

## 論文の内容の要旨

論文題目 脂質膜流動性を利用したGPCRの  
物理化学的解析と薬剤探索への応用

氏 名 吉田 浩平

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) はヒトに約 800 種類存在している細胞内外のシグナル伝達を担う 7 回膜貫通蛋白質であり、<sup>1</sup> 低分子を主とした創薬標的として非常に重要な分子である。しかしながら GPCR に対する *in vitro* での解析は、GPCR の溶液中における不安定性や、生体内環境との差異等の問題点から、発展が遅れている。特に、GPCR は流動的な脂質二重膜中においてその構造を適切に制御することで機能しているため、<sup>2</sup> 周囲の膜環境を考慮した上で測定を行う必要がある。脂質二重膜中における GPCR の物性について、静的な構造情報のみならず、物理化学的かつ動的な理解を深めることは、次世代の創薬開発において重要であると考えられる。同時に、脂質の物性が及ぼす GPCR 機能への影響を理解することで、その影響を利用した新規医薬品の探索手法を開発することも可能であると考えられる。

Nanodisc システムは溶液中で目的の膜蛋白質を脂質二重膜に再構成することが可能であり、上記のような取り扱いの困難さや環境の違いといった問題点を解決するための技術として開発された。<sup>3</sup> 近年ではこの Nanodisc を用いた数々の膜蛋白質研究が報告されてきているが、その中でも GPCR を標的とした解析報告例は未だ少なく、本技術を用いた GPCR 研究の発展が強く望まれている。<sup>4,5</sup> そこで本研究では、Nanodisc を活用した GPCR-低分子薬剤相互作用に対する物理化学解析手法を確立する。また、その相互作用が脂質の物性によって受ける影響の詳細を明らかにするとともに、得られた知見を基に新規薬剤探索手法の提案、及びその有効性の実証を目指す。

第二章では、GPCR および Nanodisc の調製を行い、*in vitro* での相互作用解析系を構築した。ヒト由来セロトニン受容体 2B をモデル GPCR として用い、バキュロウイルスによる sf9 昆虫細胞で発現を行った。組換えバキュロウイルスを感染させて発現した全長のセロトニン受容体 2B は安定性が低く精製が困難であったため、溶液中での安定性を向上させた改変コンストラクト (5-HT<sub>2B</sub>R) を作製した。感染した昆虫細胞膜画分を界面活性剤によって可溶化し、金属アフィニティークロマトグラフィー、分子サイズ排除クロマトグラフィーにより得られた精製標品と、膜骨格蛋白質、リン脂質、及びコール酸ナトリウムを混合して Nanodisc を調製した (図 1)。

得られた 5-HT<sub>2B</sub>R-Nanodisc に対して、表面プラズモン共鳴法 (SPR)、及びマイクロスケール熱泳動法 (MST) を用い、基質のセロトニン (5-HT) に対する結合活性を評価した。その

結果、界面活性剤環境では測定が困難であった基質との特異的結合を観測することに成功した。さらに、Nanodisc に埋包した 5-HT<sub>2B</sub>R はヒト細胞膜上に発現している野生型と同等の 5-HT 結合親和性を示した。この結果から、Nanodisc の活用は GPCR と低分子の定量的な物理化学的測定に有効であることが示唆された。

第三章では、リン脂質の物性が GPCR の基質結合活性に与える影響について、物理化学的手法を用いた相関解析を行った。リン脂質は生体膜の大部分を占めているとともに、その親水部・疎水部の多様性が膜の性質を特徴づけている。<sup>6</sup> ここでは、異なる疎水部によって変化する膜の流動性に着目し、5-HT<sub>2B</sub>R の基質結合活性に与える影響の精査を試みた。異なる疎水部を有する 4 種類のリン脂質 POPC、DLPC、DOPC、DMPC をそれぞれ用いた 5-HT<sub>2B</sub>R-Nanodisc を調製し、MST 及び SPR による 5-HT との相互作用測定を行った結果、用いたリン脂質によって基質結合活性の有無、および結合親和性に差が見られた (図 2)。用いたリン脂質の中で比較的高い流動性を示す DLPC において、5-HT<sub>2B</sub>R は高い基質結合活性を示し、一方で流動性の低い DMPC 中では基質結合能が失われた。このことから、周囲のリン脂質環境によって GPCR のコンホメーションが異なる平衡状態に制御されている可能性が示唆された。そこで、蛋白質の熱変性を測定する手法の一つである CPM アッセイを利用し、各リン脂質で調製した Nanodisc 中における 5-HT<sub>2B</sub>R の熱安定性比較から、平衡状態の差を明らかにすることを試みた。その結果、流動性が高いリン脂質中における 5-HT<sub>2B</sub>R は、より低い熱安定性を示すことが明らかとなった (図 3)。一般的に GPCR は活性状態よりも不活性状態の方が安定であることから、<sup>7</sup> 高流動性リン脂質膜中において 5-HT<sub>2B</sub>R は活性構造を取りやすい状態に平衡が変化していることが示唆された。

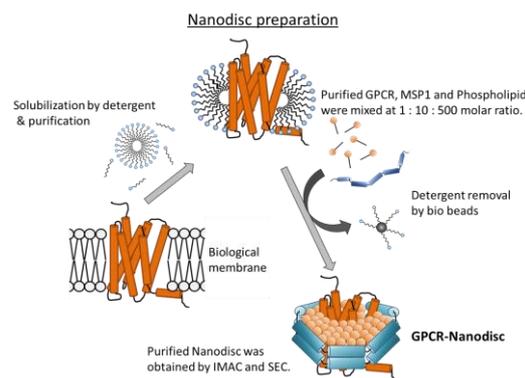


図 1. Nanodisc の調製スキーム

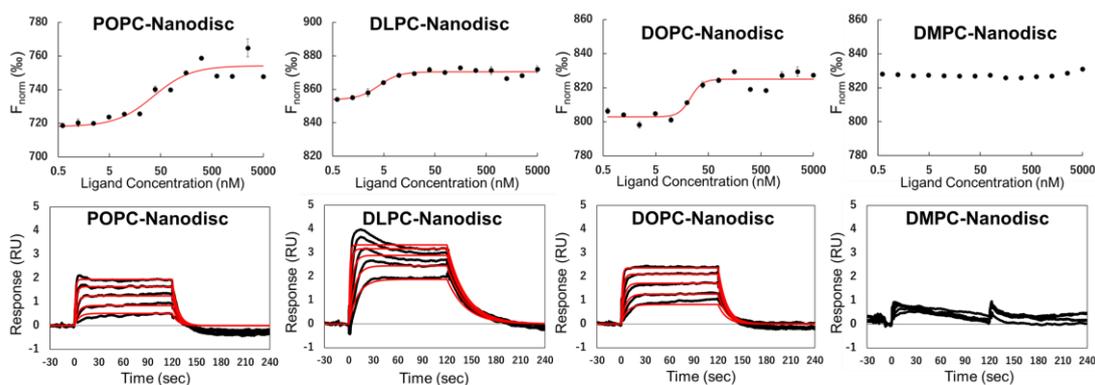


図 2. 異なるリン脂質を用いた 5-HT<sub>2B</sub>R-Nanodisc と 5-HT の相互作用測定 (上段 : MST、下段 : SPR)

第四章では、各リン脂質膜の異なる流動性が 5-HT<sub>2B</sub>R の基質結合活性および平衡状態に影響を与える機構の詳細について、5-HT<sub>2B</sub>R の動的な相互作用を観測するための分子動力学シミュレーションを行った。各リン脂質中において 5-HT<sub>2B</sub>R の膜貫通ヘリックス (TM) 1-TM7 間の距離には異なる傾向が観測され、この原因が TM 間の静電的相互作用 (K53<sup>1.32</sup>-E363<sup>7.36</sup>) 形成の有無によることが示唆された (図 4)。

実際に、この静電的相互作用を生み出している側鎖について、電荷を消失、または反発させるような変異体を作製したところ、5-HT との結合親和性が有意に低下した。以上の結果から、リン脂質膜の流動性は 5-HT 結合の際に必要な 5-HT<sub>2B</sub>R の構造変化に寄与していることが明らかとなった。また、リン脂質膜中において 5-HT<sub>2B</sub>R には構造的揺らぎに基づく活性-不活性状態の平衡が存在し、この平衡が周囲のリン脂質環境によって左右されることが物理化学的かつ計算科学的に実証された。

第五章では、前章までに得られた知見を活かし、Nanodisc を活用した新規薬剤候補化合物の探索を試みた。リン脂質組成を変更し、膜の流動性を高く調節することで基質結合活性が高く維持された GPCR に対して薬剤候補化合物の探索を行い、アゴニスト候補化合物の取得を目指した。市販のフラグメントライブラリー Zenobia を利用し、SPR 法によるヒット化合物の選定を行った。得られたヒット化合物は、MST や等温滴定型熱量測定 (ITC) を用いて物性評価を行った。また、酵母を用いたシグナル伝達アッセイにより、各ヒット化合物のアゴニスト活性評価を行った。本フラグメントライブラリーからはアゴニスト活性を有する化合物を直接取得することはできなかったが、受容体の本来の基質結合ポケットに発熱的に相互作用しているフラグメントを取得することができ、これを基にした FBDD、化合物の構造展開が期待された (図 5)。

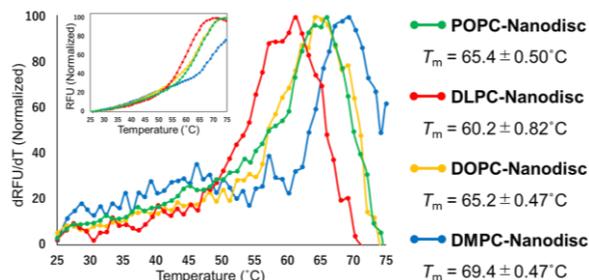
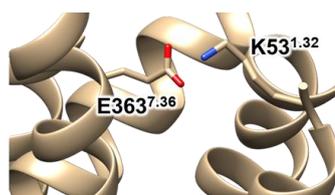


図 3. 各 5-HT<sub>2B</sub>R-Nanodisc の熱安定性評価



Distances of C $\alpha$  atom between K53<sup>1.31</sup>-E363<sup>7.36</sup> of the 5-HT<sub>2B</sub>R

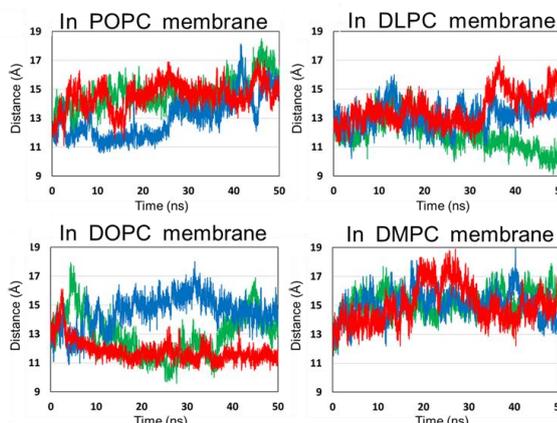


図 4. TM1-TM7 間の静電的相互作用形成

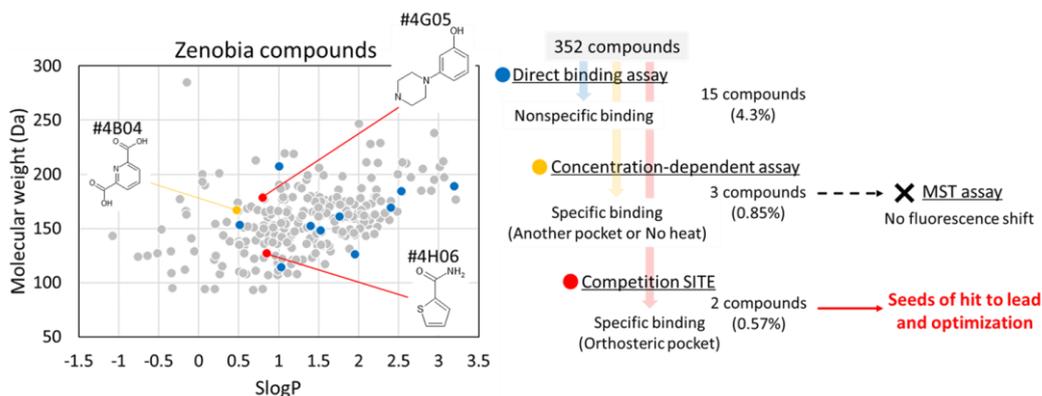


図 5. Zenobia フラグメントライブラリーを用いた薬剤探索結果

本研究において Nanodisc を用いた GPCR と低分子薬剤の物理化学的解析手法を構築し、脂質の物性が GPCR の機能に影響を与えることを実験的に明らかにした。さらに、リン脂質の物性によって GPCR 構造の平衡状態を制御できる可能性が示された。以上の GPCR と脂質膜の性質に関する知見を活用し、Nanodisc を利用して目的に合わせた GPCR 創薬アプローチが可能になることが期待される。

#### 参考文献

1. Bjarnadóttir, T. K. *et al.* Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* **88**, 263–273 (2006).
2. Chattopadhyay, A. GPCRs: Lipid-Dependent Membrane Receptors. *Adv. Biol.* **2014**, 12 pages (2014).
3. Schuler, M. A., Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Nanodiscs as a New Tool to Examine Lipid-Protein Interactions. *Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols* **974**, 415–433 (2013).
4. Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 481–486 (2016).
5. Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chem. Rev.* **117**, 4669–4713 (2017).
6. Van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
7. Tate, C. G. A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 343–352 (2012).