

30 希少腎疾患治療に向けた膜受容体の構造解析及び創薬	加藤 英明
-----------------------------	-------

【目的】先天性腎性尿崩症 (congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus : cNDI) は、尿中の水分再吸収が阻害された結果、1日15リットルにも及ぶ多飲多尿を強いられる腎・泌尿器系の希少疾患である。cNDIの主原因は抗利尿ホルモンであるバソプレシン (AVP) のシグナル異常であり、その殆どが AVP の膜受容体である 2 型バソプレシン受容体 (AVPR2) の遺伝子変異に由来すると考えられている。AVPR2 は腎臓の集合管細胞の細胞膜表面に発現する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、通常 AVP を受容した AVPR2 は Gs タンパク質の活性化を介して水チャネルタンパク質の細胞膜局在を促し、尿からの水再吸収を促進する。しかしながら、変異型 AVPR2 の多くは、翻訳まではされるもののフォールディング異常により小胞体 (ER) にトラップされてしまい、作用する場である膜表面に局在できず結果として機能喪失に至る。こうした状況下で、一部の脂溶性 AVPR2 リガンドは ER に局在した変異型 AVPR2 タンパク質にアクセスし、そのフォールディング異常を正し、更には膜表面への局在を助けることが可能であることが判明し、注目を集めている。これらのリガンドは従来のタンパク質型の分子シャペロンと区別して、薬理的シャペロン (pharmacological chaperone : PC) と呼ばれ、その開発と臨床応用が模索されてきた (Mouillac et al., 2014, Pharmacol. Res.) (図)。これらの PC は既に一定の成果を挙げているものの、NDI の発症に繋がると報告されている 200 以上の AVPR2 変異の中には、既存 PC によってレスキュー可能なものと不可能なものが存在しており、そのことが PC を用いた NDI 治療の確立を妨げる一因となっている。そこで本研究では、AVPR2 の PC として最も効果を挙げている tolvaptan に着目し、「tolvaptan がどのように AVPR2 に結合し、どのようにフォールディング異常を正すことで膜局在の正常化を促しているのか」、また「tolvaptan がフォールディング異常を正すことの出来る変異とできない変異には本質的にどのような違いが存在するのか」という問題の解明を目指した。

【方法】「野生型 AVPR2-tolvaptan 複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析」、そして「計算科学的手法を用いた tolvaptan による PC 効果の作用機序解明」という 2 つのアプローチを用いることで、上記の目的達成を目指した。特に前者について、AVPR2 の結晶構造解析は 30 年以上多くの研究者が挑戦しているにもかかわらず、いまだにその構造決定には至っていないことから、X 線結晶構造解析ではなくクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いて構造解析を行うことにした。この際、AVPR2 を含む class A GPCR は cryo-EM で構造決定するには分子サイズが小さすぎたため、その手法開発を行うところから挑戦した。

【結果】30 以上のコンストラクトと 100 以上の発現精製条件を検討した結果、野生型ヒト AVPR2、2 種の抗 BRIL 抗体の発現精製系の確立に成功した。また、AlphaFold2 と自作のスクリプトを組み合わせることで、構造解析に適したコンストラクトを迅速に *in silico* screening するためのパイプラインを開発することができた。また、見出したコンストラクトと抗体を用いて、実際に cryo-EM 構造解析に適した AVPR2-BRIL-抗 BRIL 抗体複合体を形成することに成功した。

GPCR における薬理的シャペロン (PC) の作用機序

