

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640102

研究課題名(和文) ナノディスクを用いたヘテロ二量体エンドセリン受容体のクロストーク機構の解明

研究課題名(英文) Challenge for heterodimer formation of endothelin receptors in nanodiscs

研究代表者

土井 知子 (Doi, Tomoko)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00397580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多くのがん細胞でエンドセリンおよびその受容体の発現が亢進しており、その情報伝達や遮断薬の作用機序を十分に理解することが重要である。本研究で、界面活性剤ミセル中で精製したETBRをナノディスクに再構成するシステムを確立した。変異体は、ジギトニンで可溶化精製することで回収効率が上がることがわかった。この系を用いて受容体の構造解析結果から示唆された各種変異体の活性を測定し、不活性化構造の維持や構造変化に重要な残基を特定することができた。また、再構成に用いるETARの発現量を増加させる変異体を同定し、回収量を増加させる精製法の工夫を行った。引き続き、A型、B型ヘテロ二量体ナノディスクの単離を試みる。

研究成果の概要(英文)：In many cancer cells, expression levels of peptide hormone, endothelin and its receptors are elevated. However, molecular mechanisms of signal transduction and ligand binding by endothelin systems are not fully understood. The goals of this project are to reconstitute a heterodimer of endothelin receptor A-type (ETAR) and B-type (ETBR) in apoA-1 nanodiscs, and to compare its ligand binding properties with those of each homodimer in nanodiscs. The reconstitution system using ETBR well-expressed in insect cells, purified in detergent micelle solution, and apoA1 expressed in E.coli was established in this study. The ETBRs in nanodisc activate G proteins, Gi and Gq comparable to those reconstituted in phospholipid vesicles. However, efficient purification and reconstitution of ETAR in enough amounts could not be achieved and therefore formation of heterodimer was unsuccessful. Efforts to isolate ETAR in enough amounts by introducing overexpressing mutations will be continuously made.

研究分野：構造分子薬理学

キーワード：分子標的治療 エンドセリン受容体 ナノディスク アンタゴニスト アゴニスト

1. 研究開始当初の背景

(1) がん細胞とがん脈管構造を標的とするアプローチにエンドセリン経路がある。エンドセリンはET-1, -2, -3の三種類からなる21残基のペプチドファミリーで、Gタンパク質共役型受容体であるET_ARあるいはET_BRに結合してシグナル伝達を開始する。エンドセリンは、強力な血管収縮作用を持つペプチドホルモンとして発見されたが、近年の研究によって、組織リモデリング、修復、細胞分化などに幅広い生理作用を示すことが明らかになっている。それゆえ、エンドセリン経路はがん細胞の増殖、転移、侵入、脈管構造の分化に重要な働きをしており、本経路の活性化は、アポトーシスの阻害、マトリックスリモデリングなどを引き起こし、肺がん、大腸がん、腎がん、子宮頸がん、乳がん、脳腫瘍などと密接に関わる(①)。この観点から、ET_ARとET_BRの選択的あるいは非選択的阻害薬を化学療法剤と併用した臨床試験が行われているが、未だに第三相を突破できていない。

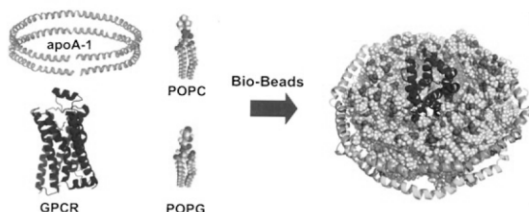
(2) エンドセリン受容体の情報伝達においては、受容体のヘテロ二量体形成が示唆されているにもかかわらず、それらに対する阻害剤の選択性や親和性が正確に評価できていない。例えば、ET_ARとET_BRの非選択的阻害剤であるPD142893がET_BRのみを発現している血管内皮細胞では阻害するのに、両受容体を発現している血管平滑筋細胞のET_BRを阻害しない。この現象が報告されて20年を経る現在も、この理由は明らかでない(②)。我々は、エンドセリン経路の情報伝達の理解を促し、有効な作動薬、阻害薬の開発を目指して、ヒトET_ARとET_BRの昆虫細胞発現系を用いた大量調製、ET_BRの立体構造解析に長年取り組んできた(③)。本研究計画でも、ET-1結合型、非結合型ET_BRの構造解析結果を評価する。

2. 研究の目的

ET_ARとET_BRのヘテロ二量体におけるリガンド結合性、選択性、Gタンパク質活性化能を検討して、in vivoにおけるET_ARとET_BRの情報伝達系の理解を助け、有効なリガンドの開発を促進させる。

3. 研究の方法

昆虫細胞発現系を活かして、大量精製したET_ARとET_BRをナノディスクに再構成する系を立ち上げる。さらに条件検討を行って、ヘテロ二量体の再構成を試み、リガンド親和性の評価系を構築する。



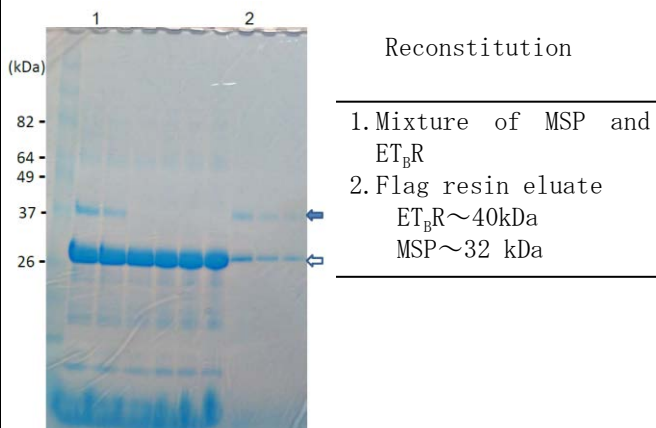
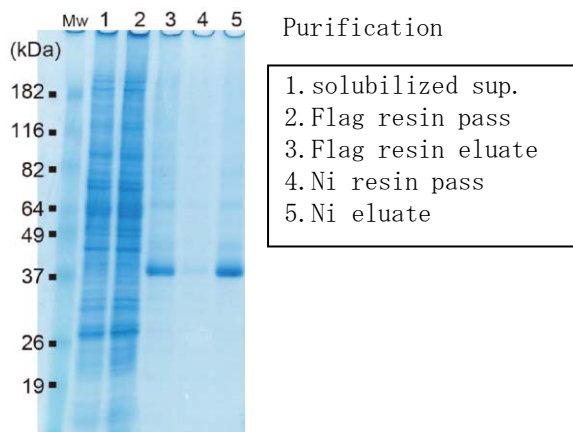
4. 研究成果

(1) MSPの発現と精製

apolipoprotein A-1を改変してmembrane scaffold protein (MSP)として利用できる各種コンストラクトのうち、繰り返しhelixを付加され比較的大きめのdisc半径を与えるコンストラクトMSP1E3D1(Mr[~]32.6kDa)(④)を大腸菌(BL21(DE3))にて大量発現させ、細胞抽出液からニッケルレジンによって精製を行って、6.3g湿重量の菌体から14.3mgを得た。

(2) ET_BRの精製とナノディスクへの再構成

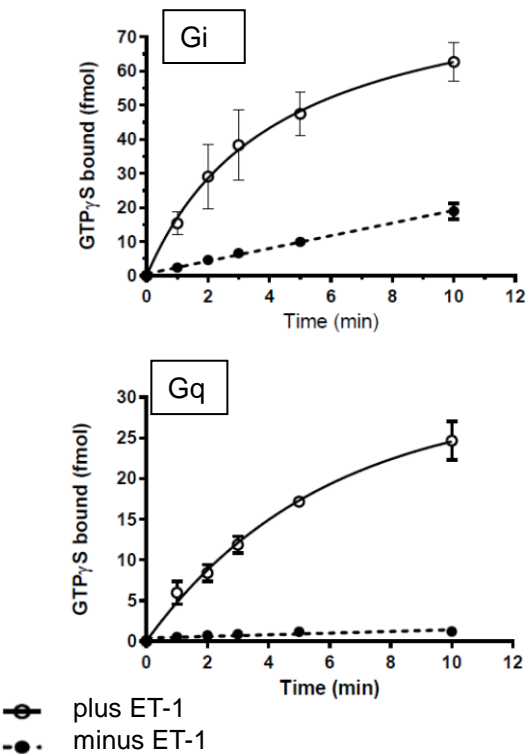
ET_BRは昆虫細胞を用いて大量発現させ、導入しているFlag-tag, His-tagによって0.1%DDMまたは0.1% digitonin中に精製した。文献⑤に従って、lipid(POPC/POPG:3/2, final 7.4 mM)をNaCholateに溶解後、MSP(77 μM), ET_BR 300pmol (final 0.7% cholate, 0.4%DDM)を加え、30分水上でインキュベートした。この後、biobeadsを加えて一晩4°Cでインキュベートして界面活性剤を除去し、さらにFlag resinによって、ET_BRを含まないディスクを除去した。91pmol ET_BRをナノディスクに回収した。W336A変異体については、0.1% digitonin中に精製後、再構成を行って125pmolをナノディスクに回収した。ET_ARについても同様な実験を行ったが、十分な濃度のディスクが得られていない。



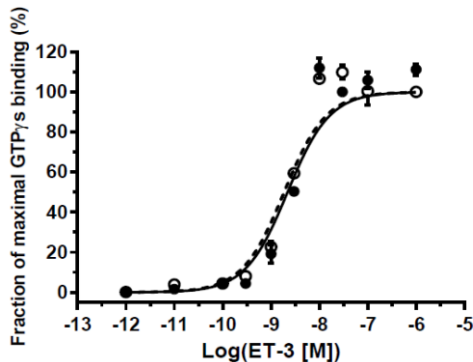
(3) ナノディスク ET_BRによるGタンパク質活性化

ナノディスクに再構成した野生型 ET_BR は、界面活性剤がない状態で活性が維持され凍結融解にも耐え、細胞膜面分と同様な扱いができる。ショ糖密度勾配遠心によって、ET_BR が再構成されたことを確認した。ナノディスク ET_BR は、ET-1 依存的に Gi, Gq の GTP γ S 結合を活性化し、リン脂質二重膜へ再構成した場合と同様な活性化能を示した。

この実験系の確立によって、発現精製できる各種 GPCR 変異体を apolipoproteinA-1 の nanodisc に再構成し、Gタンパク質活性化能を試験管内でアッセイすることができる。



また、耐熱化変異を含む Y5-ET_BR と野生型 ET_BR をナノディスクに再構成し、Gi 活性化における ET-3 濃度依存性を比較したところ、ほぼ同様な EC₅₀ 値 (~2 nM) を示した。(下図) ● : wt, ○ : Y5

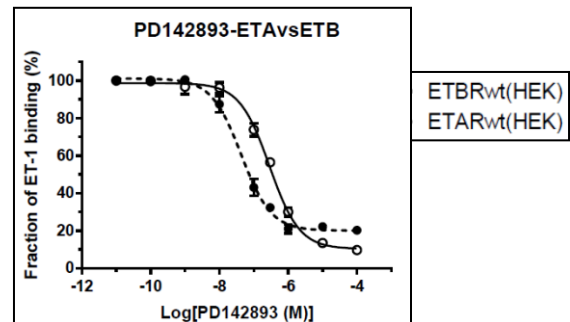


耐熱化変異を含む Y5-ET_BR が野生型と同様な Gタンパク質活性化能を有することは、ET_BR の立体構造解析に用いた耐熱化 Y5-ET_BR 試料が野生型に似た構造を持っていることを示唆し、構造解析結果の有用性を示した。

ET-1 結合型、非結合型 ET_BR の構造解析においては、21 残基の内在性アゴニスト全長の結合様式を明らかにし、ET_BR によるエンドセリンイソペプチドに対する非選択的結合の分子機構を示唆することができた。また、2つの構造の比較から、ET-1 結合によって helix1, 2, 6, 7 が結合した ET-1 に向かって大きく動いている様子が明らかになり、それらの動きに引き続いて Gタンパク質との相互作用に必要な変化が起きると考えられた。

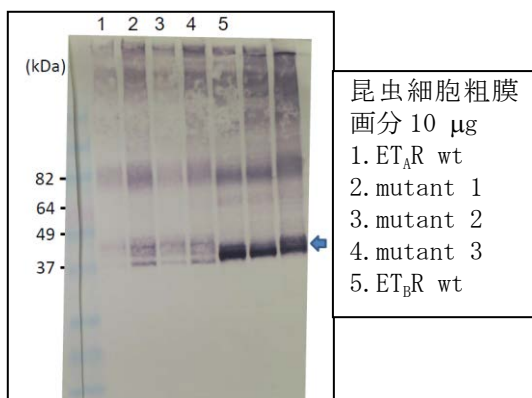
(4) エンドセリン受容体の PD142893 (Ac-D-Dip-LDIIW-OH) 結合性の検討

非選択的阻害剤である PD142893 に対する ET_AR, ET_BR の親和性を、それぞれを動物細胞 (HEK293) に発現させた細胞膜を用いて検討した。ET_AR, ET_BR それぞれの Ki 値は、18.2 nM, 94.0 nM であり、単独で 5 倍程度の親和性に差があることがわかった。この差が、血管平滑筋細胞に発現している ET_BR の PD142893 に対する結合性に影響しているかもしれない。



(5) ET_AR の昆虫細胞における発現を向上させる変異の探索

昆虫細胞に発現する ET_AR は ET_BR に比べ、~1/10 程度の発現量である (図、レーン 1, 5)。ET_AR の変異には、発現量を増加させるものがあり (図、レーン 2, 4)、コンストラクトを工夫することで発現量を増加させ、ナノディスク再構成に有利な回収量を達成できるかもしれない。十分な回収量を得られるコンストラクトを開発し、ET_AR 再構成ナノディスクを調製するとともに、継続してヘテロ二量体の調製に挑戦する。これらは、ET_AR の構造解析にも有用であると考えられる。



Western blotting with flag antibody.

<引用文献>

- ① Losano et al., *Nature Reviews Cancer* (2013) 13, 637-651.
- ② Warner et al. *Br. J. Pharmacol.* (1993) 110, 777-782.
- ③ Doi et al. *EJB* (1997) 248, 139-148.
- ④ Ritchie et al., *Methods in Enzymol.* (2009) 464, 211-231.
- ⑤ Velez-Ruiz, G.A. & Sunahara, R.K., *Methods in Mol. Biol.* (2011) 756, 167-182.

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 2 件)

- ① Thermostabilization of the Human Endothelin Type B Receptor. A. Okuta, K. Tani, S. Nishimura, Y. Fujiyoshi & T. Doi. *J. Mol. Biol.* 428 (11), 5 June 2016, 2265-2274.
- ② Crystal structures of the endothelin receptor type B reveal activation mechanism by endothelin-1. W. Shihoya, T. Nishizawa, A. Okuta, K. Tani, N. Dohmae, Y. Fujiyoshi, O. Nureki, & T. Doi. *Nature in press*. 2016.

[学会発表] (計 1 件)

- ① ヒトエンドセリン受容体のX線結晶構造解析 志甫谷 渉、西澤知宏、奥田明子、谷一寿、藤吉好則、濡木理、土井知子 平成27年度日本結晶学会年会 2015年10月17日大阪府立大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
土井 知子 (DOI, Tomoko)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：397580