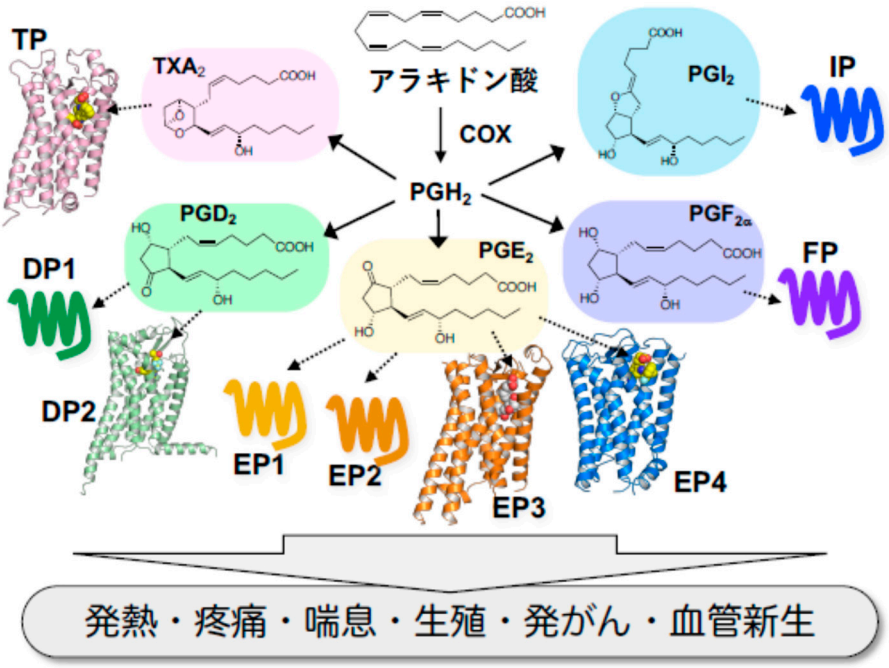
164　プロスタグランジン創薬に向けた受容体の立体構造解析	森本　和志

【目的】プロスタグランジン（PG）類は細胞膜リン脂質中のアラキドン酸から産生される脂質メディエーターであり、発熱や痛覚過敏などの炎症応答を初めとして、生殖・がん・骨形成・肥満・高血圧・ストレス応答など様々な生理・病態生理に関わる。PG 類には主なものとして PGD_2、PGE_2、$PGF_{2\alpha}$、PGI_2、トロンボキサン（TX）A_2の 5 種類が存在し、その受容体は DP1、DP2、EP1～4、FP、IP、TP の 9 種類の GPCR が存在する。これまで PG 受容体の立体構造解析は他の GPCR に比べ遅れていたが、最近になってアンタゴニスト結合型 DP2 の結晶構造がまず報告され、続いてアンタゴニスト結合型 TP の結晶構造が報告された。我々のグループでは EP 受容体の結晶構造解析に取り組み、アンタゴニストおよびシグナル抑制抗体を結合した不活性型 EP4 を分解能 3.2 Åで、内因性アゴニストである PGE_2が結合した活性型様 EP3 を分解能 2.9 Åでそれぞれ決定した。本研究では PG 受容体を対象とした創薬をより加速するため、立体構造未決定の PG 受容体の立体構造を決定することを目的とした。

【方法】FSEC-TS 法により可溶化した受容体の熱安定性を指標に受容体発現コンストラクトのスクリーニングを行った。決定したコンストラクトを昆虫細胞（Sf9）で発現し、精製・結晶化を行った。精製試料については SDS-PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィー、CPM assay により評価した。また Sf9 で発現した EP4 受容体および G$\beta\gamma$、大腸菌で発現した安定化 Gs（miniGs）、Brevibacillus で発現したナノボディ（Nb）35 をそれぞれ精製し、PGE_2および apyrase 存在下で混合して複合体を調製、クライオ顕微鏡にて単粒子解析を行った。

【結果】本研究により PG 受容体 EP1 の精製方法が確立された。またこれまでに PG 受容体と G タンパク質の複合体構造の解析例はなかったが、miniGs や界面活性剤に GDN を用いることでクライオ電子顕微鏡による構造解析に成功した。本構造では PGE_2結合 EP3 と同様、膜貫通（TM）1 の細胞外側や TM6 の細胞内側の大きな変位が見られ、PG 受容体に共通の構造変位である可能性が示唆された。また Gs タンパクの C 末端の向きが既報のいずれの GPCR－G タンパク質複合体とも異なっており、新たな結合様式の可能性が示唆された。

プロスタグランジン（PG）の産生経路と受容体の結晶構造



164. プロスタグランジン創薬に向けた受容体の立体構造解析

森本　和志

*京都大学 大学院医学研究科 分子細胞情報学

Key words：プロスタグランジン受容体，GPCR，X 線結晶構造解析，クライオ電子顕微鏡単粒子解析

緒　言

プロスタグランジン（PG）類は細胞膜リン脂質中のアラキドン酸から産生される脂質メディエーターであり、発熱や痛覚過敏などの炎症応答を初めとして、生殖・がん・骨形成・肥満・高血圧・ストレス応答など様々な生理・病態生理に関わる。PG 類の受容体は DP1、DP2、EP1～4、FP、IP、TP の 9 種類の GPCR が存在する。これまでに PG 受容体の立体構造解析としては、アンタゴニストを結合した不活性型 DP2、EP4、TP およびアゴニストを結合した活性型様 EP3 の結晶構造が我々を含む複数のグループから報告されてきた［1～5］。

本研究では PG 受容体を対象とした創薬をより加速するため、立体構造未決定の PG 受容体の立体構造を決定することを目的とした。また GPCR は不活性状態と活性化状態（G タンパク質結合状態）で大きく構造が変移し、リガンドポケットの形状も変化する。そのためアゴニスト創薬のためには活性型構造の取得もまた重要となる。本研究では EP4 受容体－Gs 複合体の立体構造を、クライオ電子顕微鏡（CryoEM）を用いて決定し、不活性型構造と比較することにより活性化による構造変化を明らかにした。また本構造から EP4 に共役した Gs の C 末端は従来とは大きく異なる構造をとることが明らかとなった［6］。

方　法

1. 安定化 PG 受容体コンストラクトの探索

出芽酵母 FGY217 に GFP 発現ベクター断片および PCR 断片を形質転換後、ウラシル欠損培地でセレクションし、2%ガラクトースで発現を誘導した。GFP 融合受容体を DDM により可溶化、加熱後、蛍光ゲルろ過により熱安定性を評価した［7］。また Bac-to-bac Baculovirus Expression System を用いて昆虫細胞（Sf9）で GFP 融合受容体を発現し、同様の方法で熱安定性を評価した。

2. 精製タンパク質の調製

受容体については、発現した昆虫細胞から超遠心により膜画分を調製し、DDM で可溶化後、His-tag および FLAG-tag によりアフィニティ精製をし、界面活性剤を L-MNG に置換後、ゲルろ過によって最終精製産物を得た。Gβγタンパク質については、発現した昆虫細胞から超遠心により膜画分を調製し、コール酸および DDM で可溶化後、His-tag によりアフィニティ精製をし、ゲルろ過精製を行った。miniGs については、発現した大腸菌をソニケーションで破砕し、His-tag 精製後、tag をプロテアーゼ切断し再度 Ni レジンと混合し、素通り画分をゲルろ過により精製した。Nb35 については Brevibacillus を用いて分泌発現を行い、培養上清を硫安沈殿にて濃縮 TBS に溶解して His-tag 精製後、tag をプロテアーゼ切断し再度 Ni レジンと混合し、素通り画分をゲルろ過により精製した。得られた精製 EP4、Gβγ、miniGs、Nb35 は、PGE_2および apyrase 存在下で混合して複合体を形成させ、ゲルろ過後最終精製物とした。精製試料については SDS-PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィー、thermal shift assay により評価した。

3. 受容体の結晶化

精製した受容体をモノオレインと 2：3（v/v）で混合し、脂質キュービック相（LCP）法により結晶化を行った。結晶化条件のスクリーニングは Hampton Research 社の StockOptions Salt を用いて行った。

*現在の所属：九州大学 大学院薬学研究院 生命物理化学分野

4. クライオ電子顕微鏡単粒子解析

精製サンプルを 8.4 mg/ml まで濃縮後、クライオグリッドを作製し Titan Krios にて収集した 5,743 画像、456,991 粒子を対象として単粒子解析を行った。

結　果

1. 安定化 PG 受容体コンストラクトの探索

酵母発現系によるハイスループットスクリーニング［7］を用いて受容体の細胞内第 3 ループに bRIL タンパク質を融合した場合や 3.39R 変異［8］を導入した際の発現量および熱安定性を評価した。その結果 EP1、EP2、FP、IP が相対的に良好であったため、Sf9 へと発現系を移し同様の検討を行った（図 1）。EP1 が最も安定であるものの発現が悪く、IP については発現・安定性ともに良好であった。そこでこれらについて精製を行ったところ、IP については精製中に凝集を来たし、精製が困難であった。一方、EP1 については精製が可能であったことから、発現量の向上を目標にコンストラクトの検討を行った。

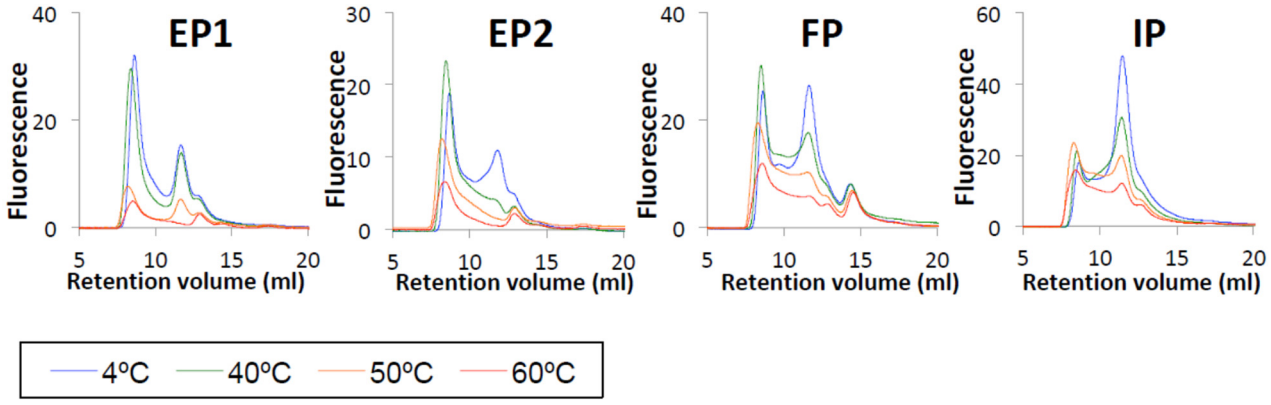


図 1.　FSEC-TS による熱安定性評価

Sf9にてGFPを融合して発現した受容体を可溶化・加熱後、蛍光ゲルろ過を行った。

受容体モノマーは12 ml付近のピークに相当する。

2. EP1 受容体の精製・結晶化

受容体の N 末端および C 末端切断位置や融合タンパク質の検討の結果、発現量の大幅な改善が見られ（図 2a）、昆虫細胞 10 L の培養から約 5 mg の精製タンパク質を得ることに成功した（図 2b、c）。精製受容体の熱安定性は 56℃と良好であった（図 2d）。そこで LCP 法により結晶化のスクリーニングを行った結果、微結晶の析出を確認した。

3. EP4 - Gs 複合体の立体構造

活性型 EP4 受容体では不活性型に比べ、膜貫通（TM）1 の細胞外側が内側へと変位し、リガンドの侵入口が完全に塞がれていた。また TM6 の細胞内側が外側へと大きく変位し、生じた空間に Gs タンパク質の C 末端が刺さり込むようにして結合していた（図 3）。

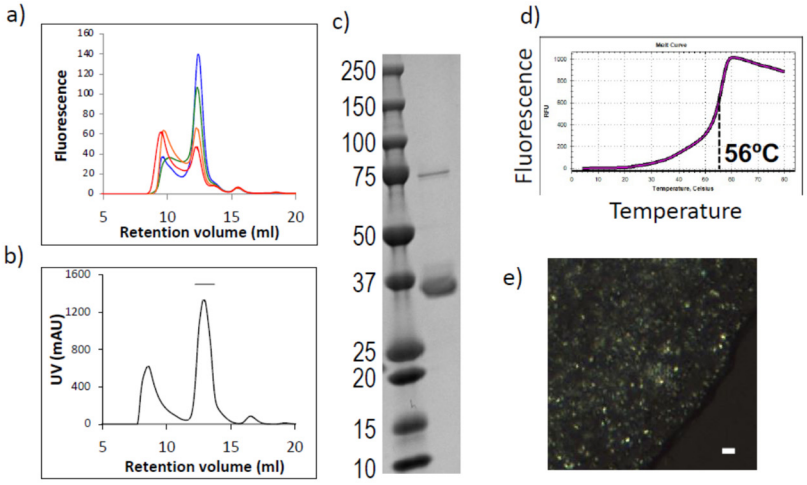


図 2.　EP1 受容体の精製・結晶化

a）FSEC-TSによる受容体安定性評価。温度は図1に同じ。

b）精製最終ステップにおけるゲルろ過クロマトグラム。棒線は回収フラクションを示す。

c）精製受容体のSDS-PAGE、CBB染色。

d）thermal shift assayによる精製受容体の安定性評価。

e）結晶化受容体の偏光画像（スケールバー：10 μ m）。

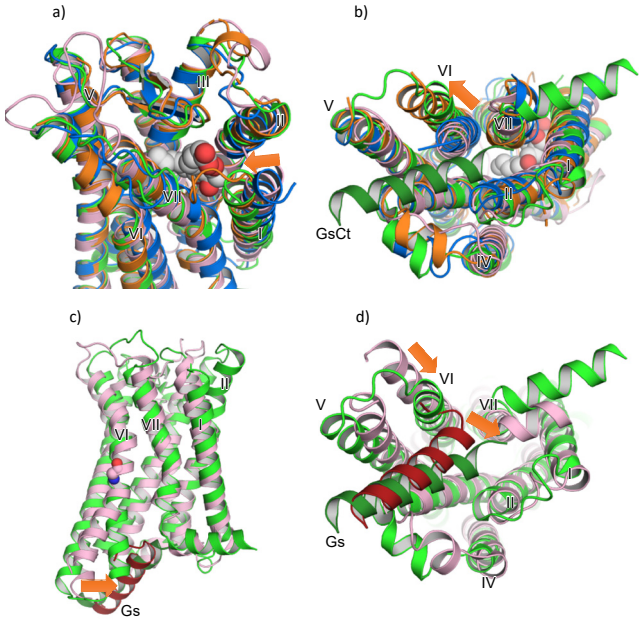


図 3.　EP4-Gs 複合体とその他 GPCR との比較

a、b）　不活性型 EP4（PDBID：5YWY）を青、TP （PDBID：5IIU）をピンク、EP3 および PGE_2（PDBID：6AK3）をオレンジの cartoon および白の球、活性型 EP4G タンパク質 C 末端（PDBID：7D7M）を緑で示した。a）は細胞外側から、b）は細胞内側から見た図を示す。

c、d）　活性型 EP4 と G タンパク質 C 末端 （PDBID：7D7M）を緑、活性型 A_{2A} と G タンパク質 C 末端（PDBID：6GDG）をピンクと赤で示した。c）は細胞膜側面から、d）は細胞内側から見た図を示す。c）の球表示は A_{2A} の $G240^{6.42}$ を示す。

考　察

本研究ではハイスループットなコンストラクトのスクリーニングを実現するため、酵母発現系を用いて一次スクリーニングを実施した。酵母発現系はその簡便性がメリットであるが、一方で昆虫細胞に比べ発現量が乏しく判断が難しい場合もある。今回の場合、DP1 については酵母発現の結果をもとに除外したが、昆虫細胞ではまた異なった結果が得られた可能性もある。一方、EP2 については酵母においても、発現はそれほど良好ではなかったが、昆虫細胞でも同様の結果が再現された。

EP1 受容体については十分な発現量および熱安定性が得られたものの、回折データを得るのに十分な結晶を得ることは出来なかった。そのため今後も引き続き、融合タンパク質の種類や挿入位置を変更するなどの検討が必要である。また近年では CryoEM 単粒子解析も有力な解析手段となっており、検討の価値があると考えられる。

以前に報告した EP3 の結晶構造はアゴニストを結合しており、アンタゴニストを結合した EP4 と比べて TM1 が変位し、リガンドポケットを完全に覆っていた。しかしながら、この構造変位はアゴニスト結合による活性化を反映したものなのか、EP3 自体が持つ性質なのかは不明であった。今回決定したアゴニスト結合型 EP4 でも EP3 同様、TM1 の変位が見られており、受容体活性化に伴う構造変化であることが強く示唆された。

一般的に Gs を結合する GPCR では他の Gi や Gq 結合 GPCR に比べて TM6 の開き方が大きいことが知られている［7］。これには TM6 中央部の $Gly^{6.42}$ の存在が重要と考えられているが、Gs に共役する PG 受容体では Gly 残基は存在しない。これを反映してか Gs 結合 EP4 の TM6 の開き方は、他の Gs 結合 GPCR より小さく Gi や Gq 結合 GPCR と同程度であった。さらに、これまでの報告では全て G タンパク質の C 末端は TM6 方向へとフックした構造を取っていたが、本構造では TM1 と TM7 の間方向へと伸びた構造を取っており、従来とは全く異なる結合様式が存在する可能性が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学研究室の野島慎五（博士課程学生）、木村香菜子研究員、野村紀通准教授、岩田想教授、同大学ウイルス・再生医科学研究所ウイルス感染研究部門微細構造ウイルス学研究室の藤田陽子（博士課程学生）、野田岳志教授、理化学研究所放射光科学研究センター利用システム開発研究部門の重松秀樹研究員、山本雅貴部門長、関西医科大学医化学研究室の寿野良二講師、小林拓也教授である。

文　献

1） Wang L, Yao D, Deepak RNVK, Liu H, Xiao Q, Fan H, Gong W, Wei Z, Zhang C. Structures of the Human PGD_2 Receptor CRTH2 Reveal Novel Mechanisms for Ligand Recognition. Mol Cell. 2018 Oct 4;72(1):48-59.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.009. Epub 2018 Sep 13. PMID: 30220562; PMCID: PMC6223628.

2） Toyoda Y, Morimoto K, Suno R, Horita S, Yamashita K, Hirata K, Sekiguchi Y, Yasuda S, Shiroishi M, Shimizu T, Urushibata Y, Kajiwara Y, Inazumi T, Hotta Y, Asada H, Nakane T, Shiimura Y, Nakagita T, Tsuge K, Yoshida S, Kuribara T, Hosoya T, Sugimoto Y, Nomura N, Sato M, Hirokawa T, Kinoshita M, Murata T, Takayama K, Yamamoto M, Narumiya S, Iwata S, Kobayashi T. Ligand binding to human prostaglandin E receptor EP_4 at the lipid-bilayer interface. Nat Chem Biol. 2019 Jan;15(1):18-26. doi: 10.1038/s41589-018-0131-3. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30510193.

3） Fan H, Chen S, Yuan X, Han S, Zhang H, Xia W, Xu Y, Zhao Q, Wu B. Structural basis for ligand recognition of the human thromboxane A_2 receptor. Nat Chem Biol. 2019 Jan;15(1):27-33. doi: 10.1038/s41589-018-0170-9. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30510189.

4) Morimoto K, Suno R, Hotta Y, Yamashita K, Hirata K, Yamamoto M, Narumiya S, Iwata S, Kobayashi T. Crystal structure of the endogenous agonist-bound prostanoid receptor EP3. Nat Chem Biol. 2019 Jan;15(1):8-10. doi: 10.1038/s41589-018-0171-8. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30510192.

5) Audet M, White KL, Breton B, Zarzycka B, Han GW, Lu Y, Gati C, Batyuk A, Popov P, Velasquez J, Manahan D, Hu H, Weierstall U, Liu W, Shui W, Katritch V, Cherezov V, Hanson MA, Stevens RC. Crystal structure of misoprostol bound to the labor inducer prostaglandin E_2 receptor. Nat Chem Biol. 2019 Jan;15(1):11-17. doi: 10.1038/s41589-018-0160-y. Epub 2018 Dec 3. Erratum in: Nat Chem Biol. 2019 Feb;15(2):206. PMID: 30510194; PMCID: PMC6289721.

6) Nojima S, Fujita Y, Kimura KT, Nomura N, Suno R, Morimoto K, Yamamoto M, Noda T, Iwata S, Shigematsu H, Kobayashi T. Cryo-EM Structure of the Prostaglandin E Receptor EP4 Coupled to G Protein. Structure. 2021 Mar 4;29(3):252-260.e6. doi: 10.1016/j.str.2020.11.007. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33264604.

7) Shiroishi M, Tsujimoto H, Makyio H, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shimamura T, Murata T, Nomura N, Haga T, Iwata S, Kobayashi T. Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in Saccharomyces cerevisiae. Microb Cell Fact. 2012 Jun 13;11:78. doi: 10.1186/1475-2859-11-78. PMID: 22694812; PMCID: PMC3495400.

8) Yasuda S, Kajiwara Y, Toyoda Y, Morimoto K, Suno R, Iwata S, Kobayashi T, Murata T, Kinoshita M. Hot-Spot Residues to be Mutated Common in G Protein-Coupled Receptors of Class A: Identification of Thermostabilizing Mutations Followed by Determination of Three-Dimensional Structures for Two Example Receptors. J Phys Chem B. 2017 Jul 6;121(26):6341-6350. doi: 10.1021/acs.jpcb.7b02997. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28644022.

9) García-Nafría J, Tate CG. Cryo-EM structures of GPCRs coupled to G_s, G_i and G_o. Mol Cell Endocrinol. 2019 May 15;488:1-13. doi: 10.1016/j.mce.2019.02.006. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30930094.