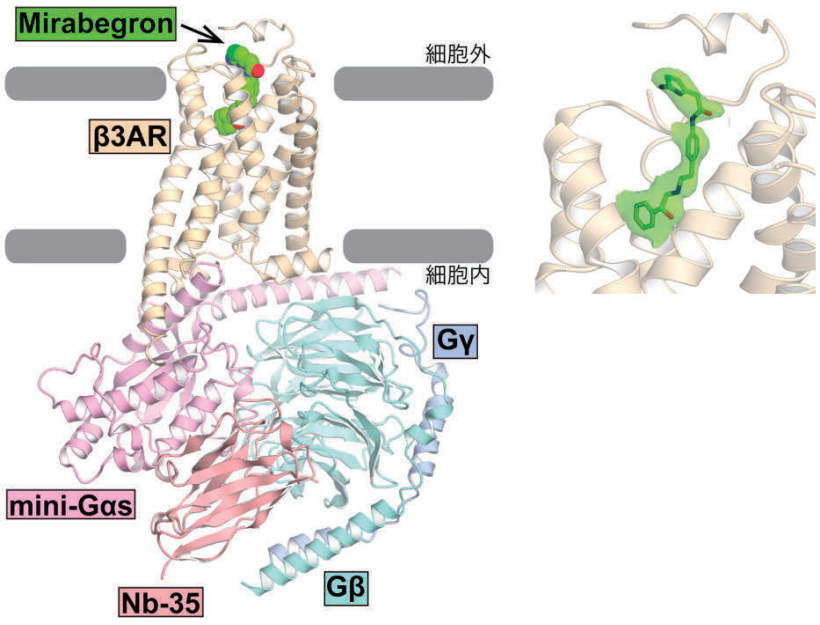
218　β3アドレナリン受容体の単粒子解析	志甫谷　渉

【目的】アドレナリンは闘争・逃走反応を引き起こすホルモンで、心血管系に大きく作用する。アドレナリンはアドレナリン受容体（AR）に結合して働く。この受容体はαARとβARに分かれ、βARはさらに3つのサブタイプがある。これらは心臓や平滑筋など異なる生理的役割を担っている。β3ARは脂肪組織の脂肪分解や膀胱の平滑筋の弛緩に関与し、肥満や糖尿病との関連もあるが、種差があるため肥満や糖尿病の治療薬としては承認されていない。しかし、選択的β3ARアゴニストは過活動膀胱の治療薬として研究されている。ミラベグロンは過活動膀胱の治療薬として初めて承認されたβ3ARアゴニストで、副作用が少ない。ビベグロンも日本で過活動膀胱の治療薬として承認され、過敏性腸症候群の第2相試験中である。しかし、これらの薬剤は臨床用量でβ1ARも刺激するため、心拍数や血圧の上昇を伴う副作用があり、β3ARの選択性を向上させる余地がある。最近のβARの構造解析の進展により、βARの薬理学と活性化機構が明らかになっている。しかし、β3ARの構造情報がないため、その選択性のメカニズムはほとんど分かっていない。本研究では、ミラベグロンによって活性化されたβ3ARとヘテロ三量体Gsタンパク質との複合体のクライオ電子顕微鏡構造を決定し、その結合特性や活性化、選択性の構造的基盤を報告する。こうした構造情報は、新たな治療薬開発に役立つ情報を提供する。

【方法】クライオ電子顕微鏡法を用いて、ミラベグロン結合型のβ3AR–Gs複合体構造を決定した。

【結果】β3ARはクラスA GPCRの典型的な構造を持ち、ミラベグロンは細胞外側の結合ポケットに結合していた。ミラベグロンの結合部位は内在性リガンドが結合するオルソステリックサイトと、細胞外入口付近のエキソサイトの2つの領域に分けることができる。オルソステリックサイトでは、ミラベグロンはAsp3.32およびAsn7.39という残基と水素結合を形成し、他のβARリガンドと同様の結合様式を示していた。一方で、Ser5.42やSer5.46との水素結合は観察されず、オルソステリックサイトでのミラベグロンの結合は比較的弱いことが明らかになった。エキソサイトでは、ミラベグロンは細胞外ループ2、3、および膜貫通ヘリックス7といった部分と相互作用していた。これらの相互作用がオルソステリックサイトでの弱い結合を補完し、ミラベグロンがβ3ARに対して高い結合能を示すことが明らかになった。これらの残基はβARsサブタイプ間で保存性が低く、β3AR選択的なミラベグロンの結合に関与していると考えられる。

β3AR–Gsタンパク質複合体構造



218. β3アドレナリン受容体の単粒子解析

志甫谷　渉

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻 構造生命科学研究室

Key words：アドレナリン，G 蛋白質共役受容体，クライオ電子顕微鏡法

緒　言

アドレナリンは闘争・逃走反応を引き起こすホルモンで、心血管系に大きく作用する。アドレナリンはアドレナリン受容体（AR）に結合して働く。この受容体はαAR とβAR に分かれ、βAR はさらに 3 つのサブタイプがある。これらは心臓や平滑筋など異なる生理的役割を担っている。β3AR は脂肪組織の脂肪分解や膀胱の平滑筋の弛緩に関与し、肥満や糖尿病との関連もあるが、種差があるため肥満や糖尿病の治療薬としては承認されていない。しかし、選択的β3AR アゴニストは過活動膀胱の治療薬として研究されている。

ミラベグロンは過活動膀胱の治療薬として初めて承認されたβ3AR アゴニストで、副作用が少ない［1]。ビベグロンも日本で過活動膀胱の治療薬として承認され、過敏性腸症候群の第 2 相試験中である。しかし、これらの薬剤は臨床用量でβ1AR も刺激するため、心拍数や血圧の上昇を伴う副作用があり、β3AR の選択性を向上させる余地がある。

最近のβAR の構造解析の進展により、βAR の薬理学と活性化機構が明らかになっている。しかし、β3AR の構造情報がないため、その選択性のメカニズムはほとんど分かっていない。本研究では、ミラベグロンによって活性化されたβ3AR とヘテロ三量体 Gs タンパク質との複合体のクライオ電子顕微鏡構造を決定し、その結合特性や活性化、選択性の構造的基盤を報告する［2]。こうした構造情報は、新たな治療薬開発に役立つ情報を提供する。

方　法

1. 構造解析最適な受容体の選抜

ヒトβ3AR の精製を試みたが、発現量が少ないため、最初は失敗した。そこで、構造解析のために、様々な脊椎動物のβ3AR タンパク質を蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィーでスクリーニングし、高発現で単分散のピークプロファイルを持つ有望な候補として、イヌのβ3AR を同定した。イヌとヒトのβ3AR は、83%の配列同一性と 87%の配列類似性を有している。*β2AR* 欠損 HEK293 細胞を用いた NanoBiT-G- protein dissociation assay により、ミラベグロンおよびイソプロテレノール（アドレナリンアナログ）に対するヒトおよびイヌのβ3AR の薬理特性を評価した。イヌβ3AR に対するミラベグロンおよびイソプロテレノールの EC50 値はそれぞれ 0.45 nM および 2.8 nM であり、ヒトβ3AR に対するそれは 4.6 nM および 64 nM である。イヌのβ3AR に対するリガンドの効力が明らかに向上しているのは、その発現量が増加していることに一部起因している。

2. クライオ電子顕微鏡法を用いた単粒子解析

発現および精製効率を高めるため、イヌβ3AR の C 末端 380～405 残基を除去した。この切断は Gs カップリング活性を変化させなかった。G 蛋白質との複合体の構造解析に際して、構造研究用に開発され安定型 G タンパク質である miniGs タンパク質を用いた。哺乳細胞発現系を用いてミラベグロン結合状態のβ3AR を発現・精製し、miniGs ヘテロ三量体（miniGs、β1、γ2）および GPCR–Gs 複合体を安定化するナノボディ Nb35 と複合

形成を行った。β3AR–mini-Gs–Nb35 複合体の全体構造を、3.2 Å 分解能で決定した。得られた密度マップにより、ミラベグロンを含むβ3AR シグナル伝達複合体全体の分子構造を構築することができた。

結果および考察

1. β3AR–Gs タンパク質複合体の全体構造

β3AR–Gs タンパク質複合体の全体構造を図 1 に示す。β3AR は 7 回膜貫通ヘリックス（TM1-7）と TM7 に続くヘリックス 8（H8）からなり、典型的なクラス A GPCR の構造を有していた。細胞外ループ（ECL）2 は 2 ターンのヘリックスを形成していたが。ミラベグロンは、β3AR の細胞外側に開いた結合ポケットに結合していた。改変型三量体 Gs タンパク質は、β2AR–三量体 Gs タンパク質複合体の結晶構造と似た配向でβ3AR と相互作用していた。また、Nb-35 は mini-Gαs–Gβγ 界面に位置しており、先行研究結果と合致する構造であった。

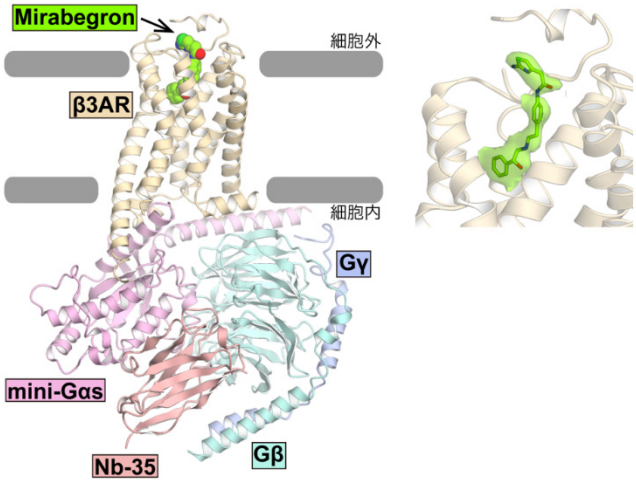


図 1.　β3AR-Gs タンパク質複合体構造
複合体全体構造と観測されたミラベグロンに相当する密度マップ。

2. ミラベグロンの結合様式

β3AR に対するミラベグロンの結合部位は、内在性リガンドの結合するオルソステリックサイトと、細胞外側のエキソサイトの 2 つの領域に分けられる。

まず、オルソステリックサイトについて詳細に考察する。βARs のオルソステリックサイトはβARs 間で高度に保存されており、β1AR やβ2AR に対してはカテコールアミン類が同様の結合様式で相互作用し、受容体を活性化することが示されている 38,39。そこで、ミラベグロン結合によるβ3AR 活性化機構について考察するため、ミラベグロン結合型β3AR と内在性リガンドであるアドレナリン結合型β2AR を比較した（図 2）。β1AR やβ2AR においては、Asp3.32 および Asn7.39 はリガンド結合に重要であることが示されており、実際に、アドレナリン結合型β2AR ではアドレナリンの水酸基およびアミノ基と水素結合を形成している。この Asp3.32 および Asn7.39 はβ3AR においてミラベグロンの水酸基およびアミノ基と同様の水素結合を形成しており、他のβARs 作動薬と同様の結合様式を示していた。

また、先行研究から、受容体の活性化には、Ser5.42 や Ser5.46 と作動薬との水素結合形成による細胞外側の TM5 の内側への動きが重要であることが示唆されていたが、本構造では、ミラベグロンにおいてカテコールにあたる部分はフェノールに置換され、水酸基を持たないため、この水素結合は観察されなかった。このことから、β3AR においては、Ser5.42 や Ser5.46 がミラベグロンによる受容体活性化に重要ではなく、先述した Asp3.32 および Asn7.39 が受容体活性化に重要であることが示唆された。また、オルソステリックサイトにおけるミラベグロンの結合は、アドレナリンなどのリガンドと比較して弱いことが明らかになった。

一方でエキソサイトにおいては、ミラベグロンはβ3AR の ECL2 の主鎖と水素結合を形成しており、さらに ECL3 や TM7 に存在する側鎖と分子間相互作用していた（図 3）。こうした相互作用は、オルソステリックサイトでの弱い結合様式を補完しており、ミラベグロンがβ3AR に対して nM オーダーの高い結合能を示すことを説明できる。これらの周辺残基は、βARs サブタイプ間で保存性が低く、β3AR 選択的なミラベグロンの結合に関与していると考えられる。

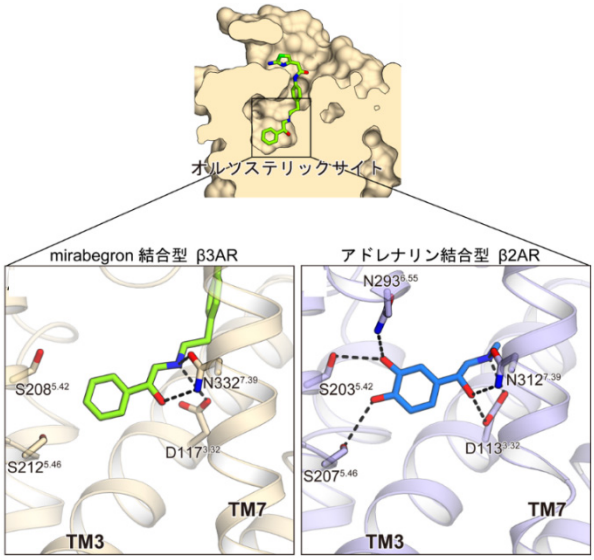


図 2. オルソステリックサイトの比較
ミラベグロン結合型β3AR とアドレナリン結合型β2AR（PDB：4LDO）において、作動薬の結合に重要な残基を表示している。黒の点線は水素結合をあらわす。

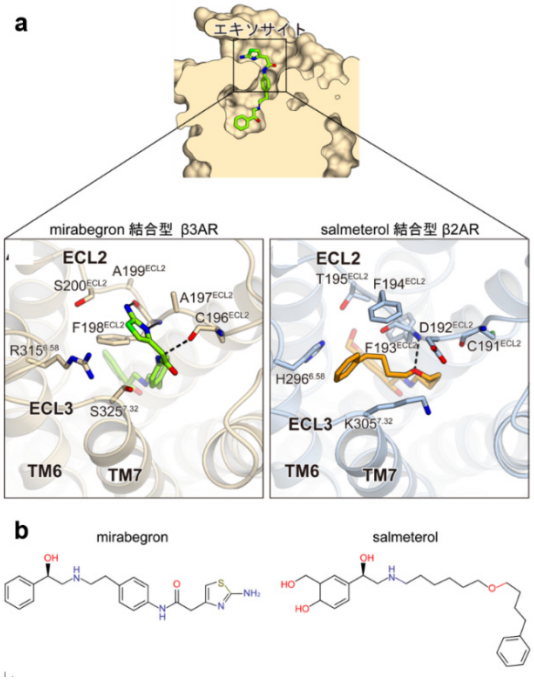


図 3. エキソサイトの比較
a） ミラベグロン結合型β3AR とサルメテロール結合型β2AR（PDB：6MXT）において、作動薬の結合に重要な残基を表示している。黒の点線は水素結合をあらわす。
b） ミラベグロンおよびサルメテロールの構造式。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院理学系研究科構造生命科学研究室の名切千恵彩元大学院生、濡木理教授、および東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野の井上飛鳥教授である。

文　献

1） Chapple CR, Cardozo L, Nitti VW, Siddiqui E, Michel MC. Mirabegron in overactive bladder: a review of efficacy, safety, and tolerability. Neurourol Urodyn. 2014 Jan;33(1):17-30. doi: 10.1002/nau.22505. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24127366

2） Nagiri C, Kobayashi K, Tomita A, Kato M, Kobayashi K, Yamashita K, Nishizawa T, Inoue A, Shihoya W, Nureki O. Cryo-EM structure of the β3-adrenergic receptor reveals the molecular basis of subtype selectivity. Mol Cell. 2021 Aug 5;81(15):3205-3215.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2021.06.024. Epub 2021 Jul 26. PMID: 34314699