

# 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～ 2012

課題番号：2 3 6 5 7 0 7 4

研究課題名（和文） 活性型 GPCR の構造解析への挑戦

研究課題名（英文）Challenges for the structure determination of GPCR active conformation.

研究代表者

島村 達郎 (SHIMAMURA TATSURO)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号：9 0 3 9 1 9 7 9

研究成果の概要（和文）：G タンパク質共役型受容体(GPCR)によるシグナル伝達機構を分子レベルで解明するには、その不活性型構造と活性型構造の情報が必須である。本研究では、花粉症などのアレルギーに関係するヒスタミン H1 受容体や、パーキンソン病などに関与するアデノシン A2a 受容体などを用いて、GPCR が不活性化状態から活性化状態へ変化する時の動きを解明するために必要な構造情報を取得するための基盤作りを目的とした。まず、酵母を利用して大量発現させたヒスタミン H1 受容体の不活性型構造を、アレルギーの薬である抗ヒスタミン薬ドキシペミンとの複合体構造として決定し、論文に発表した。これにより、抗ヒスタミン薬の副作用の原因である低い受容体選択性の原因が解明された。また、アデノシン A2a 受容体については、構造認識抗体を作製した。そして、アデノシン A2a 受容体と抗体 Fab 断片の複合体により、不活性型構造を発表した。更に活性型構造を安定化させるような抗体の取得にも成功した。

研究成果の概要（英文）：In order to understand the GPCR-mediated signal transduction mechanisms, it is essential to determine the GPCR structures in the active and inactive conformations. We published the structure of Histamine H1 receptor in complex with an inverse agonist doxepin. The structure revealed the reason why doxepin shows high affinities to aminergic receptors. We also published the structure of Adenosine A2a receptor in the inactive conformation. For crystallization, the receptor was stabilized in the inactive conformation by the binding of Fab fragment. The antibody that stabilizes the receptor in the active conformation was successfully obtained. This antibody will be useful for the determination of the Adenosine A2a receptor structure in the active conformation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、受容体、GPCR、膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) によるシグナル伝達機構を分子レベルで解明するには、その不活性型構造と活性型構造の情報が必須

である。しかしながら、それまでに構造決定された GPCR は僅かで、更にそれら全てが不活性型構造のもので、活性薬（アゴニスト）が結合した活性型構造は決定されていなかった。

その主な原因は、GPCRが不安定な蛋白質であり、また、不活性型構造より活性型構造がより不安定であるため、結晶化・構造解析が困難であるからである。しかしながら近年の技術進歩により、GPCRを安定化しうる様々な手法が開発されつつあるので、それらを駆使してGPCRの構造解析を行おうと考えた。

## 2. 研究の目的

GPCR が不活性化状態から活性化状態へ変化する時の動きを解明し、GPCRによるシグナル伝達機構の詳細を理解するため、GPCRの不活性型構造に加え、活性型構造を決定するための基盤作りが本研究の目的である。ターゲットとしては、花粉症などのアレルギーに関係するヒスタミン H1 受容体や、パーキンソン病などに関与するアデノシン A2a 受容体を用いた。

## 3. 研究の方法

GPCR は、疎水性で分子が小さく、膜に覆われて存在している点、柔軟性が高いため不安定である点などから結晶化が難しく、構造解析は遅れていた。これらを克服するため、GPCR 分子内で特に柔軟性が高い細胞内第3ループを T4 リゾチームに置換したり、結晶化時にキュービックフェーズ法を用いたりすることで GPCR の不活性型構造が決定されるようになった。本研究計画では、これまでの GPCR の構造解析研究に用いられた各種の手法、知見を組み合わせ、研究を行う。まず、アゴニストを結合させた状態で安定なコンストラクトを作製する。このためには、T4 リゾチームの挿入位置の最適化や、熱安定性が上昇する変異体の作製などを行う。また、GPCR の三次元構造を認識するような抗体を作製し、抗体を結合させることで構造を安定化させる。このような手法により作製した GPCR や GPCR-抗体複合体を用いてキュービックフェーズ法により結晶化を行う。測定は大型放射光施設 SPring-8 のマイクロフォーカスビームラインで行う。

## 4. 研究成果

酵母を利用して大量発現させたヒスタミン H1 受容体の不活性型構造を、アレルギーの薬である抗ヒスタミン薬ドキセピンの複合体構造として決定し、論文に発表した。ドキセピンは、受容体選択性が低く副作用の多い抗ヒスタミン薬である。構造を決定してみるとドキセピンは、ヒスタミン H1 受容体だけでなく他のアミン受容体でも保存されているアミノ酸に囲まれて結合しており、ドキセピンの受容体選択性の低さは、ドキセピンがアミン受容体間で保存的な構造をしている部位に結合することにより生じていることが解明された。更に、ヒスタミン H1 受

容体に特有なアミノ酸に囲まれた薬剤結合部位の存在も明らかになり、この構造は、より選択性が高く、強い効果を持つ抗ヒスタミン薬を開発するために役立つものとなった。また、この構造情報を利用した in silico スクリーニングにより、抗ヒスタミン薬候補化合物のスクリーニングを効率的に行うことに成功し、構造情報の創薬への有用性を示した。

アデノシン A2a 受容体については、構造認識抗体を作製した。そして、不活性化状態を安定化させる抗体を結合させ、アデノシン A2a 受容体の不活性型構造を発表した。活性型構造を安定化させるような抗体については、複合体形成によりアンタゴニストへの親和性は変化させないが、アゴニストへの親和性を上昇させるような抗体の取得に成功した (図1)。この抗体はアデノシン A2a 受容体の活性型構造を安定化するものと考えられ、アデノシン A2a 受容体の活性型構造の結晶化・構造解析に目処がたった。

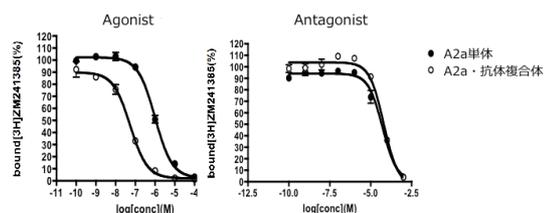


図1 構造認識抗体の結合によるアゴニスト、アンタゴニストの親和性の変化

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1: Shimamura T, Iwata S. [Structural biology and molecular targets]. Nihon Rinsho. 2012 Nov;70 Suppl 8:316-20. Japanese. 査読無し

2: Shimamura T. [Structure of histamine H1 receptor]. Seikagaku. 2012 Sep;84(9):772-6. Review. Japanese. 査読無し

3: Suno R, Shimoyama M, Abe A, Shimamura T, Shimodate N, Watanabe YH, Akiyama Y, Yoshida M. Conformational transition of the lid helix covering the protease active site is essential for the ATP-dependent protease activity of FtsH. FEBS Lett. 2012 Sep 21;586(19):3117-21.

査読有り

4: Shiroishi M, Tsujimoto H, Makyio H, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shimamura T, Murata T, Nomura N, Haga T, Iwata S, Kobayashi T. Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 2012 Jun 13;11:78. doi: 10.1186/1475-2859-11-78. 査読有り

5: Hino T, Arakawa T, Iwanari H, Yurugi-Kobayashi T, Ikeda-Suno C, Nakada-Nakura Y, Kusano-Arai O, Weyand S, Shimamura T, Nomura N, Cameron AD, Kobayashi T, Hamakubo T, Iwata S, Murata T. G-protein-coupled receptor inactivation by allosteric inverse-agonist antibody. *Nature*. 2012 Jan 29;482(7384):237-40. doi:10.1038/nature10750. 査読有り

6: de Graaf C, Kooistra AJ, Vischer HF, Katritch V, Kuijter M, Shiroishi M, Iwata S, Shimamura T, Stevens RC, de Esch IJ, Leurs R. Crystal structure-based virtual screening for fragment-like ligands of the human histamine H<sub>1</sub> receptor. *J Med Chem*. 2011 Dec 8;54(23):8195-206. doi: 10.1021/jm2011589. 査読有り

7: Shiroishi M, Kobayashi T, Ogasawara S, Tsujimoto H, Ikeda-Suno C, Iwata S, Shimamura T. Production of the stable human histamine H<sub>1</sub> receptor in *Pichia pastoris* for structural determination. *Methods*. 2011 Dec;55(4):281-6. doi:10.1016/j.ymeth.2011.08.015. 査読有り

8: Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC, Iwata S. Structure of the human histamine H<sub>1</sub> receptor complex with doxepin. *Nature*. 2011 Jun 22;475(7354):65-70. doi: 10.1038/nature10236. 査読有り

9: Tokuda N, Igarashi K, Shimamura T, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Ito K, Sugawara T, Asada H, Murata T, Nomura N, Iwata S, Kobayashi T. Cloning, expression and purification of the anion exchanger 1 homologue from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Protein Expr Purif*. 2011 Sep;79(1):81-7.

doi: 10.1016/j.pep.2011.04.006.  
査読有り

[学会発表] (計 11 件)

- 1 「ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の構造により解明された抗ヒスタミン薬選択性機構」  
島村 達郎  
第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2012. 11. 15) 京都
- 2 「キュービックフェーズ法による膜タンパク質の結晶化」  
島村 達郎  
蛋白研セミナー (2012. 9. 21) 大阪
- 3 「膜蛋白質の結晶化」  
島村 達郎  
第 12 回 日本蛋白質科学会(2012. 6. 20) 名古屋
- 4 「ヒト由来ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の立体構造」(基調講演)  
島村 達郎  
第 9 回 GPCR 研究会(2012. 5. 11) 東京
- 5 "Structural studies of human G-protein coupled receptors."  
Shimamura T.  
日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012. 3. 25) 京都
- 6 「微結晶を用いた創薬ターゲット膜タンパク質の構造解析と SACLA の可能性」  
島村 達郎  
第 25 回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム (2012. 1. 9) 鳥栖
- 7 「ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の立体構造から分かった抗ヒスタミン薬選択性の分子機構」  
島村 達郎  
第 18 回創薬情報研究会 (2011. 12. 22) 大阪
- 8 "Structural basis of secondary active transport in the sodium-hydantoin transporter Mhp1."  
Shimamura T.  
The JSPS/iCeMS International Symposium. (2011.11.17) Kyoto, Japan.
- 9 「ヒト由来ヒスタミン受容体 H<sub>1</sub> の構造解析戦略」  
島村 達郎  
第 84 回日本生化学会大会 (2011. 9. 24) 京都

- 10 「ヒダントイン輸送体 Mhp 1 の基質輸送中の動き」  
島村 達郎, 岩田想  
生理研研究会「作動中の膜機能分子の姿を捉える — 静止画から動画へ —」  
(2011.9.8) 岡崎
- 11 "Structure of the human histamine H1 receptor with doxepin."  
**Shimamura T.**  
International Union of Crystallography, XXII Congress and General Assembly. (2011.8.29)  
Madrid, Spain.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: アゴニストの親和性を亢進する抗ヒトアデノシン A2a 受容体モノクローナル抗体

発明者: 小笠原諭 日野智也 島村達郎  
荒川孝俊 万木貴美 寿野千代 村田武士  
小林拓也 岩田想

種類: 特許

出願人: (独) 科学技術振興機構

番号: 特願 2012-49812

出願年月日: 平 24 年 3 月 6 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news\\_data/h/h1/news6/2010/100423\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2010/100423_1.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 連携研究者

小笠原 諭 (OGASAWARA SATOSHI)  
京都大学・医学研究科・研究員  
研究者番号: 30546685

浅田 秀基 (ASADA HIDETSUGU)  
京都大学・医学研究科・研究員  
研究者番号: 20399041