

研究報告書

「X線結晶構造解析と低温電子顕微鏡単粒子解析による膜タンパク質複合体の構造基盤と分子機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 西澤 知宏

1. 研究のねらい

生体内ではたらく膜タンパク質には、一つの分子が単独で機能するのではなく、いくつかのサブユニットが会合したり、他の膜タンパク質と過渡的な複合体を形成したりすることで機能を発揮するものが多く知られている。たとえばイオンチャネルは多量体化することで脂質膜中にイオンを透過させる孔を形成し、細胞間接着に関わる分子は単独では接着する力が弱いため同一の分子が多量体を形成したり、他の膜タンパク質を介して細胞の一部に集積したりすることで強固な結合を実現する。本研究では LCP 結晶化法を用いた X 線結晶構造解析、新型検出器を用いた低温電子顕微鏡による単粒子解析など、最新の構造解析の手法を複合的に用いることで、このような膜タンパク質複合体の構造とその分子動態を明らかにすることを目的とする。本報告書では特にペプチド性 GPCR であるエンドセリン受容体に関して詳細を報告する。

2. 研究成果

(1) 概要

血圧制御に関わる G タンパク質共役受容体であるエンドセリン受容体に関して、そのリガンド認識機構、および活性化機構を明らかにするため、X 線結晶構造解析を行った。はじめに生理的活性化リガンドであるエンドセリン-1 結合型、およびリガンド非結合型の二つの結晶構造から、エンドセリンの結合様式と、その結果生じる受容体の活性化機構を明らかにした。エンドセリンは受容体の奥深くにはまり込むように相互作用しており、受容体の N 末端、および細胞外第二ループがリガンドの解離を防ぐようなフタ状の構造を形成していた。エンドセリンは一度受容体に結合するとほとんど外れることがないというきわめて特徴的な性質を示すが、この結合様式は、その不可逆的な結合をうまく説明するものであった。さらにエンドセリンの結合によって、受容体の細胞外側には大きな構造変化が生じており、それらの一部は細胞内側の G タンパク質相互作用部位にも伝わっていた。他のクラス A に属する GPCR との構造比較から、これらは活性化過程の一部に相当すると考えられ、エンドセリン結合による受容体活性化過程の一端が明らかになった。

次に、肺高血圧症の臨床薬として用いられているエンドセリン受容体に対する拮抗阻害剤であるボセンタンと、およびその誘導体が結合した受容体構造を明らかにすることで、非ペプチド性薬剤と受容体の結合様式と、薬剤による阻害機構を明らかにした。ボセンタンのもつスルフオアミド基は受容体の正荷電性アミノ酸とのイオン結合によって強く認識されており、他の置換基が周辺の疎水性アミノ酸によって認識されていた。このような相互作用様式はペプチド性リガンドであるエンドセリンの C 末端配列の認識様式と非常に似通っており、ペプチドリガンド

と小分子化合物の二つの異なるリガンドが予想外の類似性を示すことがわかった。しかしその一方で、ボセンタンは受容体活性化のために必要な相互作用が欠損しており、ほとんど構造変化を起こしておらず、このような結合様式からもボセンタンの拮抗阻害効果を説明できることがわかった。

(2) 詳細

「エンドセリン受容体の活性化機構の解明」

エンドセリン-1(ET-1)は血管収縮因子として単離された 21 アミノ酸からなるペプチドであり、2つの分子内ジスルフィド結合による二環構造を持つ。ET-1 とそのペプチド異性体である ET-2、ET-3は血圧制御だけでなくNa⁺イオンのホメオスタシス、神経発生初期におけるシグナル伝達など幅広く生理機能に関わる。これらのペプチドはクラス A の GPCR に属する2種類の受容体 ET_A、ET_Bを介してGプロテイン、アレチニンなど様々なシグナルを伝える。ET-1 はピコモルオーダーの *K_d* で受容体に対して結合して、一度結合するとほとんど解離しないといきわめて特徴的な性質を示す。このような性質のために、ET-1 による血圧上昇は非常に長時間持続することが知られている。しかしながら、その詳細の分子機構は発見以来長い間理解されていなかった。本研究では熱安定性変異体を導入したヒト ET_B 受容体を対象として X 線による結晶構造解析を行い、ET-1 結合型、およびリガンドが結合していない状態の受容体構造をそれぞれ 2.8 Å、2.5 Å 分解能で決定することに成功した(図1)。

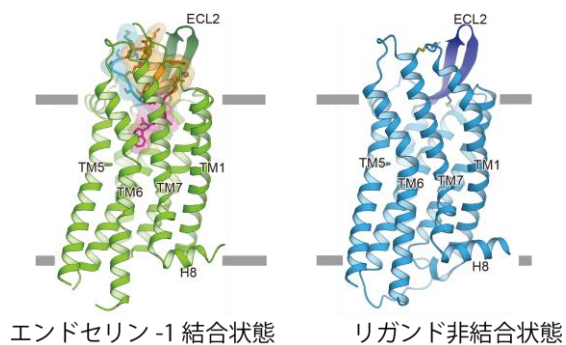
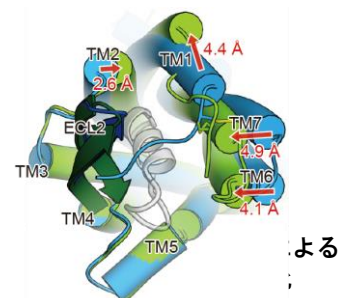


図1：エンドセリン受容体の全体構造

エンドセリン受容体は他の GPCR と同様に、7本の膜貫通ヘリックス(TM1-7)とそれに続く両親媒性の短いヘリックス(H8)からなっており、細胞外の第二ループ(ECL2)はペプチド性受容体に共通のβシート構造を持っていた。受容体の ECL2 と N 末端部分は一緒にリガンドポケットの上部を覆うことで、ET-1 解離を防ぐような「フタ」状の構造を形成しており、ET-1 の不可逆的な結合をうまく説明できる構造であった。ET-1 と受容体の相互作用は主にペプチドの C 末端領域(C-terminal region)と中央のαヘリックス(α-helical region)が関わっており、特に過去の NMR 構造などから非常にフレキシブルであることが示されていた C 末端領域は、受容体の内部に突き刺さるように入り込んで、非常に多くの相互作用を形成しており、この領域が受容体への結合、および G タンパク質活性化において必須であることと合致していた。特に ET-1 ペプチドの C 末端カルボキシル基は、受容体側の複数の正荷電性アミノ酸によって強く認識されていた。

また、2つの結晶構造の比較から ET-1 結合によって受容体に非常に大きな構造変化が生じており、リガンド結合ポケットを形成する周囲のヘリックスは最大で 4 Å 以上も動いていた(図2)。他の GPCR の活性化状態の構造との比較から

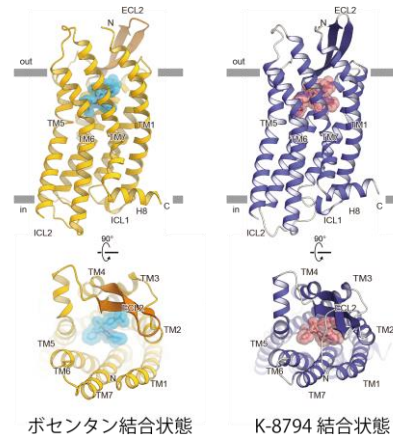


による

TM6、TM7 の内側への動きによって、クラス A の GPCR に共通な保存モチーフが活性型の示す特徴を示すように変化しており、ET-1 結合型では受容体の細胞内側において G タンパク質の結合が起こりやすい状態であることが示唆された。

「ボセンタンによるエンドセリン受容体の阻害機構の解明」

ボセンタンを代表とするエンドセリン受容体に対する拮抗阻害剤は肺高血圧症の臨床薬などに用いられており、受容体その相互作用の情報は薬効改善などのために有用である。しかしながら、これらはいずれもランダムケミカルスクリーニングによって発見された小分子化合物であり、ペプチドリガンドであるエンドセリンとの類似性を持たないため、その結合様式は ET-1 とヒト ET_B 受容体の複合体の結晶構造からは予測することが困難であった。そこで、ボセンタンと、その誘導体である ET_B 受容体選択的阻害剤である K-8794 に関して、ET_B 受容体との複合体の X 線結晶構造解析を行った。マイクロフォーカスビームラインを用いた複数結晶からのデータマージによって、最終的にこれらの分子が結合した状態の受容体の結晶構造をそれぞれ 3.6 Å、2.2 Å 分解能で決定することができた(図3)。



ボセンタン結合状態 K-8794 結合状態

図3：エンドセリン受容体と小分子阻害剤の結合型構造

これらの薬剤はいずれも分子の中央にあるスルフォアミドの持つ負電荷が受容体側の正荷電性アミノ酸によって認識されており、周辺の疎水性置換基がポケットにはまり込むようにして相互作用していた。驚くべきことに、この相互作用はエンドセリンの C 末端領域による相互作用ときわめて類似しており、これらの小分子はペプチド骨格を持たないにも関わらず、ペプチドを模倣するようにして受容体に結合していることがわかった。しかし、その一方で、受容体の活性化のために重要な TM6、7 の構造変化を引き起こすために必要となる相互作用は形成されておらず、その結果、これらの薬剤の結合した受容体は、リガンド非結合型の構造に近かった。このようにボセンタンとその誘導体は、受容体の不活性型の構造を安定化することで拮抗阻害効果を示すということがわかった。

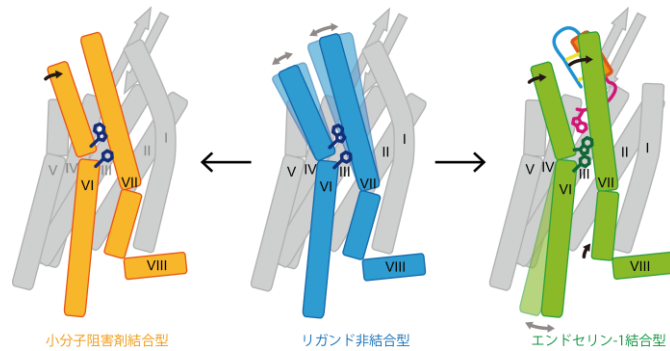


図4：エンドセリン受容体の活性化、および阻害機構

3. 今後の展開

エンドセリン受容体を含む GPCR は薬剤の主要な標的分子であり、その結合様式に関する情報は創薬的な観点からの重要度も高い。特にエンドセリン受容体の場合は下流のシグナルのバイアス性をコントロールできる新規リガンドは抗がん剤としての利用も見込まれている。しかしながら、GPCR と G タンパク質の複合体の構造の報告例は少なく、GPCR におけるバイアス性を

もたらず分子機構に関する理解は未だ乏しい。今後は複数の G タンパク質との相互作用を含めた構造情報を明らかにすることで、バイアス性を持った新規リガンドの探索を行い、創薬面への応用に向けた研究へとつなげていきたい。たとえばオピオイド受容体においては構造解析から数年以内に、構造をもとにした in silico スクリーニングから新規バイアス性リガンドが発見され、その臨床研究が進められるようになった。エンドセリン受容体においても同様の研究展開が期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さがけ予算において推進してきた研究においては、特にエンドセリン受容体に関して国際競争に負けずに Nature を含む一流紙に複数の論文を発表できたことは非常に評価できる点であり、研究者自身の持つ解析技術などを含めて、国際的な競争に十分参加できるレベルにあることを示している。しかし、同時並行で複数のプロジェクトを推進する中で、類似研究が先行して報告されてしまったケースもあった。このように、各プロジェクトに対する投資のバランスは非常に難しい判断となることが多いが、これらの経験を今後の研究に活かしていきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

テラスパニンファミリーの構造解析では、競合グループに CD9 のX線結晶構造解析で先行されたが、CD9 と EWI との複合体の単粒子構造解析を進めており、構造に基づいた機能解明で大きな成果が期待できる。

エンドセリン受容体の結晶構造解析では、熱安定変異体のリガンドフリー、ET-1 複合体、拮抗阻害剤ポセンタン複合体の結晶構造解析に相次いで成功し、世界にさがけて論文発表を行った。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Shihoya W., et al. Nature. 2016, 537, 363-368 |
| 2. Shihoya W., et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 2017, 24, 758-764 |
| 3. Taniguchi R et.al. Nature. 2017, 548, 356-360 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

第 15 回日本蛋白質科学会, 「SACLA を用いた SFX 解析による膜蛋白質構造解析」, 講演(徳

島, 2015)

第 14 回アジア結晶学会 (AsCA), 「Activation mechanism of endothelin ET_B receptor by endothelin-1」, 招待講演 (ベトナム ハノイ, 2016)

第 39 回分子生物学会, 「Activation mechanism of endothelin ET_B receptor by endothelin-1」, 招待講演 (横浜, 2016)

Cold Spring harbor Asia, Membrane Proteins: Structure & Function, 「Activation mechanism of endothelin ET_B receptor by endothelin-1」, 講演 (中国 蘇州, 2017)

2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 「X 線自由電子レーザーによって見えてきたチャネルロドプシンのイオン透過機構」, 講演 (神戸, 2017(予定))

プレスリリース

「血管収縮因子エンドセリンの受容体初期活性化機構を解明」(2016 年 9 月)

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2016/4997/>

「肺動脈性肺高血圧症の治療薬ボセンタンの作用機構を解明」(2017 年 8 月)

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2017/5492/>

著作物

医学のあゆみ, 生命現象を視る, 262 巻, 5 号, 「結晶構造から理解する GPCR の活性化機構」(2017)