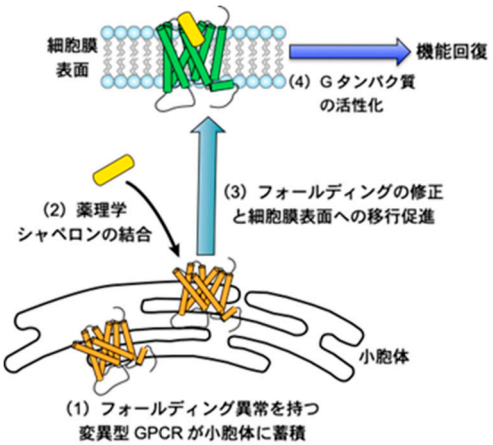
30　希少腎疾患治療に向けた膜受容体の構造解析及び創薬	加藤　英明

【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 は腎臓の集合菅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、薬理学的シャペロン（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 以上もの 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 における薬理学的シャペロン（PC）の作用機序



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

東京大学 大学院総合文化研究科 先進科学研究機構

Key words：GPCR，クライオ電子顕微鏡，バソプレシン受容体，先天性腎性尿崩症，薬理学的シャペロン

緒　言

G タンパク質共役型受容体（GPCR）はヒトにおいて最大のファミリーを形成する 7 回膜貫通タンパク質であり、その種類は 800 を超える。それぞれの GPCR は複数の細胞外刺激によって活性化されるため、総体としての GPCR は事実上あらゆる細胞外刺激を受容し、その情報を細胞内へと伝えることが可能となっている。GPCR はその生理的重要性もさることながら、ミスフォールドが多いタンパク質としても知られている。1 アミノ酸の軽度な変異によっても容易にフォールディング異常タンパク質が小胞体（ER）に蓄積し、機能の場である細胞膜表面に到達できずに、様々な疾患の発現に繋がる。特筆すべきはこうした軽微なフォールディング異常タンパク質は、その局在に異常を持ち ER に留まりながらも、活性を保持している点である。ER に局在したフォールディング異常タンパク質に結合し、そのフォールディングを助けることで正しい局在化を促す低分子は、従来のタンパク質型の分子シャペロンと区別して薬理学シャペロン（pharmacological chaperone：PC）と呼ばれ、その臨床的意義が注目されている（図 1）。本研究では、そうしたフォールディング異常と疾患の関係に対する理解、そして PC 開発が最も進んでいる GPCR である 2 型バソプレシン受容体（AVPR2）に着目する［1］。

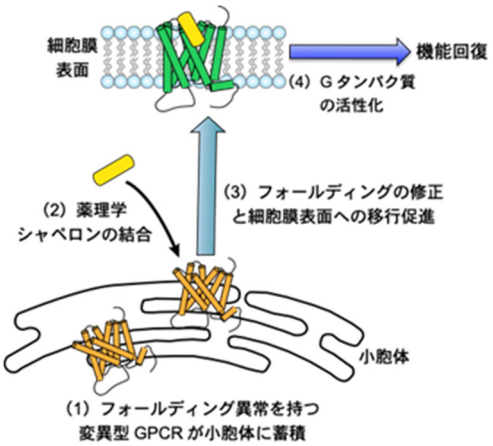


図 1. GPCR における薬理学的シャペロン（PC）の作用機序

AVPR2 は腎臓の集合菅細胞の細胞膜表面に発現する GPCR であり、抗利尿ホルモンであるバソプレシン（AVP）によって活性化される。AVP を受容した AVPR2 は、G 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 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、機能喪失に至る。その結果、ヒトは腎性尿崩症（Nephrogenic Diabetes Insipidus：NDI）と呼ばれる、1 日 15 リットルにも及ぶ多飲多尿を強いられる腎・泌尿器系疾患に陥る。

この希少腎疾患の治療薬として着目されているのが、tolvaptan、mozavaptan といった AVPR2 の脂溶性 PC である。これら PC は細胞膜を透過後、変異型 AVPR2 に結合してそのフォールディングを修正し、局在を正常化した後 AVPR2 から乖離する。そこに内在の AVP が結合し、G タンパク質シグナルが活性化されるというメカニズムである。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 以上もの 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。

そうした状況下で報告者は、GPCR 研究によりノーベル賞を受賞した Brian Kobilka 研究室にて 5 年間培った経験や、GPCR を含む膜タンパク質の構造機能解析を通じて蓄えたノウハウを生かし［2, 3］、「tolvaptan のような PC 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 のような PC 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」という問題を解明することを考えた。これは、実現すれば AVPR2 をはじめとする GPCR のアミノ酸変異、フォールディング異常、膜局在化の分子機構を軒並み明らかにするばかりか、PC の作用機序をつまびらかにし、NDI に対する初の治療法開発へと繋がる可能性をも秘めていると考えられる。

方法および結果

本研究では、APVR2 による tolvaptan 認識の分子機構、tolvaptan の PC としての作用機序、そして tolvaptan によりレスキュー可能な変異と不可能な変異の本質的差異を解明するため、プロジェクトを以下の 2 つの課題に分割した（図 2）。助成期間中には主に 1 つ目の課題において進捗が見られたため、そちらを中心に記述する。

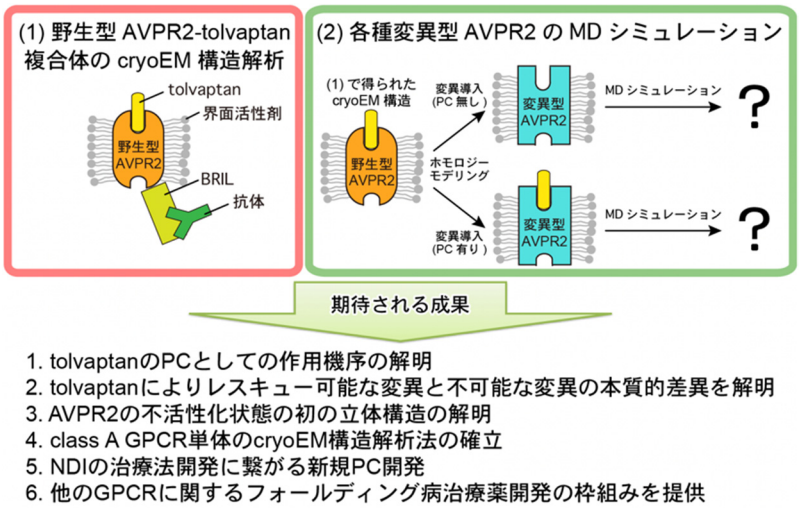


図 2. 本研究の概略

1. ヒト AVPR2-tolvaptan 複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析

AVPR2 による tolvaptan の認識機構を明らかにするため、まずヒト AVPR2-tolvaptan 複合体のクライオ電子顕微鏡（cryoEM）構造解析を試みた。はじめに、報告者は哺乳類細胞発現用ベクターにヒト AVPR2 の全長遺伝子を cloning し、小スケールで発現チェックを行ったが、安定なタンパク質を得ることはできなかった。そこで、遺伝子の N 末端、C 末端の truncates を各種作製し、さらにタンパク質発現の温度や発現後の細胞回収条件などの検討を行ったところ、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて良好な単分散性を示すコンストラクトを見出すことに成功した。

AVPR2 は 1992 年にラットの腎臓よりクローニングされた GPCR だが［4］、30 年に渡り多くの構造生物学者がその X 線結晶構造解析を挑戦してきたにもかかわらず、アンタゴニスト結合型の構造解析には未だ成功していない。そこで報告者は X 線結晶構造解析ではなく、近年技術進歩がめざましいクライオ電子顕微鏡（cryo-EM）を用いてその構造

解析を試みることにした。Cryo-EM を用いてタンパク質の構造解析を行うためにはその分子量が重要となるが、AVPR2 は約 40 kDa のタンパク質であり、分子量の小ささが問題となりうる。そこで報告書は、近年 GPCR の細胞内第 3 ループ（ICL3）に BRIL と呼ばれる頑強なタンパク質を融合させ、これに更に抗体を結合させることで標的タンパク質の分子量を増加させ、その構造解析に成功した論文が報告されたことに着目した［5］。この論文で著者たちは BRIL と GPCR の繋ぎ目を強固なものとすることが重要であることを指摘しており、そのために GPCR の TM5 と BRIL の N 末ヘリックス、BRIL の C 末ヘリックスと GPCR の TM6 が continuous なαヘリックスとなるようなコンストラクトを得るため、多数のコンストラクトを実験的に検討・評価していた。しかし、コンストラクトの評価はタンパク質を大スケールで最終精製し、cryo-EM での画像（micrograph）撮影をするまで行うことができず、スループットが非常に低いものとなっていた。

そこで報告者は昨年報告されたタンパク質の高精度構造予測ソフトである Alphafold2 に着目し［6］、GPCR と BRIL のキメラタンパク質構造を Alphafold2 で予測させ、予測構造において TM5 と TM6 がそれぞれ BRIL の N 末ヘリックス、C 末ヘリックスと continuous なヘリックスを形成するコンストラクトを *in silico* で迅速にスクリーニングすることを考えた（図 3）。そこで報告者は、GPCR の配列から数百のキメラコンストラクトを自動で作製し、Alphafold2 による予測構造を自動で精製し、さらには TM5 と TM6 が BRIL と continuous なヘリックスを形成するコンストラクトを自動で判定してくれる python ベースの script を作ることで、GPCR の配列を input として入力すると、output として cryo-EM 構造解析に適したコンストラクトを返してくれるパイプラインを作成した。作成したパイプラインを用いて実際に 400 のキメラコンストラクトを *in silico* で生成したところ、6 種のコンストラクトを得ることができたため、これら 6 種のコンストラクトを実際に哺乳類発現用 vector に cloning し、HEK293S 細胞でこれを小スケールにて発現精製させ、蛍光ゲル濾過クロマトグラフィー法により評価した。その結果、図 4 に示すように 3 種のコンストラクトについて比較的良好な蛍光ゲル濾過クロマトグラムを得ることができた。そこで次に、これらのコンストラクトにおいて実際に AVPR2 と BRIL 間のリンカーが強固なα-ヘリックス構造をとっているか検証するため、抗体を用いた以下の assay を考案・実践した。

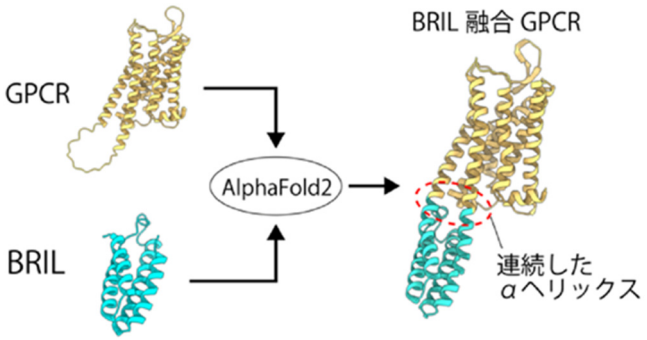


図 3. Alphafold2 を用いた cryo-EM 構造解析に適したコンストラクトの *in silico* screening

先行研究から抗 BRIL 抗体としては SRP2070 抗体［7］、BAG2 抗体［5］の 2 種が報告されており、これらは BRIL と GPCR との間のリンカーの柔軟性が高いと同時に結合できる一方、リンカーの柔軟性が低いと TM5、6 の傾きの影響で片方の抗体が界面活性剤ミセルと立体障害（疎水性相互作用ミスマッチ）が起こることが予想されていた。そこで、この 2 種の抗体を用いることで、上記の 3 コンストラクトにおいて BRIL と GPCR のつなぎ目リンカーがデザイン通り continuous なαヘリックス構造をとっているか簡易的に検証できるだろうと考えた。まず、Expi293、ExpiCHO 細胞を用いて BAG2 抗体、SRP2070 抗体をそれぞれ分泌タンパク質として発現させたのち、Ni^{2+}アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによってこれを精製した。次に、ポジティブコントロール（no design）としてリンカーをデザインせず柔軟性の高い ICL3 にそのまま BRIL を繋げたコンストラクト、ネガティブコントロールとして BRIL を挿入していないコンストラクト（wtAVPR2）を用意し、これを先ほどの 3 コンストラクトともに

HEK293S 細胞にて小スケールで発現させたのち、Ni^{2+}アフィニティークロマトグラフィー法により簡易精製を行なった。簡易精製後のサンプルに 2 種の抗体を添加しそれぞれ蛍光ゲル濾過クロマトグラフィー法によりこれを評価したところ、デザインした 3 コンストラクトはいずれも SRP2070 抗体とは結合するが BAG2 抗体とは結合しないことが判明した（図 5）。これは、*in silico* によりデザインしたコンストラクトでは実際に BRIL の GPCR に対する相対的位置関係が強固に固定されていることを意味しており、cryo-EM 構造解析に適したサンプルを *in silico* で迅速にスクリーニングできたことを意味していた。

2. 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実験による理論検証

Tolvaptan による PC 効果の作用機序を解明するため、方法および結果 1 で得られた野生型 AVPR2-tolvaptan 複合体の立体構造をもとに、以下の 3 種の分子動力学（MD）シミュレーションを行うことを考えた。MD シミュレーションの系の構築については、報告者がこれまでの膜タンパク質の解析に用いていた手法と同様の手法を用いることを想定していた［2，3］。

（A）既に tolvaptan によるレスキューが報告されているフォールディング変異を、*in silico* にて方法および結果 1 で得られた AVPR2 に導入し、tolvaptan 存在下、非存在下で MD シミュレーションを行う。これにより、AVPR2 変異がどのようにフォールディング異常を引き起こすのか、また tolvaptan がどのようにそのフォールディング異常を正しているのか、その分子機構を解明することができると期待される。

（B）tolvaptan によるレスキューが不可能と報告されているフォールディング変異を、*in silico* にて方法および結果 1 で得られた AVPR2 に導入し、tolvaptan 存在下、非存在下でシミュレーションを行う。これにより、tolvaptan によりレスキュー可能な変異と不可能な変異にどのような本質的差異があるか解明する。

（C）tolvaptan によるレスキュー効果の検証が行われていないフォールディング変異を、*in silico* にて方法および結果 1 で得られた AVPR2 に導入し、tolvaptan 存在下でシミュレーションを行う。これにより、tolvaptan によりレスキュー可能な新たなフォールディング変異候補を迅速に発見できると期待される。

結果および考察

1. *In silico* スクリーニングによりヒットした 6 種のコンストラクトの小スケールにおける蛍光ゲル濾過クロマトグラム

In silico でのスクリーニングではあくまで TM5、6 と BRIL のつなぎ目部分の rigidity のみを評価しており、タンパク質の発現量や均一性は実験的に確かめる必要がある。図 4 の結果から、6 種のコンストラクトのうち 3 種のコンストラクト（construct 3、5、6）において、AVPR2 が比較的良好な単分散性と発現量を示すことがわかった。特にコンストラクト 3 は BRIL 挿入前の AVPR2 と同様の安定性を示しており、良い性状を示すことがわかった。

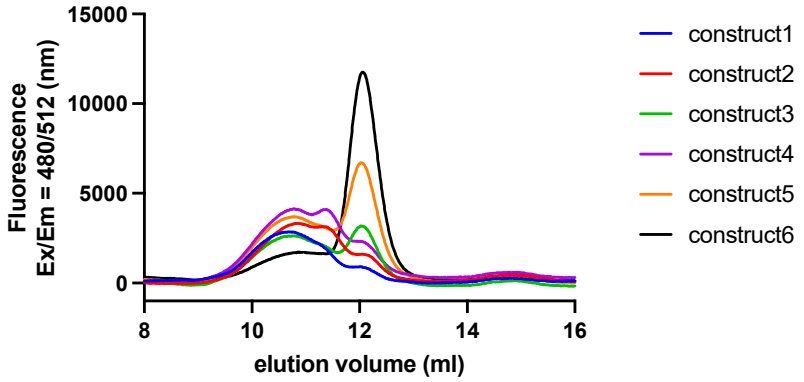


図 4. Alphafold2 によりデザインした 6 種のコンストラクトのスクリーニング結果

2. 3種のコンストラクトの小スケールにおける抗体結合 assay

Alphafold2 により作製したキメラタンパク質のモデルが正しければ、SRP2070 抗体は BRIL に結合する一方、BAG2 抗体は界面活性剤ミセルとの立体障害（疎水性相互作用ミスマッチ）により結合できないことが予測された。図 5 に示す蛍光ゲル濾過クロマトグラムは予想通りの結果を示しており、本来であれば数十から数百のコンストラクトを実験的に評価する必要があったコンストラクトの最適化ステップを大幅に効率化することに成功したといえる。今後はこの 3 コンストラクトについて、性状の良いコンストラクト 6＞5＞3 を順に精製し、SRP2070 との複合体状態で micrograph の撮影を行う。良好な micrograph が撮影できた際には、RELION や cryoSPARC といったソフトウェアを用いて構造決定を行い、AVPR2 による tolvaptan の認識基盤を解明する。また、本実験では tolvaptan を利用しているが、同様のコンストラクトを用いて他の PC や、PC としては働かないリガンドとの複合体についても既に小スケールでの発現精製に成功していることから、AVPR2 において知られる多様なリガンドのうち、PC として働くための必要十分条件を今後明らかにできる可能性は高いと期待される。また、本手法はあらゆる GPCR において適用可能であることから、今後本手法を用いて様々な GPCR の単体構造解析を迅速に行うことが可能になるのではないかと期待される。

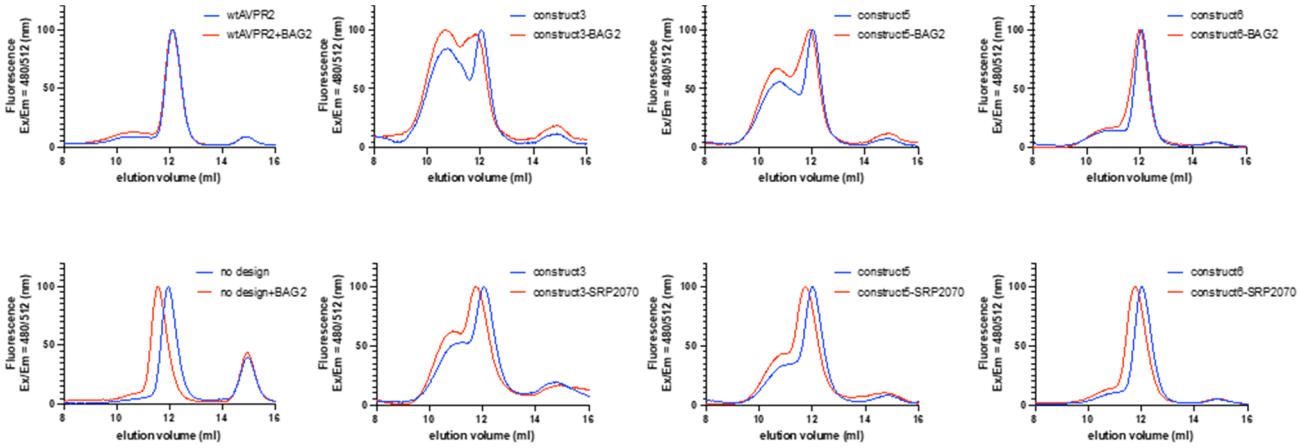


図 5. 結果および考察 1 において良好な結果を示した 3 コンストラクトにおける抗体結合 assay

共同研究者・謝辞

本研究では、東京大学大学院医学系研究科の槙田紀子博士より tolvaptan をはじめとするいくつかの化合物を譲渡いただいている。この場を借りてお礼申し上げたい。

文　献

1） Mouillac B, Mendre C. Vasopressin receptors and pharmacological chaperones: from functional rescue to promising therapeutic strategies. Pharmacol Res. 2014 May;83:74-8. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24239889 DOI: 10.1016/j.phrs.2013.10.007.

2） Kato HE, Kim YS, Paggi JM, Evans KE, Allen WE, Richardson C, Inoue K, Ito S, Ramakrishnan C, Fenno LE, Yamashita K, Hilger D, Lee SY, Berndt A, Shen K, Kandori H, Dror RO, Kobilka BK, Deisseroth K. Structural mechanisms of selectivity and gating in anion channelrhodopsins. Nature. 2018 Sep;561(7723):349-354. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30158697 DOI: 10.1038/s41586-018-0504-5.

3) Kato HE, Zhang Y, Hu H, Suomivuori CM, Kadji FMN, Aoki J, Krishna Kumar K, Fonseca R, Hilger D, Huang W, Latorraca NR, Inoue A, Dror RO, Kobilka BK, Skiniotis G. Conformational transitions of a neurotensin receptor 1-G_{i1} complex. Nature. 2019 Aug;572(7767):80-85. Epub 2019 Jun 26. PMID: 31243364 DOI: 10.1038/s41586-019-1337-6.

4) Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Konig M, Morel A, Brownstein MJ. Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. Nature. 1992 May 28;357(6376):336-9. PMID: 1534150 DOI: 10.1038/357336a0.

5) Tsutsumi N, Mukherjee S, Waghray D, Janda CY, Jude KM, Miao Y, Burg JS, Aduri NG, Kossiakoff AA, Gati C, Garcia KC. Structure of human Frizzled5 by fiducial-assisted cryo-EM supports a heterodimeric mechanism of canonical Wnt signaling. Elife. 2020 Aug 7;9:e58464. PMID: 32762848 DOI: 10.7554/eLife.58464.

6) Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature. 2021 Aug;596(7873):583-589. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34265844 DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.

7) Miyagi H, Asada H, Suzuki M, Takahashi Y, Yasunaga M, Suno C, Iwata S, Saito JI. The discovery of a new antibody for BRIL-fused GPCR structure determination. Sci Rep. 2020 Jul 15;10(1):11669. PMID: 32669569 DOI: 10.1038/s41598-020-68355-x.