

論文の内容の要旨

Ligand recognition and activation mechanism of class A GPCRs

(Class A GPCR におけるリガンド認識および活性化機構)

井爪 珠希

Class A GPCR は、GPCR のうちヒトにおいて最も多様性があり、また創薬ターゲットとしてよく研究されているサブファミリーである。このうちエンドセリン受容体 (ETR) はペプチドホルモンであるエンドセリンをリガンドとする Class A GPCR であり、血管内皮細胞において血圧維持などの多様な細胞応答に関与する。エンドセリンは ET-1、ET-2、ET-3 の 3 種類存在し、ETR には A 型と B 型の 2 種類が存在する。ETAR が血管収縮を誘導するのに対して ETBR は血管弛緩を誘導する (図 1)。そのため、B 型選択的に結合するアゴニストは、高血圧症、心臓病、アルツハイマー病治療や、がん細胞への薬物輸送の改善に向けて注目されている。

ETBR のリガンド非結合状態および ET-1 結合型の立体構造から、ETBR とエンドセリンの結合様式や構造変化が解明されている。しかし、ET-1 は A 型と B 型に同程度結合するアゴニストであるために、B 型選択的アゴニストの結合様式及び受容体活性化機構は不明であった。本研究では ET-1 結合型の構造決定と同様に、耐熱化変異および細胞内第 3 ループに T4 リゾチームを導入し安定化したヒト由来 ETBR 改変体を昆虫細胞 Sf9 で過剰発現、精製し、アゴニストを加え結晶化を行った。その結果、B 型選択的アゴニストである ET-3 と IRL1620、およびエンドセリン様ペプチドであるヘビ毒の Sarafotoxin s6b (以下 S6b) と ETBR の複合体の 3 種の立体構造をそれぞれ 2.0 Å, 2.7 Å, 3.0 Å 分解能で決定することに成功した。これにより、①ETBR アゴニストの結合様式と B 型選択性の分子基盤、②ETBR 活性化機構の詳細、③IRL1620 の ETBR 部分活性化機構の 3 点の分子機構について知見をもたらした。

① ETBR アゴニストの結合様式と B 型選択性の分子基盤への示唆

ET-1、ET-3、IRL1620、S6b はそのアミノ酸配列の多様性に反し、共通してペプチド C 末端が

膜貫通領域の中央にあたる結合ポケットに深く刺さり、ECL2 が蓋を形成していた。結合ポケット内の残基は ETAR, ETBR 間で保存性が高いが、ECL2 は保存性が低いことから、ECL2 の構造の違いが B 型選択性に寄与していると考えられた。各種アゴニストの ETBR との結合様式の比較や ECL2 残基の変異体解析、S6b 結合型 ETBR の立体構造をもとにしたモデル構築から、ETAR の ECL2 とリガンドの結合可否が B 型選択性を左右することが示唆された

② ETBR 活性化機構の詳細

Class A GPCR では受容体コア部 D147 近傍に Na^+ が配位し、 $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$ クラスターを形成することが不活性状態の安定に寄与している。2.2 Å 分解能の拮抗薬 K8794 結合型 ETBR 構造から、ETBR では Na^+ の代わりに水分子を介したネットワークが不活性状態を安定化していることが報告されている。本研究では ET-3 結合型の立体構造を 2.0 Å で決定した。そして、リガンド結合状態の D147 近傍では水和水が減少し、周辺残基の親水的相互作用が変化していることを解明した。D147 近傍の水分子を介したネットワークはアゴニストの結合により崩壊、再編成され、GPCR 間で高度に保存されている W336 及び N378 の移動および細胞内側 TM6 の外向きへのシフトを引き起こすことが明らかになった。

③ IRL1620 の ETBR 部分活性化機構の解明

IRL1620 は N 末端の 7 残基を欠失しているために TM6 の K346 との結合がなく、IRL1620 結合型 ETBR は ET-3 結合型よりも細胞外側 TM6 の傾きが小さい。これが与える影響を調べるために D147 近傍を比較したところ、IRL1620 結合型 ETBR は拮抗薬 K8794 結合型構造に近い構造をとっていた (図 3 右)。IRL1620 の受容体活性化能が低い可能性が示唆されたため、ET-3, IRL1620 の耐熱化変異及び野生型 ETBR の受容体活性化能を $\text{TGF}\alpha$ shedding assay により評価したところ (東北大学薬学研究科・青木研究室との共同研究)、IRL1620 はエンドセリンと同等の結合能を有するにも関わらず E_{max} は ET-1 の 88% であった。本研究から、IRL1620 が受容体を完全に活性化できない部分作動薬であることが示唆された。

本研究では ETBR アゴニストの結合様式の違いと活性化機構に焦点を当て、X 線結晶構造解析によりその機構の説明を試みた。今後、ETAR とアゴニストおよび G タンパク質の 3 者複合体のクライオ電顕による単粒子構造解析を行い、ETAR と ETBR の構造比較による B 型選択性の議論を目指す。