

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06044

研究課題名（和文）GCase受容体の構造生物学—リガンドの認識機構と結合シグナルの分子内伝達機構

研究課題名（英文）Structural biology of GC-A receptor - Mechanism underlying peptide recognition and intramolecular signal transduction

研究代表者

児玉 昌美（Kodama, Masami）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30512248

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）：グアニル酸シクラーゼ（GCase）受容体のリガンド結合（LB）ドメインと心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）あるいはDNP（ヘビ毒由来のNP様ペプチド）との複合体のX線結晶解析を行い、アミノ酸配列の上では規則性が見当たらない1分子のANPが、「点対称」に向き合った2分子のGC-A受容体に結合する際、「擬似的に点対称」の形をとることを明らかにした。またDNPがANPより強固に結合する構造学的基盤を明らかにした。糖鎖修飾のため結晶の作成が困難なGC-BのLBドメインとCNPの複合体についても、Cryo-EM単粒子解析によって立体構造の決定に成功し、現在モデリングと構造精密化を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GCase・ANP系は血圧・体液バランスの維持に不可欠で、急性心不全治療薬として広く臨床で利用されているにも関わらず、構造学的基盤の解析が遅れてきた。これは点対称の二量体GCaseの中心にANPが疑似対称性を獲得して結合するという構造が、構造決定を阻んできたためだが、この難問を我々は独自の技術を用いて克服した。GCase受容体の活性化はLBドメインの旋回に因るが、このような様式で活性化する受容体は他に報告例がなく、学術的に意義深い。ANPには血中半減期が短いという致命的な問題があり、DNPをはじめ、これに代わる医薬品の開発は急務である。本研究で得た知見は、医学的重要性も極めて高い。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the mechanism underlying guanylyl cyclase-A (GC-A)-dependent peptide recognition through the determination of the crystal structures of the GC-A extracellular ligand-binding (LB) domain complexed with full-length atrial natriuretic peptide (ANP), truncated mutants of ANP, and dendroaspis natriuretic peptide (DNP). The bound peptides possessed pseudo-two-fold symmetry, despite the lack of two-fold symmetry in the primary sequences, which enabled the tight coupling of the peptide to the receptor, and evidently contributes to guanylyl cyclase activity. The binding of DNP to the GC-A was essentially identical to that of ANP; however, the affinity of DNP for GC-A was higher than that of ANP owing to the additional interactions between distinctive sequences in the DNP and GC-A. Consequently, our findings provide valuable insights that can be applied to the development of novel agonists for the treatment of various human diseases.

研究分野：細胞分子生物学、生化学

キーワード：GC受容体 ナトリウム利尿ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グアニル酸シクラーゼ (GCase) 受容体は、分子量約 130kDa の膜 1 回貫通型受容体である。細胞外にリガンド結合 (LB) ドメインを、細胞内に GCase ドメインを持ち、2 量体として機能する。最もよく研究されている GC-A 受容体は、体液バランスや血圧維持に必須な環状ペプチドホルモン心房型 NP (ANP) の受容体である。GC-A・ANP 系は、急性心不全治療薬あるいは心不全等の診断法として既に広く臨床で利用されているにも関わらず、構造学的基盤の理解は遅れている。

申請者らはかねてより、GCase 受容体がりガンドを認識し、結合シグナルを膜内の GCase ドメインへ伝達する機構の解明に向けて、GC-A 受容体の構造研究に従事してきた。GC-A 受容体の LB ドメイン・ANP 複合体の X 線結晶解析を行い、点対称に向かい合う LB ドメインの二量体が 1 分子の ANP の結合に伴って旋回することが、ペプチド結合シグナルを膜内に伝達し、GCase を活性化する機構の本質であることを明らかにした。しかし、この時に決定した構造の解像度は不十分で、ANP の結合様式を十分に明らかにすることは叶わなかった。また、GCase 受容体、NP はともに、高度に類似した複数の類縁分子を持つが、それぞれの受容体は的確に自身の基質を識別し結合する。この受容体のリガンド識別機構についても不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究では、GCase 受容体の LB ドメイン・NP 複合体の構造解析を通じて「受容体がりガンドを認識する機構」と「ペプチド結合シグナルを膜内へ伝達し、GCase を活性化する機構」を明らかにする。構造解析と並行して、GCase 受容体のキネティクス解析を行い、構造解析の結果の理解を助ける。

3. 研究の方法

GC-A 受容体の LB ドメイン・NP 複合体の結晶化・構造決定

HEK293T 細胞を用いて、アミノ酸残基 1-435 からなる GC-A の細胞外 LB ドメインの安定発現株を樹立した。発現した LB ドメインは培地中に分泌されるため、培養後の培地を回収し、ANP アフィニティークロマトグラフィーにより LB ドメインを精製した。精製した LB ドメインをヒト・ラット ANP あるいは DNP (ヘビ毒由来の NP 様ペプチド) と共にハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化し、高輝度放射光施設 SPring-8 において、波長 0.9Å の高分解能の回折データを取得した。結合型ペプチドの詳細な構造解析のためには、さらに複数の ANP の欠失変異体との複合体について同様に結晶化し、回折データを取得した。

GC-B の LB ドメイン・CNP の複合体の CryoEM 単粒子解析

先述の GC-A 受容体の LB ドメインと同様の方法で、GC-B の LB ドメインの安定発現株を樹立し、LB ドメインを精製した。CNP との複合体の CryoEM 単粒子解析においては、GC-A・ANP 複合体も同様に解析し、コントロールに用いた。

GCase 受容体のキネティクス解析

まず、HEK293T を用いて GC-A 受容体の誘導発現細胞株を樹立した。さらに cGMP バイオマーカーの発現カセットを遺伝子導入し、構成的発現株を樹立した。

4. 研究成果

GC-A の LB ドメイン・NP 複合体の構造決定と精密なモデル構築

GC-A の LB ドメイン・ANP あるいは DNP 複合体の X 線結晶構造解析を行った。結晶化の条件等を見直した結果、新たに決定された構造の解像度は、以前に比べて大幅に向上した。電子密度マップも劇的に改善し、以前のマップでは識別できなかった側鎖の存在が認められた。

結合したペプチドは一次配列では対称性を持たないが (図)、計算された電子密度マップは明らかな 2 回対称性を示した。これは、2 回対称性を持つ結合部位に対して、NP が順向きと逆向きの 2 つのコンフォメーション (配向) で結合でき、それぞれの占有率が 50%であることを示唆している。このため、結合したペプチドのモデリングは困難を極めた。我々は、野生型ヒト・ラット ANP に加えて、複数の欠損変異型 ANP についても同様に LB 複合体の結晶構造解析を行い、互いの電子密度マップの差から特定のアミノ酸側鎖の位置を定義した。定義された側鎖の位置に基づいて、GC-A の LB ドメインに結合した全長ヒト・ラット ANP、DNP の構造を曖昧さなくモデル化することに成功した。ANP と DNP は、主鎖の全体的な形状が類似しており、骨格の特徴を共有していることが示された。

結合型 NP の環状構造

ANP および DNP は Cys7 と Cys23 の間にジスルフィド結合を持つ環状ペプチドである (図)。

2 回対称性を持つ GC-A の二量体の間に結合した NP の環状構造 (Cys7 から Cys23 までのアミノ酸残基) は、擬似 2 回対称性を示した (図)。擬似 2 回対称性を担う 1 つの領域は環状構造の上部に位置していた (図)。hANP の場合、正電荷を帯びた残基 (Arg11 と Arg14) と非極性アミノ酸残基 (Met12 と Ile15) が、環状構造の頂点にある Asp13 を中心に、擬似的な 2 回対称性を持って配置されていた (図)。これらの正電荷残基と擬似 2 回対称性を持つ非極性残基は、GC-A の Asp62、Glu119、Asp160 のカルボニル酸素原子から成る親水性ポケットと、Tyr88、Ala111、Ile114、Tyr120、Phe166 から成る疎水性ポケットにそれぞれよくフィットし、GC-A へのペプチドの結合を安定化していた。

環状構造において擬似 2 回対称性を担うもう一つの領域は、Cys7 と Cys23 の間の SS 結合を中心とする底部に位置していた。hANP の場合、非極性アミノ酸残基 (Phe8 と Leu21) が擬似 2 回対称性を持って配置されていた。両方の非極性残基は GC-A の Tyr154、Phe165、Tyr172、His185 で構成される疎水性ポケットに埋まっており、GC-A へのペプチドの結合を安定化していた。これらのシナリオは DNP でも本質的に同様であった。

GC-A へのペプチド結合の安定化には、先述の擬似 2 回対称性を示す 2 つの領域に加えて、さらに 2 つの領域が必須であることを見出した。1 つは、ANP の環状構造の上部にある擬似 2 回対称性の中心にある Asp13 で、GC-A のモノマー A と B の境界に位置し、Arg95(A) と緊密な塩橋を形成していた。Arg95(A) は、Glu119(A)、Tyr120(B)、Asp62(B) を介してモノマー A と B の間を仲介する重要な役割を果たしている。もう 1 つは、環状構造の SS 結合の直後の 3 つのアミノ酸残基 (アミノ酸残基 24-26) と GC-A のモノマー B との間の擬似シートである。この擬似シートについても、本質的な特徴は ANP と DNP で共通していた。

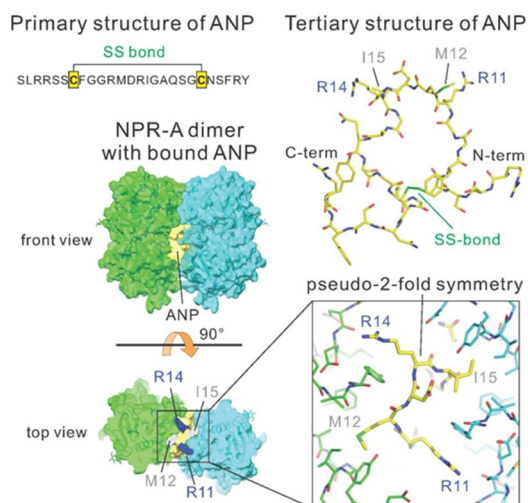


図 ANP の一次配列および三次元構造、GC-A LB ドメインの二量体に結合した ANP を示す

GC-A によるリガンド認識の構造

ANP と DNP の N 末端配列は大いに異なる。そのため ATP と DNP では、環状部分の構造は本質的に共通であったのに対して、N 末端領域のペプチドの主鎖の方向は全く異なっていた。DNP の N 末端は 3 つの水素結合を介して GC-A と緊密な相互作用をしていたが、ANP の N 末端に GC-A との相互作用は検出されなかった。ANP と DNP の C 末端配列も大いに異なり、それぞれ異なる形で GC-A との相互作用に重要な役割を果たしているようである。ANP の C 末端では Tyr28 が GC-A (A) と水素結合を形成することで複合体形成に寄与していた。一方、DNP では、C 末端の Arg27 に GC-A モノマー B のループが接近し、付加的に水素結合が形成されていた。これらを総合すると、DNP は ANP よりも GC-A と相互作用を形成していることが明らかになった。GC-A に対する親和性は、ANP より DNP の方が強いことが報告されており、今回の結果はこれを支持するものであった。

GC-B の LB ドメイン・CNP の複合体の CryoEM 単粒子解析

GC 受容体・NP 系には、受容体、ペプチドともに高度に類似した類縁分子が複数ある。しかし GC-A 受容体には、ANP および BNP、DNP が、GC-B 受容体には CNP のみが結合するというように、それぞれの受容体は的確に自身の基質を識別している。GC 受容体によるペプチドの識別機構を明らかにするため、さらに GC-B の LB ドメイン・CNP 複合体の構造解析を試みた。GC-B の LB ドメインは GC-A の LB ドメインとは異なり糖鎖修飾を受けているためか、結晶化が難しかったため、Cryo-EM 単粒子解析により構造を決定した。現在モデリングと構造精密化を行っている最中である。

GCcase 受容体のキネティック解析

我々はこれまでの構造解析の結果から、ANP の結合に伴って LB ドメインが旋回することが、ペプチド結合シグナルを膜内に伝達し、GCcase を活性化する機構の本質であることを見出した。欠失型 NP では、旋回角度の異常と受容体との結合親和性の低下が同時に起きることから、旋回角度の異常が GCcase の活性化に与える影響を正しく評価することが難しい。結合親和性については、Blue-native PAGE を用いた「リガンド結合による受容体の二量体形成を直接観察可能な系」を既に独自に開発していることから、本研究では GC-A 受容体の誘導発現細胞株に cGMP のバイオマーカーを構成的に発現させることによって、低コストでリアルタイムにかつ簡便に GCcase 活性を比較できる系を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 小川 治夫、児玉 昌美	4. 巻 89
2. 論文標題 ナトリウム利尿ペプチド受容体の基質認識とその活性化機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 循環器内科	6. 最初と最後の頁 454-462
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 Ogawa H, Kodama M.	4. 巻 291
2. 論文標題 M. Structural insight into hormone recognition by the natriuretic peptide receptor-A.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 2273-2286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.17104	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 治夫、美濃 拓実、近藤 瞳、児玉 昌美
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるANP受容体細胞外ドメインの構造解析
3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 瞳、美濃 拓実、児玉 昌美、加藤 博章、小川 治夫
2. 発表標題 Cryo-EMを用いた単粒子解析法によるhuman GC-B受容体細胞外ドメインの構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 美濃 拓実、近藤 瞳、児玉 昌美、加藤 博章、小川 治夫
2. 発表標題 Gunanylate Cyclase受容体の基質識別機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤瞳、児玉昌美、加藤博章、小川治夫
2. 発表標題 クライオ電顕による一回膜貫通型受容体NPR-Bの機能構造解析
3. 学会等名 第44回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤瞳、児玉昌美、加藤博章、小川治夫
2. 発表標題 Cryo-EMによる立体構造から明らかになったGCCase受容体の基質識別機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	小川 治夫 (Ogawa Haruo) (40292726)	京都大学・薬学研究科・准教授 (14301)	

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