兄弟)とともに同ケージで飼育し、表現型が明らかになるまでまたは死亡するまで飼育し生存率を集計し、腫瘍の評価を行った。

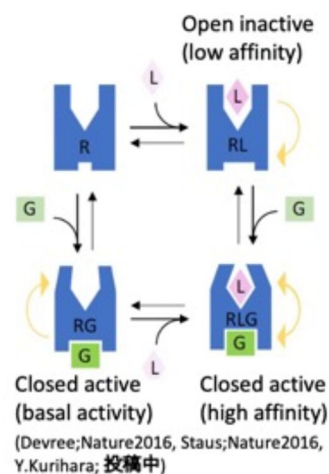
4. 研究成果

E303K 変異の機能獲得機序

ET_AR-E303K 変異マウスの表現型は ET₃ ノックアウトヘテロ接合体との掛け合わせによりレスキューされたことより、もともと親和性が低いリガンドである ET₃ の異所性シグナル獲得による形態異常であることが証明された。薬理的には ET₃ に対する親和性上昇と G 蛋白活性化能の上昇により機能獲得となった。また、基礎活性 (basal activity) も上昇していた。



グルタミン酸からリジンへの変異を MD シミュレーションにより比較検討した。E303 はヘリックス 6 の細胞内側に位置するが、他のヘリックスとの水素結合が切れて flexible になりその影響で細胞外側、特にリガンド結合ドメインの形状を変えた。この変化はリガンド親和性において受容体からの乖離を阻害すること確率を高めることにより親和性をまずと考えられた。(右図)



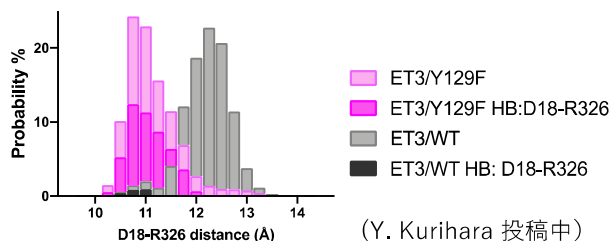
Y129F 変異の機能獲得機序

ET_AR-Y129F 変異マウスの表現型は ET3 ノックアウトヘテロ接合体との掛け合わせによりレスキューされたことより、もともと親和性が低いリガンドである ET3 の異所性シグナル獲得による形態異常であることが証明された。薬理学的には ET3 に対する親和性上昇による機能獲得であった。

チロシンからフェニルアラニンへの変異を MD シミュレーションにより比較検討した。Class A GPCR ではリガンド結合ポケットの細胞内側にナトリウム-水ポケット (Na-water pocket) が知られている。不活性化時にはナトリウム-水ポケットが存在し、その崩壊により活性化が進むと推測されている。

Y129 はリガンド結合ポケットよりは細胞内側でナトリウム-水ポケットの上部に位置する。ET_AR-WT (正常型) と ET_AR-Y129 の MD シミュレーションを比較すると、ET_AR-Y129 では水分子数やナトリウムとのイオン結合量が減少に転じナトリウム-水ポケットが崩壊しやすくなったと考えられた。それに伴いリガンドと受容体との水素結合 (ET3_D18 と ET_AR_R326) が出現しリガンド乖離しにくくなり親和性が増した(下図)。

確かに R326 (アルギニン) をグルタミンまたはグルタミン酸に変異させると薬理的にも細胞内カルシウムの反応が低下し、Y129F 変異で上昇した ET3 リガンド反応性がキャンセルされ ET_AR-WT レベルまで低下した。このことから ET_AR-Y129F の ET3 に対する機能獲得は、ナトリウム-水ポケットを介し、ET3 と受容体の水素結合が重要な働きをしていることが明らかになった。



(Y. Kurihara 投稿中)

ET3 と ET1 の ET_AR への結合機序の違い

元来 ET_AR は、ET1 に対しては活性化を示しているが、ET3 に対する活性化は殆どなく、Y129F 変異も E303E 変異では ET1 に対する親和性、反応性は WT と同様に有しており、ET3 に対する反応性が回復している。ET_AR_Y129F、ET_AR_E303K で R326 をグルタミンへの変異させると ET3 に対する反応は WT と同等まで低下したが、ET1 に対する反応は変化しなかった。このことは、ET1 と ET3 のアミノ酸配列の違いは N 端側のわずかであり D18 近傍は全く同じにもかかわらず、受容体との結合様式が違うことを示している。ET1 は ET_AR の細胞外ドメインが蓋の役割をし (2016Nature537,363) ET3 は ET_AR_R326 との水素結合により主に結合することを明らかにした。よって、エンドセリン受容体に対する創薬においてリガンド特異性を考えるとき、これらの知見が大きく貢献する。

老化マウスの表現型

同胞の正常マウスでは 8 割以上が 2 年以上生存するが、変異マウスでは 5 ヶ月令から徐々に死亡するマウスが出現し最高 22 ヶ月令で平均 17 ヶ月であった (同腹同ケージを 8 ケージで既に死亡したもの、正常 14 匹 変異 12 匹)。そのうち明らかな腫瘍形成は変異 5 匹であり、リンパ腫、類基底細胞癌を含む皮下扁平上皮癌、脂肪肉腫であった。また、出生後から 2 割程度の体重減少がありそれは 1 年経っても追いつかない。ヒト小児症例の成人後は易発がん性に注意が必要と考えられる。また、老化による脂肪量の増大が見られなかったことは正常成人のメタボに対しての治療の新たな切り口になる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Maruyama K, Naemura K, Arima Y, Uchijima Y, Nagao H, Yoshihara K, Singh MK, Uemura A, Matsuzaki F, Yoshida Y, Kurihara Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. | 4. 巻 24(4) |
| 2. 論文標題 Semaphorin3E-PlexinD1 signaling in coronary artery and lymphatic vessel development with clinical implications in myocardial recovery | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 1-42 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102305. | 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 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 栗原由紀子 |
| 2. 発表標題 Human rare disease caused by genetic mutation provides insights into structural rearrangement in GPCR |
| 3. 学会等名 分子生物学 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 YUKIKO KURIHARA |
| 2. 発表標題 Mouse models of human disease and molecular dynamics simulation provide an insight into structure-function relationship in Endothelin type-A receptor |
| 3. 学会等名 Gordon Research Conference |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 | | | |
|---------|-------------------------|------------------|--|--|
| フランス | INSERM | | | |
| フランス | Necker-Enfants Hospital | Institut Imagine | | |