

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370044

研究課題名(和文)次世代抗ヒスタミン薬の開発に役立つヒスタミン受容体の構造解析

研究課題名(英文)Structure determination of histamine H1 receptor

研究代表者

島村 達郎(Shimamura, Tatsuro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90391979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗ヒスタミン薬はヒスタミンH1受容体に結合して不活性化し、アレルギー症状を抑制するが副作用が多い。本研究では副作用が低く効果の高い新たな抗ヒスタミン薬の迅速な開発に役立つため、第二世代抗ヒスタミン薬とヒスタミンH1受容体の複合体構造の結晶化に成功した。予備的なデータでは、基質結合部位はヒスタミンH1受容体に特有な構造を持つ細胞外領域まで達しており、受容体選択性の高い抗ヒスタミン薬の開発に役立つ知見が得られる目処があった。

研究成果の概要(英文)：Antihistamines are inverse agonists of histamine H1 receptor and work well to relieve symptoms of allergies including pollen fever. Antihistamines are known to show undesirable side effects caused by the low receptor selectivity and the high ability to cross the blood-brain barrier. We succeeded to crystallize histamine H1 receptor in complex with the second-generation antihistamines. The structural information of these complexes would be useful for the development of new generation antihistamines without side effects.

研究分野：構造生物学

キーワード：アレルギー 花粉症 GPCR 結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

ヒスタミンは、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の一種であるヒスタミンH1受容体(H1R)に結合してそれを活性化し、くしゃみなどのアレルギー症状を引き起こす。抗ヒスタミン薬はH1Rの拮抗薬として作用し、アレルギー症状を軽減させるが、特に第一世代薬は、中枢移行性が高いことや、H1R以外の受容体にも結合しやすいことが原因で、眠気や口渇などの副作用が多い。第二世代薬は、カルボキシル基が導入されたものが多く、親水性が増大して中枢移行性が軽減し、また受容体選択性も改善されて副作用は軽減した。しかしその程度はまだ十分とは言えず、更に、H1Rに対する親和性が第一世代薬より低い。そこで、より副作用が少なく効果の高い、各世代抗ヒスタミン薬の長所を併せ持つ薬剤の開発が期待されている。そのためには、各種薬剤とH1Rの複合体の立体構造を決定し、薬剤のH1Rへの結合様式やH1Rへの選択性、親和性を決めている要因を解明する必要がある。しかしながら、(I)大量発現系の構築が難しいことや、(II)構造の柔軟性が高いため不安定なことなどからGPCRの立体構造の決定は膜蛋白質の中でも特に難しい。

我々は、より効果が高く副作用の少ない抗ヒスタミン薬の迅速な開発に役立つ情報を得るため、各世代抗ヒスタミン薬とH1Rの複合体の構造解析研究を行ってきた。我々はこれまでに、膜蛋白質の発現系構築の経験を活用して、酵母によるH1Rの大量発現系を構築し、(I)の問題を解決した(Methods 2011)。また(II)に対応するため、不安定性の一因であるH1Rの細胞内第3ループをT4 lysozyme(T4L)に置換するとともに、親和性の高い第一世代抗ヒスタミン薬を結合させることで構造を不活性型に固定し、H1Rと第一世代抗ヒスタミン薬の複合体構造を決定し、第一世代抗ヒスタミン薬はアミン受容体ファミリーで保存されたアミノ酸残基で囲まれた領域に結合していることを示した

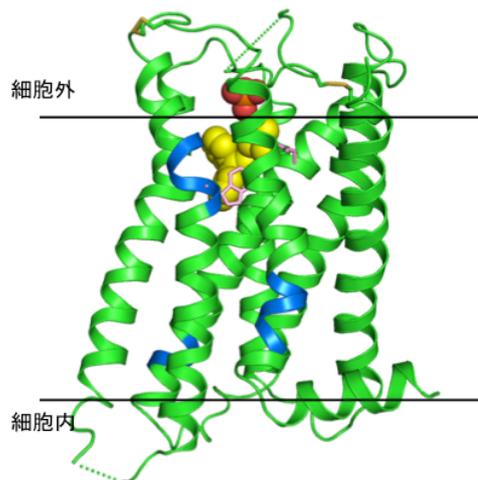


図1. H1Rと第一世代抗ヒスタミン薬の複合体構造

(図1、Nature 2011)。一方で、第二世代薬は第一世代薬に比べ親和性が低く、構造の安定化効果が悪く構造解析は遅れていた。

### 2. 研究の目的

従来の薬より効果が高く副作用の少ない抗ヒスタミン薬を迅速に開発するには、H1Rと第一世代薬との複合体の構造情報に加え、第二世代薬との複合体の構造情報も必須である。本研究は、親和性は低いを受容体特異性の高い第二世代抗ヒスタミン薬とH1Rの複合体構造を決定して第二世代抗ヒスタミン薬とH1Rへの結合様式や、第二世代抗ヒスタミン薬が高い受容体選択性を示す要因を解明し、創薬に役立てることが目的である。

### 3. 研究の方法

第二世代抗ヒスタミン薬とH1Rとの複合体構造を決定するには、H1Rを不活性型構造に安定化させる必要がある。そこで、細胞内第3ループをT4Lに置換したコンストラクトを作製する。置換位置は、複数試した。また、第二世代抗ヒスタミン薬としては、第二世代抗ヒスタミン薬の中では親和性が高いオロパタジンや、分子が大きくH1Rとの相互作用が多いと考えられるレボセチリジンやフェキソフェナジンを使用した(図2)。

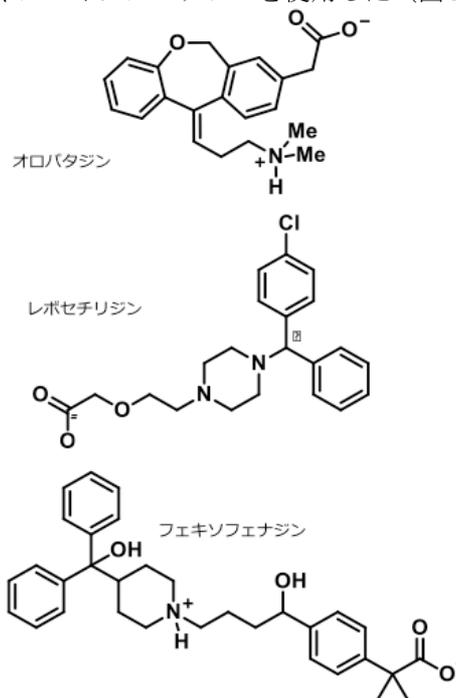


図2. 第二世代抗ヒスタミン薬

更に最近では立体構造認識抗体を結合させることでGPCRを安定化させ構造解析に成功した例も存在する。そこで、結晶化のために、H1Rに対する構造認識抗体の作製も試みた。結晶化は、GPCRの結晶化で多く利用されているLipidic cubic phase(LCP)法を用いた。

#### 4. 研究成果

T4L の挿入位置の異なる複数の H1R コンストラクトを作製した結果、第一世代抗ヒスタミン薬との複合体の構造解析に使用したものが最も安定性が高かった。そこでこのコンストラクトを用いてオロパタジン、レボセチリジン、フェキソフェナジンを結合させ、結晶化を行ったところ、レボセチリジン、フェキソフェナジンを用いた場合には大きな結晶を取得することに成功した (図 3, 4)。



図 3. H1R とフェキソフェナジン複合体の結晶

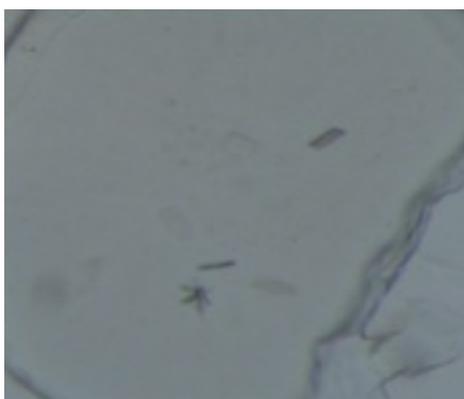


図 4. H1R とレボセチリジン複合体の結晶

オロパタジンとの複合体の結晶は小さかった。これらの結晶について、大型放射光施設 SPring-8 で測定を行ったところ、レボセチリジンについては 3.5Å 程度の分解能でデータを収集することに成功した。フェキソフェナジンについては 3.5Å 程度の分解能でデータを収集中である。オロパタジンについては、分解能が 4Å 程度であった。レボセチリジンとの複合体のデータについては HKL2000 で処理し、Refmac5, Phenix で構造精密化を行った。まだ予備的なデータであるが、レボセチリジンは、分子内の芳香環の部分が、第一世代抗ヒスタミン薬と同様にアミン受容体で保存的なアミノ酸に囲まれた領域に、第二世代抗ヒスタミン薬の特徴でもあるカルボキシル基は細胞外領域に結合していた (図 5)。

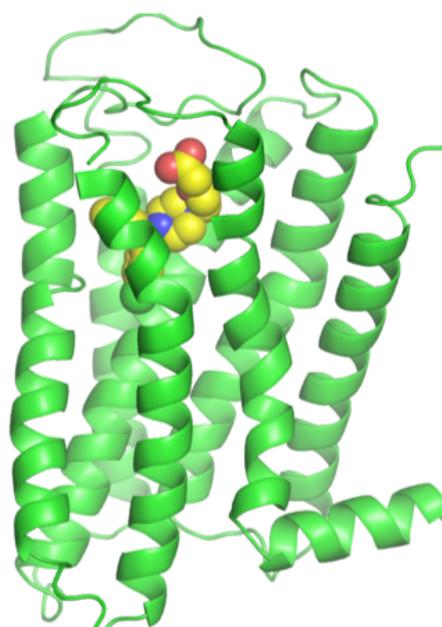


図 5. H1R とレボセチリジンの複合体構造

現在はフェキソフェナジン、オロパタジンとの複合体も含め、更にデータを取得し、構造解析を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

① Tono K, Nango E, Sugahara M, Song C, Park J, Tanaka T, Tanaka R, Joti Y, Kameshima T, Ono S, Hatsui T, Mizohata E, Suzuki M, Shimamura T, Tanaka Y, Iwata S, Yabashi M. Diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA (DAPHNIS): application to serial protein crystallography using an X-ray free-electron laser. J Synchrotron Radiat. 2015 May 1;22(Pt 3):532-7. 査読有 doi: 10.1107/S1600577515004464.

② Suharni, Nomura Y, Arakawa T, Hino T, Abe H, Nakada-Nakura Y, Sato Y, Iwanari H, Shiroishi M, Asada H, Shimamura T, Murata T, Kobayashi T, Hamakubo T, Iwata S, Nomura N. Proteoliposome-based selection of a recombinant antibody fragment against the human M2 muscarinic acetylcholine receptor. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2014 Dec;33(6):378-85. 査読有 doi: 10.1089/mab.2014.0041.

③ Sugahara M, Mizohata E, Nango E, Suzuki M, Tanaka T, Masuda T, Tanaka R, Shimamura T, Tanaka Y, Suno C, Ihara K, Pan D, Kakinouchi K, Sugiyama S, Murata M, Inoue T, Tono K, Song C, Park J, Kameshima T,

Hatsui T, Joti Y, Yabashi M, Iwata S. Grease matrix as a versatile carrier of proteins for serial crystallography. *Nat Methods*. 2015 Jan;12(1):61-3. 査読有  
doi: 10.1038/nmeth.3172.

④ Koike-Takeshita A, Arakawa T, Taguchi H, Shimamura T. Crystal structure of asymmetric football-shaped GroEL:GroES2-ATP14 complex determined at 3.8Å reveals rearrangement between two GroEL rings. *J Mol Biol*. 2014 Oct 23;426(21):3634-41. 査読有 doi: 10.1016/j.jmb.2014.08.017.

⑤ Shimamura T. X-ray structure of histamine H1 receptor. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2014 Jul;144(1):43-4. 査読無

⑥ Shimamura T, Iwata S. Structural biology and molecular targets. *Nihon Rinsho*. 2012 Nov;70 Suppl 8:316-20. 査読無

⑦ Shimamura T. Structure of histamine H1 receptor. *Seikagaku*. 2012 Sep;84(9):772-6. 査読有

⑧ 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

⑨ 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. 査読有  
doi: 10.1186/1475-2859-11-78.

[学会発表] (計5件)

① 島村達郎 ヒスタミン H1 受容体の構造解析と in silico screening. 第87回日本内分泌学会学術総会 (2014.4.25) 博多

② 島村達郎 Crystal structure of Histamine H<sub>1</sub> receptor and drug design. The 11th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. (2013.8.2) 札幌

③ 島村達郎 ヒスタミン H1 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

④ 島村達郎 膜蛋白質の結晶化第12回日本蛋白質科学会(2012.6.20) 名古屋

⑤ 島村達郎 ヒト由来ヒスタミン H1 受容体の立体構造 第9回 GPCR 研究会(2012.5.11) 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島村 達郎 (SHIMAMURA, Tatsuro)  
京都大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 90391979

(2) 研究分担者

日野 智也 (HINO Tomoya)  
鳥取大学・大学院工学研究科・講師  
研究者番号: 40373360

(3) 連携研究者

岩田 想 (IWATA So)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 60452330

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

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

(4) 研究協力者

Rob Leurs