

領域融合レビュー, 2, e003 (2013)  
DOI: 10.7875/leading.author.2.e003  
2013年3月11日公開

## 立体構造が明らかにした G タンパク質共役受容体の刺激受容のしくみ

### **A common mechanism of signal transduction of G-protein-coupled receptors revealed by their three-dimensional structures**

天野剛志・廣明秀一  
Takeshi Tenno & Hidekazu Hiroaki

名古屋大学大学院創薬科学研究科 構造分子薬理学分野

#### 要 約

2012 年のノーベル化学賞は、G タンパク質共役受容体 (GPCR) に関する研究について、米国 Duke 大学の Lefkowitz 教授と米国 Stanford 大学の Kobilka 教授に授与された。GPCR は細胞の外の刺激を内部に伝える刺激受容とシグナル伝達の鍵となるタンパク質であり、創薬の標的としてもきわめて重要である。しかし、細胞外のシグナルを立体構造の変化を介し細胞内に伝達するという機能的な必然性のため、膜貫通ヘリックスの配向ならびに細胞内ループの周辺において、複数の立体構造のあいだでの構造のゆらぎが存在しており、その構造解析は容易ではなかった。細胞内ループに T4 リゾチームのような可溶性のタンパク質を融合することにより、高分解能での  $\beta_2$  アドレナリン受容体の構造解析はなされたが、この構造解析にいたるまでに、さまざまな研究者により多くの GPCR に普遍的に応用の可能な方法論が確立された。たとえば、脂質キューピックフェーズ法、あるいは、熱安定性をもつ点変異体を徹底活用して GPCR のコア構造の平衡状態を不活性型または活性型のいずれかにかたよらせ固定するといった手法である。これらの方法は単なる構造生物学における技術開発にとどまらず、GPCR のシグナル伝達機構の本質の理解にせまるものであった。ここでは、GPCR によるシグナル伝達の分子機構について、GPCR の立体構造解析の技術開発の進展と関連づけて解説する。

#### はじめに

古来、毒と薬は表裏一体であった。あるいは、医薬品の発見と開発の歴史は、その初期において、毒物の発見とその利用の歴史であるといい換えても過言ではない。人類は

その存続をかけて、これまでに多くの毒と出会い、その一部の有効利用に成功してきた。こうした歴史的な経緯のなかで実用化してきた医薬品の多くは、人体のホメオスタシスや神経伝達を制御する G タンパク質共役受容体 (G-protein coupled receptor : GPCR) を標的とするものである。2012 年のノーベル化学賞は、米国 Duke 大学の Robert J. Lefkowitz 教授と米国 Stanford 大学の Brian K. Kobilka 教授の、GPCR の構造と機能に関する長年の研究成果に対し授与された。ところで、不思議な話ではあるが、GPCR は分子生物学あるいは細胞生物学の観点から注目度の高いタンパク質ではない。たとえば、生命科学系の大学院において広く使用されている教科書『Essential 細胞生物学 第 3 版<sup>1)</sup>』においても、わずか十数ページが割かれているにすぎない。一方で、その薬理学的な重要性から、医学や生理学あるいは薬学の関係者からは、知る人ぞ知る重要な標的タンパク質と目されていた。また、構造生物学者からは構造解析の困難なタンパク質の代表格とされていた。今回のノーベル化学賞につながった業績は、その機能解析をつうじホメオスタシスや神経伝達などきわめて重要な生理現象に共通な機構の解明において、その端緒を開いたという点で非常に意義深い。

#### 1. GPCR の分類

まず、アミノ酸一次配列にもとづいた GPCR の分類と、それぞれの基本的な生理機能について復習しておこう。GPCR はペプチドホルモンや低分子リガンド、あるいは、光などの細胞外のシグナルを受容し、それを細胞内に伝えるのが主たる機能である。GPCR の主要な 3 つのクラスについてあげた (図 1)。この分類は、オランダ CMBI (Centre for Molecular and Biomolecular Informatics)

の公開しているデータベース GPCRDB<sup>2,3)</sup> (URL : <http://www.GPCR.org/7tm/>) を参考にしている。現時点では、ヒトのゲノムにはおよそ 1400 種の GPCR の遺伝子が存在しており、この数は全遺伝子のおよそ 5%にも及ぶ。このうち、もっとも多いのは嗅覚受容体である。これらの GPCR は、全長のアミノ酸配列の相同性にもとづき 5 つのクラスに分類されている。

ここでおもにとりあげるクラス A (ロドプシンファミリーともよばれる) は、N 末端ならびに C 末端にあるループが短い、または、そこにはほかの構造ドメインをもたないタイプである。カテコールアミンや脂溶性の低分子リガンド (多くの神経伝達物質を含む)、ペプチドホルモン (エンドセリンなど) を受容してシグナル伝達を行う。最初期に構造解析されたロドプシンは、それらのリガンドの代わりに光受容分子であるレチナールが共有結合により結合している。クラス A には、視覚や嗅覚などの感覚、神経伝達、ホメオスタシスの維持など、きわめて重要な生理機能にかかわる GPCR が数多く含まれている。

ここでは割愛するが、創薬の標的として注目されているカテゴリーとして、クラス B (セクレチン受容体ファミリーともよばれる) と、クラス C (代謝型グルタミン酸受容体ファミリーともよばれる) がある。クラス B は、N 末端に 100~300 アミノ酸残基とやや長い領域をもち、そこに約 100 アミノ酸残基のペプチドホルモン結合ドメイン (または、単に細胞外ドメインとよばれる) が存在し、セクレチンなどジスルフィド結合を含まないペプチドホルモンの刺激伝達を行う。クラス C は、N 末端に約 300 アミノ酸残基とさらに長い領域をもち、そこにアミノ酸などに対するリガンド結合ドメインが存在する。クラス C の

代表例は神経伝達に欠かせないグルタミン酸受容体である。おもしろいことに、クラス C のもつリガンド結合ドメインは真正細菌においても遺伝的に保存されており、ペリプラズムにおいてアミノ酸選択輸送などに機能するタンパク質のもつドメインと立体構造がきわめて類似している。

このほかに、Wnt シグナル伝達系においてシグナルを受容する 7 回膜貫通型受容体 Frizzled や、酵母のもつ接合因子受容体などを、それぞれ、さきに述べたものとは別の GPCR のファミリーとして分類することもあるが、現行のデータベース GPCRDB には収載されていない。

## 2. GPCR によるシグナル伝達のしくみ

GPCR にリガンドが結合すると GPCR の膜貫通ヘリックスの立体構造に変化が起り、その変化が細胞内ループに伝わって、結果的に、細胞内ループに結合したヘテロ三量体型 GTP 結合タンパク質に伝達される<sup>4)</sup>。このヘテロ三量体型 GTP 結合タンパク質 (以下、単に G タンパク質とよぶ) は、その名のとおり、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つのサブユニットからなるタンパク質であり、このうち GTP と結合するのは $\alpha$  サブユニットである。 $G$  タンパク質には複数の種類があり、その種類により細胞内に伝わるシグナルは大きく異なる。たとえば哺乳類において、 $\alpha$  サブユニット、 $\beta$  サブユニット、 $\gamma$  サブユニットの分子種は、それぞれ、約 20 種類、約 6 種類、約 12 種類が存在している。GPCR が同じでもそれに共役する G タンパク質の種類が異なるれば生理的に活性化と抑制の正反対の反応をひき起こすこともあり、そのことが GPCR に関する生理現象の複雑さの原因のひとつとなっている。G タンパク質においても、

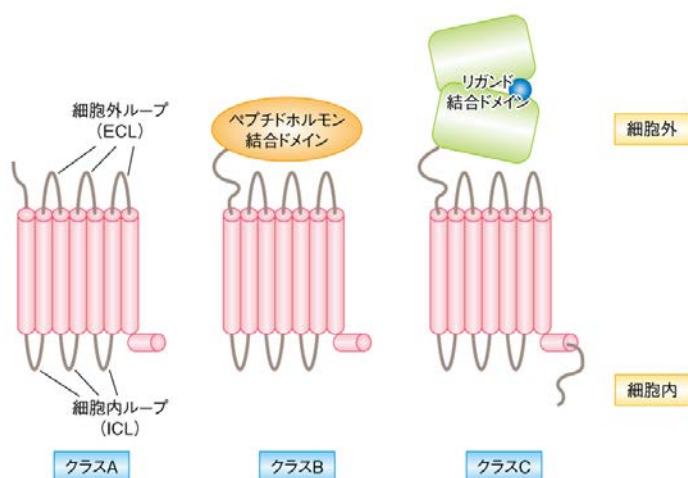


図 1 GPCR の分類とそれぞれのクラスの特徴

クラス A は N 末端ならびに C 末端にあるループが短い、または、そこにはほかの構造ドメインをもたない。クラス B の N 末端には 100~300 残基のペプチドホルモン結合ドメインが、クラス C の N 末端には 300~600 残基のリガンド結合ドメインが存在する。また、クラス C は細胞内にある C 末端ループが長い。7 本の膜貫通ヘリックスはおよそ 25~35 残基からなり、それらの膜貫通ヘリックスを連結するループは、細胞外ループ (ECL1~ECL3)、および、細胞内ループ (ICL1~ICL3) と名前がつけられている。

細胞増殖におけるシグナル伝達などで知られる低分子量 G タンパク質などと同様に, GDP 結合型が不活性型, GTP 結合型が活性型である。リガンドが GPCR に結合することによりシグナルは G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットに伝達される。すると、これまで不活性型であった G タンパク質の GDP が GTP に交換され、 $\alpha$  サブユニットと  $\beta$   $\gamma$  サブユニットの 2 つに解離する。 $\alpha$  サブユニットと  $\beta$   $\gamma$  サブユニットはそれぞれ GPCR から解離し、別個のエフェクター分子に作用してシグナルを伝達していく (図 2)。

GPCR の種類ならびにそれが発現している細胞により、GPCR と共に作用している G タンパク質の種類も異なっている。それらは  $\alpha$  サブユニットの配列により、 $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_q$ ,  $G_{12/13}$  の 4 つのタイプに大別される。 $G_s$  の  $s$  は活性化 (stimulation) の頭文字を意味し、膜酵素であるアデニル酸シクラーゼを活性化することにより後続するシグナル伝達カスケードの初発を行う。また、ホスホリパーゼ A2 あるいはホスホリパーゼ Cなどを活性化して細胞内にシグナルを伝達する。活性化されたアデニル酸シクラーゼにより生成された cAMP は、プロテインキナーゼ A を活性化して広範な細胞刺激をつかさどるセカンドメッセンジャーである。一方、 $G_{i/o}$  の  $i/o$  は阻害 (inhibitory) / その他 (other) の頭文字を意味し、しばしばアデニル酸シクラーゼの活性を阻害するため、さきの  $G_s$  に由来するシグナルの抑制を担う。そのほか、 $\beta$   $\gamma$  サブユニットを介してホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C $\beta$  やホスホジエステラーゼを活性化するなど、広範なシグナル伝達系に関与している。これら 2 つの主要なタイプのほか、ホスホリパーゼ C $\beta$  を活性化する  $G_q$ 、低分子量 G タンパク質である Ras や Rho を介したシグナル伝達系とク

ロストークする  $G_{12/13}$  がある。

### 3. GPCR に特徴的な薬理作用

GPCR にはホルモン受容体や神経伝達物質受容体などが多く含まれる。そのため、通常の酵素阻害剤やチャネルブロッカーとは異なり、GPCR に作用する薬物は薬理学的につきの 2 種類に大別される。すなわち、アゴニスト (作動薬) とアンタゴニスト (拮抗薬) である。アゴニストはその受容体の生理的なリガンドと同様の生理作用をひき起こす薬物であり、アンタゴニストは生理的なリガンドの作用に拮抗してこれを阻害する薬物である。通常、薬物の作用強度は薬物と標的となる受容体との解離定数 ( $K_d$ ) により一意的に定められるべきものであるが、GPCR のアゴニストには大過剰を投与しても本来の生理的なリガンドが起こしうる生理反応の部分的な活性化しか示さないものがある。そこで、解離定数とは別に、飽和したときに 100% の生理活性をひき起こしうるものを完全アゴニスト、部分活性化しかなしあげないものを部分アゴニストとよんで区別している。また、少なくない数の GPCR はリガンドの結合していない状態でもある程度のシグナル伝達を行っている。これは、いわば、自動車のエンジンのアイドリング回転に相当する活性で、基礎活性 (または、基底状態活性) とよぶ。通常のアンタゴニストは受容体によるシグナル伝達の活性化は阻害するものの、この基礎活性には影響をあたえない。一方、インバースアゴニスト (逆作動薬) とよばれる薬物は、この基礎活性をさらに抑制する薬物である。GPCR の関与する系ではこれら複雑な現象が古くから知られており、その分子機構の解明が待たれていた。

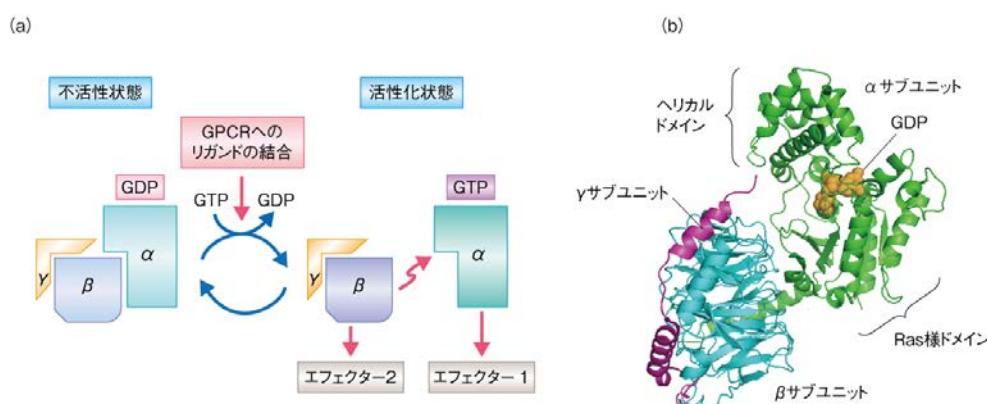


図 2 G タンパク質によるシグナル伝達機構とその立体構造

(a) G タンパク質によるシグナル伝達機構。GDP 結合型が不活性型、GTP 結合型が活性型。リガンドが GPCR に結合すると GDP は GTP に交換され、 $\alpha$  サブユニットと  $\beta$   $\gamma$  サブユニットがそれぞれ GPCR から解離し、別個のエフェクター分子に作用してシグナルを伝達していく。

(b) GDP 結合型 G タンパク質の結晶構造 (PDB ID : 3AH8)。緑色 :  $\alpha$  サブユニット、青色 :  $\beta$  サブユニット、ピンク色 :  $\gamma$  サブユニット、オレンジ色 : GDP。この構造は  $G_q$  タンパク質と阻害剤の複合体のかたちで解かれたものだが、ここでは阻害剤は省いている。

#### 4. GPCR の結晶化のくふう：受容体とリガンド

Kobilka 研究室の業績にくわえ、これまで GPCR の高分解能での立体構造解析に成功し技術確立に貢献した、Stevens 研究室 (米国 Scripps Research Institute), Tate 研究室 (英国 MRC Laboratory of Molecular Biology), および、わが国の岩田 想研究室 (京都大学大学院医学研究科) による成果について紹介する。

GPCR は重要な創薬ターゲットであったこともあり、その構造決定にむけて多くの努力がなされてきた。構造決定においてたちはだかった壁は、1) 組換え体の GPCR が大量に得られないこと、2) 結晶が得られない、たとえ得られたとしても、分解能の悪いこと、であった。これらの壁はタンパク質の結晶化においてつねにたちはだかるものであるが、GPCR においてはとくに高い壁であった。

組換え GPCR を得る手法として、大腸菌から真核細胞まで、さまざまな方法が検討されてきた。筆者らが調べたかぎり、これまでに立体構造が報告された GPCR のほとんどは昆虫細胞から調製されており、ほかには、メタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*) が 3 例、大腸菌 (固体 NMR による解析が行われた) が 1 例であった。そして、結晶化に適した試料を得るため、膜貫通ヘリックスへの変異の導入による安定化<sup>5,6)</sup>、N 末端や C 末端、あるいは、細胞内ループなどの切除<sup>7)</sup>、糖鎖により修飾されるアスパラギン残基からほかの残基への変異、などが行われた。これらの改変はリガンドに対する親和性や活性化能に影響する可能性があるため、野生型と比較したうえで結晶化に適した発現コンストラクトが選択された。

発現させた GPCR は細胞膜に埋め込まれているので、細胞を破碎して超遠心分離すると不溶性画分に存在する。この不溶性画分から GPCR を得るには界面活性剤により GPCR を可溶化する必要があるが、その一方で、界面活性剤の使用は GPCR を変性させてしまう可能性がある。したがって、界面活性剤の種類や量の条件検討は GPCR の構造解析において重要である。構造の報告されている GPCR では、可溶化に  $\alpha$ -ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド (DDM) がもっとも多く使われており、30 例あった。DDM は親水性の部分がマルトースとなっている非イオン性界面活性剤であり、GPCR にかぎらずほかの膜タンパク質の構造解析にもよく使われている。また、22 例においては、精製の途中に界面活性剤を交換し、結晶化において別の界面活性剤を使用していた。さらに、新しい界面活性剤の導入も進められており、7 例において、2 本のマルトース基と 2 本の炭化水素鎖をもつマルトースネオペンチルグリコール (MNG) が用いられていた<sup>8)</sup>。MNG はミセルの形成される臨界ミセル濃度が DDM より 1 衍小さく、このことが GPCR の安定化に寄与したのかもしれない。

GPCR はリガンドとの結合によりそのコンホメーションを変化させることで細胞内の G タンパク質の活性化をひき起こす。膨大な生化学的および薬理学的な研究から、

GPCR のなかにはリガンドと結合していないても一定の活性化能をもつものや、複数のリガンドとの結合能をもちリガンドごとに活性化能の異なるものが存在する。前者は、リガンドと結合していない状態において活性型と不活性型との動的平衡が存在すること、後者は、結合するリガンドによりコンホメーション変化の度合いが異なることを示唆しており、いずれも、GPCR のシグナル伝達機構に動的なコンホメーション変化の過程が内在されていることを示唆している。しかし、こうした GPCR の動的な性質は結晶化するうえでは不都合となるため、GPCR の精製のときからリガンドをくわえ、均一なコンホメーションをもつ試料となるよう調製していることが多い。用いられているリガンドには、完全な活性化状態に誘導する完全アゴニスト、弱い活性化状態で固定する部分アゴニスト、不活性状態に固定するアンタゴニストもしくはインバースアゴニストがある。インバースアゴニストはリガンドと結合していない状態でも活性化能をもつ  $\beta_2$  アドレナリン受容体の構造解析において用いられ、これを積極的に不活性状態に固定することにより構造解析を成功に導いた<sup>9,10)</sup>。

試料の調製においては、ほかにも GPCR を安定に保つための修飾など、さまざまなくふうがなされており、それらの実験条件はほとんどの論文において本文ではなくオンラインにある Supplementary Information に細かく記述されている。これら Supplementary Information は構造解析にいたった研究チームの粘り強い努力の結晶であり、ぜひ一読を勧めたい。

#### 5. GPCR の結晶化のくふう：結晶の作製

試料の調製におけるくふうにより均一なコンホメーションをとりうる試料を得ることが可能となったとしても、残念ながら、まだ構造解析に足る分解能をもつ結晶は得られない。なぜなら、GPCR には運動性の高い細胞内ループが存在するほか、ミセルにおおわれた GPCR は格子状には整列しにくいからである。

2007 年、2 種類の  $\beta_2$  アドレナリン受容体の立体構造が報告された。一方は、細胞内ループと特異的に相互作用する抗体 (Fab フラグメント) を作製して共結晶化により得られた構造、もう一方は、細胞内ループの一部をファージに由来する T4 リゾームと置換して作製したキメラタンパク質の結晶化により得られた構造であった<sup>9,10)</sup>。さまざまな生化学的な研究により、7 本の膜貫通ヘリックスのうち、5 番目 (TM5) と 6 番目 (TM6) をつなぐ 3 番目の細胞内ループ (ICL3) は非常に高い運動性をもつことが示唆されていた。この運動性を抑えるため、インバースアゴニストとの結合により不活性状態のコンホメーションをとる  $\beta_2$  アドレナリン受容体の試料をもとに、その ICL3 を認識するモノクローナル抗体が作製された<sup>11)</sup>。結果的には、抗体と結合させた  $\beta_2$  アドレナリン受容体のリガンドとの結合能は抗体を結合させなかつたときとほとんど

変わらなかつたため ICL3 の運動性は抑えられていなかつたが、結合させた抗体により親水性の領域の拡大したことが結晶化に寄与したものと思われた。一方、ICL3 を T4 リゾチームにより置換したキメラタンパク質の構造解析では、すでに構造の報告されていたロドプシンの TM5 と TM6 との距離と、T4 リゾチームの N 末端と C 末端との距離に着目し、ICL3 への T4 リゾチームの挿入箇所の異なる複数の発現コンストラクトが作製された。そして、リガンドとの結合アッセイをもとに結晶化に用いる試料を選別し、さらに、のちに述べる脂質キュービックフェーズ法を導入することにより結晶化に成功した<sup>12)</sup>。

さらに 2011 年、 $\beta_2$  アドレナリン受容体と T4 リゾチームとのキメラタンパク質について、細胞内領域に結合するナノボディを用いた結晶構造が報告された<sup>13)</sup>。ナノボディはラクダに由来する抗体であり、重鎖のみから構成され約 15 kDa と比較的小さい。この抗体はその小ささだけでなく、単一ドメインからなるため大腸菌や酵母でも発現が可能であるというメリットもある<sup>14)</sup>。このナノボディの結合は、アゴニストと結合した状態の  $\beta_2$  アドレナリン受容体の安定化に寄与し、その結晶化を成功に導いた。一方、T4 リゾチームとのキメラタンパク質とする方法は、ICL3 だけでなく、N 末端に融合させた場合にも結晶化に成功した。また、キメラ化するタンパク質パートナーとして熱安定化アポシトクロム *b*<sub>562</sub>RIL がくわわり<sup>15)</sup>、2012 年、これを N 末端に融合させた N/QFQ オピオイド受容体、および、ICL3 に挿入した A<sub>2A</sub> アデノシン受容体の構造解析が報告された。

GPCR の結晶化においては、さきに述べたように、脂質キュービックフェーズ法（脂質メソフェーズ法ともよばれる）が  $\beta_2$  アドレナリン受容体と T4 リゾチームとのキメラタンパク質の構造解析においてはじめて用いられ、そののち、GPCR の構造解析の約半数において利用されている。この方法は、水溶液におけるモノオレイン（グリセロールに 1 分子のオレイン酸がエステル結合した脂質）の比率と温度の変化により起こる相転移を利用する。GPCR の試料とモノオレイン、コレステロールの混合物に沈殿剤をくわえると、相転移により層状の格子構造となる。このとき、脂質二重膜にそった水平方向ではなくわえたコレステロールをあいだにはさんで GPCR が整列していく。一方、脂質二重膜と直行する垂直方向では、脂質二重膜の両側に突き出た GPCR の細胞外領域と細胞内領域にある親水性の部分とが相互作用して層を重ねていく。GPCR に T4 リゾチームや抗体などが結合しているときには、その部分が足がかりとなって重層していくものと考えられている<sup>16)</sup>。 $\beta_2$  アドレナリン受容体の構造解析の結果から、TM2 と TM4 に保存されたコレステロール結合モチーフの存在が示唆された<sup>17)</sup>。このように脂質キュービックフェーズ法により GPCR が規則正しく整列することで、より高分解能の構造解析が達成できたのだろう。一方、シチメンショ

ウの  $\beta_1$  アドレナリン受容体の構造解析においては、N 末端および C 末端の切除、さらに、変異の導入により活性をもつ安定な  $\beta_1$  アドレナリン受容体が調製され<sup>6)</sup>、蒸気拡散法による結晶化に成功した。

## 6. クラス A の GPCR の比較

クラス A の GPCR はロドプシンファミリーともいわれ、ロドプシンに対するアミノ酸配列の保存性が比較的高い。このことは、さきに述べたように、2007 年に報告された  $\beta_2$  アドレナリン受容体と T4 リゾチームとのキメラタンパク質の構造は、T4 リゾチームとロドプシンのデータをもとに分子置換法により決定されたことからも明らかであろう。

7 本の膜貫通ヘリックス（TM1～TM7）の配置はどの GPCR でも同じであり、細胞内から GPCR の細胞質側をみたとき、膜貫通ヘリックスは時計回りに配置されている。しかし、膜貫通ヘリックスの相対的な位置や角度、長さについては GPCR により違いがある（図 3a）。たとえば、ウシのロドプシンの構造（PDB ID : 1U39）を基準とすると、スフィンゴリン脂質をリガンドとする S1P<sub>1</sub> 受容体（PDB ID : 3V2W）は TM1 と TM2 が TM3 へむかって近づいている。これら膜貫通ヘリックスの位置の違いから S1P<sub>1</sub> 受容体の TM1 と TM7 とのあいだには隙間が生じ、スフィンゴリン脂質がその隙間を通過し S1P<sub>1</sub> 受容体の内部のポケットにアクセスしている可能性が示された。

また、同じ GPCR でも結合しているリガンドが変わると膜貫通ヘリックスの位置と角度も変化しており、この変化こそが細胞外からのシグナルを細胞内へ伝える分子機構の鍵である。これまでに、アゴニストの結合した活性型と、アンタゴニストもしくはインバースアゴニストの結合した不活性型の両方の構造が決定されているのは、 $\beta_2$  アドレナリン受容体、 $\beta_1$  アドレナリン受容体、A<sub>2A</sub> アデノシン受容体である。活性型と不活性型の GPCR の違いを細胞内からみると、 $\beta_2$  アドレナリン受容体では、TM5 は中心から外側への移動、TM6 は時計回りの回転と外側への移動、TM3 と TM7 は内側への移動が生じていた（図 3b）。一方、A<sub>2A</sub> アデノシン受容体では、TM3 は細胞外へむかっての移動、TM5 は TM6 へむかっての移動、TM6 は時計回りの回転と外側への移動、TM7 は内側への移動が生じていた（図 3c）。これらのコンホメーションの変化には結晶化の条件などによる影響の含まれている可能性があるが、アゴニストの結合による結合ポケットの周辺の小さな変化が膜貫通ヘリックスの移動や回転を誘起し、GPCR の細胞質側に大きな変化を生じさせている。

細胞外の領域は N 末端領域と 3 つの細胞外ループ（ECL1～ECL3）から構成されているが、そのアミノ酸配列は GPCR のあいだであまり保存されておらず、長さも異なる。細胞外ループは単に膜貫通ヘリックスをつないでいるだけではなく、遊離のリガンドを迎える入口と



なり, GPCR によってはリガンドとの結合に寄与している場合もある.  $\beta_1$ アドレナリン受容体,  $\beta_2$ アドレナリン受容体, S1P<sub>1</sub>スフィンゴリン脂質受容体においては, ECL2 に  $\alpha$ ヘリックスが存在する. 一方, CXCR4 ケモカイン受容体, ニューロテンシン受容体, PAR1 プロテアーゼ活性化受容体,  $\delta$ オピオイド受容体,  $\kappa$ オピオイド受容体,  $\mu$ オピオイド受容体, ノセプチニン受容体においては, ECL2 に  $\beta$ シートが形成されており, A<sub>2A</sub>アデノシン受容体においては, ECL1 と ECL2 とのあいだに  $\beta$ シートが形成されている. ECL2 と TM3 の細胞外側のあいだにはジスルフィド結合が形成されており, ECL2 のゆらぎが抑えられている. このジスルフィド結合はクラス A の GPCR のあいだで保存されているが, S1P<sub>1</sub>スフィンゴリン脂質受容体においては TM3 の細胞外側にシステイン残基がないのでこれは存在しない. ロドプシンにおいて, 細胞質側にある C 末端には 8 本目の  $\alpha$ ヘリックスが存在するが, これはほかのクラス A の GPCR においても存在することが多い.

リガンドの結合する位置は GPCR のあいだで少しづつ異なっている. 膜貫通領域の深い位置で結合しているのは, ロドプシン (11-*cis*-レチナール), ムスカリニン M2 受容体 (3-キヌクリジニルベンジレート), ムスカリニン M3 受容

体 (チオトロピウム), ヒスタミン H1 受容体 (ドキセビン) である. 逆に, 比較的浅い位置で結合しているのは, ドーパミン D3 受容体 (エチクロプリド), CXCR4 ケモカイン受容体 (It1t), S1P<sub>1</sub>スフィンゴリン脂質受容体 (スフィンゴリン脂質模倣化合物), ニューロテンシン受容体である (図 3d). また, 同じ GPCR でもリガンドにより結合する部位は異なっており, たとえば A<sub>2A</sub>アデノシン受容体の場合, アゴニストの UK-432097 は膜貫通領域の深い位置まで入り込んで結合していたが, インバースアゴニストの ZM241385 は浅い位置で結合していた (図 3e).

## 7. GPCR によるリガンドの認識機構: ニューロテンシン受容体を例として

実際の構造解析の例を参考にしながら GPCR によるリガンドの認識機構とシグナル伝達機構を解説する. とりあげるのは, これまで紹介していなかった GPCR の解析に成功したもうひとつの研究室である Grisshammer 研究室 (米国 NIH) による成果で, 2012 年に報告された, ニューロテンシン受容体とニューロテンシン (の部分ペプチド) との複合体の構造である<sup>17)</sup>. ニューロテンシンはウシの視床下部で発見された 13 アミノ酸残基からなるペプ

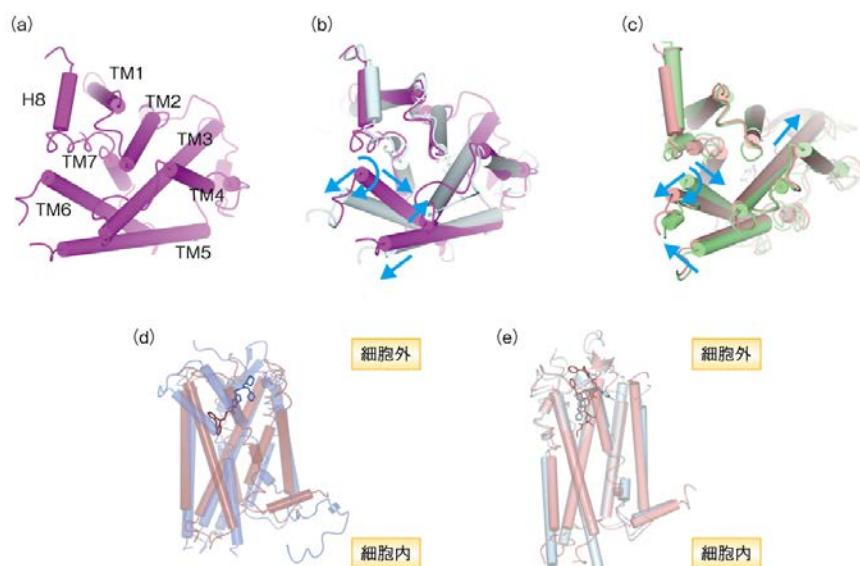


図 3 クラス A の GPCR の構造の比較

- (a)  $\beta_2$ アドレナリン受容体の細胞質側の領域 (PDB ID : 2RH1).
- (b)  $\beta_2$ アドレナリン受容体について不活性型と活性型との重ね合わせ. 不活性型は紫色, PDB ID : 2RH1, インバースアゴニストはカラゾロール. 活性型は水色, PDB ID : 3P0G, アゴニストは BI-167107.
- (c) A<sub>2A</sub>アデノシン受容体について不活性型と活性型との重ね合わせ. 不活性型は黄緑色, PDB ID : 3PWH, インバースアゴニストは ZM241385. 活性型は茶色, PDB ID : 3QAK, アゴニストは UK-432907.
- (d) ヒスタミン H1 受容体と CXCR4 ケモカイン受容体との重ね合わせ. ヒスタミン H1 受容体は茶色, PDB ID : 3RZE, アンタゴニストはドキセビン. CXCR4 ケモカイン受容体は青色, PDB ID : 3ODU, アンタゴニストは It1t.
- (e) A<sub>2A</sub>アデノシン受容体について活性型と不活性型との重ね合わせ. 活性型は茶色, PDB ID : 3QAK, アゴニストは UK-432907. 不活性型は水色, PDB ID : 3PWH, インバースアゴニストは ZM241385.

チドホルモンであり、末梢血管の拡張と血圧の降下作用、腸管の収縮作用、鎮静作用などが知られる。これまでに多くのアゴニストあるいはアンタゴニストと GPCR との複合体の構造が報告されているが、ペプチドホルモンと結合しているものとしては、この構造がはじめてであるので例として選んだ。結晶化には、ニューロテンシン受容体の 3 番目の細胞内ループを T4 リゾチームにより置換したキメラタンパク質が用いられた。試料はバキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現させたのち精製され、界面活性剤としては MNG が使用された。最終的に、脂質キュービックフェーズ法により結晶化され、2.8 Å 分解能で解析された<sup>18)</sup>。

得られた立体構造の特徴をまとめると、以下の点に集約される。1) 得られたニューロテンシン受容体の立体構造をロドプシン、および、 $\beta_2$ アドレナリン受容体の活性型および不活性型の構造と比較すると、活性型の $\beta_2$ アドレナリン受容体の構造に類似していた。2) 得られた立体構造を細胞質側からみると、膜貫通ヘリックス (TM) の相対配置について、TM5 が TM6 のある方向に寄っており、同時に、TM6 も隣接している TM3 から離れて TM5 のほうに寄る配置となっていた (図 4a)。ニューロテンシン受容体におけるリガンド結合部位は、1 番目を除く 6 本の膜貫通ヘリックス TM2～TM7 の細胞外側の残基と、N 末端ループおよび 3 本の細胞外ループ ECL1～ECL3 により構成された深く広いポケットであり、とくに ECL2 および ECL3、TM6 および TM7 に由来する残基と多くの相互作用がみられた。リガンドとニューロテンシン受容体のアミノ酸残基側鎖とのあいだのおもな相互作用は、水素結合および静電的相互作用であった。

この構造解析ではリガンドと結合していない状態のニューロテンシン受容体の立体構造は明らかにされていなかったため、リガンドとの結合の前後でどのような構造変化が起こるのか、その詳細は未知である。しかし、アゴニストとの結合により誘起されるコンホメーションの変化、すなわち、TM5 や TM6 が相対配置を変え、最終的に ICL2 および ICL3 の立体構造の変化をひき起こす点は共通であった。しかし、リガンド結合部位の“深さ”の点では大きく異なっていた。ロドプシンにおける内在性リガンドである全 *trans* レチノールや、 $\beta_1$ アドレナリン受容体のリガンドであるイソプレナリン、A<sub>2A</sub>アデノシン受容体のリガンドであるアデノシンなどは、膜貫通ヘリックスのより膜の中心部に近い深部に結合することで構造変化を起こす。それに対し、ニューロテンシンの結合部位はそれらリガンドの結合部位よりも 5 Å 近くも膜外 (細胞の外側) に近い (浅い) ところであった (図 4b)。したがって、リガンドとの結合部位は異なるのに生じるコンホメーション変化は共通であることは、活性型の $\beta_2$ アドレナリン受容体や A<sub>2A</sub>アデノシン受容体の構造から示されているものとは異なる分子機構により、ニューロテンシン受容体は活性型のコンホメーションをとることを示唆した。

## 8. GPCR によるシグナル伝達機構：G タンパク質におよぼされる構造変化

GPCR によるシグナルの受容が最終的にどのように G タンパク質に伝達されるかについて簡単に紹介する。この分子機構の解明に大きく貢献したのは、2011 年の、アゴニスト結合型の $\beta_2$ アドレナリン受容体とヌクレオチド非結合型 G タンパク質との複合体の構造解析の報告である

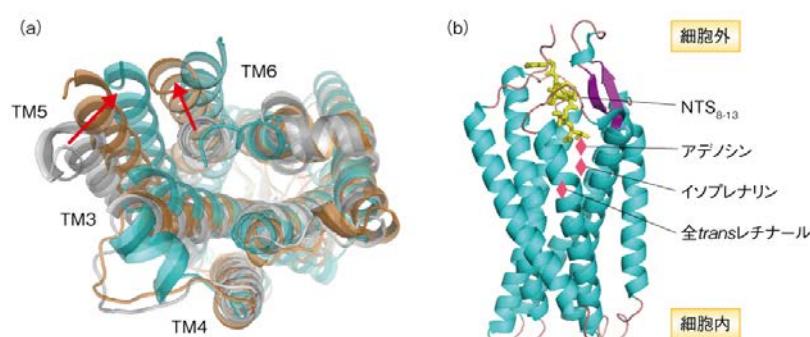


図 4 ニューロテンシン受容体の活性化の機構とリガンドとの結合部位

(a) ニューロテンシン受容体とニューロテンシンとの複合体における膜貫通ヘリックス (TM) の配置を、不活性型および活性型のロドプシンの立体構造と重ね合わせて比較した。重ね合わせには TM1～TM4 と TM7 を用い、TM5 および TM6 の相対配置の変化がわかりやすくなるよう示した。灰色：不活性型のロドプシン (PDB ID: 1GZM)、茶色：活性型のロドプシン (PDB ID: 3PQR)、青色：ニューロテンシン受容体・ニューロテンシン複合体 (PDB ID: 4GRV)。ロドプシンでは受容体の活性化にともない、TM5 および TM6 の位置が大きく移動していることがわかる。

(b) ニューロテンシン受容体とニューロテンシンとの複合体の構造。すでに明らかにされている GPCR のリガンド結合部位のおよその位置を示した。NTS<sub>8-13</sub>：ニューロテンシン部分ペプチド (8～13 残基)。

19) (図 5a). さきに述べたように、アゴニストとの結合により GPCR にひき起こされる立体構造の変化は、細胞の内側における TM6 の時計回りの回転として現われる。その結果、TM5 と TM6 とのあいだに溝が形成され、この GPCR と G タンパク質との複合体においては、そこに G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットのもつ  $\alpha 5$  ヘリックスが結合していた。しかし、TM6 と  $\alpha 5$  ヘリックスとの位置関係はこれまでロドプシンとトランスジューションに由来するペプチドとの複合体の構造から予測されていたものとは異なっていた。すなわち、GPCR との相互作用により細胞質側において  $\alpha$  サブユニットの Ras 様ドメインのコンホメーションが変化し、つづいて、この変化にともない  $\alpha$  サブユニットに劇的な構造変化が誘導されると予測された。GPCR との複合体から取り出した G タンパク質の立体構造 (図 5b) を、GDP 結合型 G タンパク質の立体構造 (図 2b) と比較するとわかるように、GPCR との複合体からは  $\alpha$  サブユニットのヘリカルドメインとよばれる領域が消えている (実際は、なくなつたわけではなく、ドメインの位置関係が角度にして 130 度近い回転運動を起こし、この図の背面にまわりこんでいる)。そしてその結果、これまで GDP がはさまれるようにして結合していた部位が、大きく溶媒に露出して GDP の解離が促されるような構造となっていた。そののち、低分子量 G タンパク質におけるシグナル伝達のスキームと同じく、GTP が結合することで  $\alpha$  サブユニットの構造は活性型へと変化し、下流の分子へとシグナル伝達カスケードを開始するのであろう。

## おわりに

これまで解明されていなかつた受容体の立体構造とシ

グナル伝達の分子機構が明らかにされることにより、生命科学の多くの分野 (たとえば、分子生物学、タンパク質科学、創薬、バイオインフォマティクスにくわえ、ときには、神経科学や薬理学なども含まれる) に影響が生じ、それ以後の研究の潮流すら決定してしまうことがときおりある。Lefkowitz と Kobilka “以前” の薬理学の研究がまさにそれであった。同じリガンドが細胞や組織あるいはその投与量によりまったく逆の薬理活性を示し、さらに、同じ受容体を介して異なる生理現象をひき起こすという混沌とした状況は、こと GPCR に関するかぎり、薬理学という学問を複雑怪奇な暗記学問とし、多くの医学生および薬学生の不評を買つてきた。筆者らの推測ではあるが、そのおもな理由は、GPCR に作用する生体内リガンドや薬物のもたらす生理現象が複雑かつ予測不可能で、容易に理解あるいは説明しがたかったせいではなかろうか? しかし、ロドプシンの高分解能の結晶化により端緒が切られ<sup>20)</sup>、そののち、急速に発展した構造決定法の確立と普及により、わずかな期間に多くの GPCR において構造解明がなされ、明快な分子薬理学の時代の到来がつげられた。GPCR の構造解析がもたらした情報をもとに、今後は、アゴニスト、部分アゴニスト、アンタゴニスト、部分アンタゴニスト、インバースアゴニストなど、これまで以上に豊富な種類の薬物の開発が合理的かつ論理的に進められていくことになろう。非常に興味深いことは、GPCR のシグナル伝達機構そのものに内在される動的な構造特性の理解が、結果的にさまざまな手法を生み出す契機となり、構造決定の成功をもたらしたことである。溶液 NMR 法や小角散乱法と異なり、本来は静的な構造しかあたえないはずの X 線結晶解析が導き出した GPCR の構造動態も、多くの研究者による技術の積み重ねの歴史があればこそ、よりリアルなものとしてせまつてくるのではなかろうか。複数の立体構造

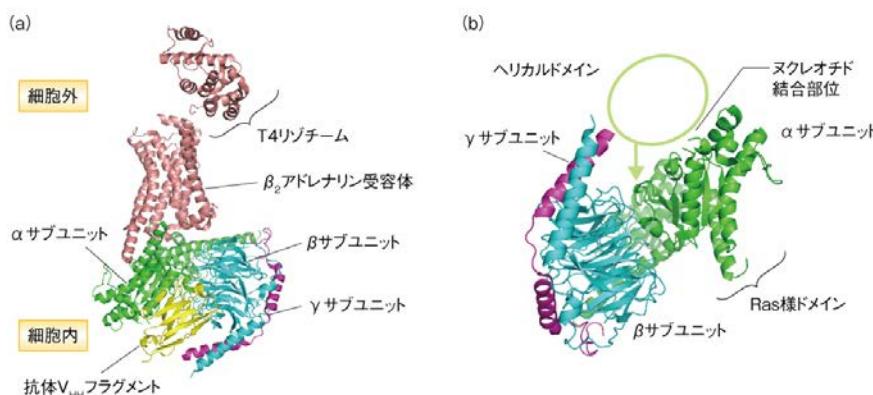


図 5 GPCR によるシグナル伝達機構

(a)  $\beta_2$ アドレナリン受容体と G タンパク質との複合体の結晶構造 (PDB ID : 3SN6)。緑色 :  $\alpha$  サブユニット、青色 :  $\beta$  サブユニット、紫色 :  $\gamma$  サブユニット。 $\beta_2$ アドレナリン受容体 (ピンク色) の N 末端には T4 リゾチームが融合し、また、細胞内には抗体 V<sub>HH</sub> フラグメント (黄緑色) が結合している。

(b)  $\beta_2$ アドレナリン受容体と G タンパク質との複合体の結晶構造から G タンパク質のみを取り出した。ヌクレオチド結合部位は溶媒に露出している。

のあいだの動的平衡やタンパク質の構造ゆらぎといった“動的構造”的もたらす生理的な現象の重要性は、GPCR のほかにも、低分子量 G タンパク質や核内受容体の関与するシグナル伝達において認知されはじめており、構造生物学分野における新たな鍵概念となりつつある。こうした新しい概念の確立が創薬の分野にパラダイムシフトをもたらす日も近いと考えられる。

## 文 献

- 1) Alberts, B. 他著, 中村桂子, 松原謙一 監訳: *Essential 細胞生物学* 原書第 3 版. 南江堂 (2011)
- 2) Horn, F., Weare, J., Beukers, M. W. et al.: GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.*, 26, 275-259 (1998)
- 3) Vroeling, B., Sanders, M., Baakman, C. et al.: GPCRDB: information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.*, 39, D309-D319 (2011)
- 4) Nishimura, A., Kitano, K., Takasaki, J. T. et al.: Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric G<sub>q</sub> protein by a small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 13666-13671 (2010)
- 5) Robertson, N., Jazayeri, A., Errey, J. et al.: The properties of thermostabilised G protein-coupled receptors (StaRs) and their use in drug discovery. *Neuropharmacology*, 60, 26-44 (2011)
- 6) Serrano-Vega, M. J., Magnani, F., Shibata, Y. et al.: Conformational thermostabilization of the  $\beta$  1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 877-882 (2008)
- 7) Kobilka, B. K.: Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein-coupled receptor. *Anal. Biochem.*, 231, 269-271 (1995)
- 8) Chae, P. S., Rasmussen, S. G. F., Rana, R. R. et al.: Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat. Methods*, 7, 1003-1008 (2010)
- 9) Rasmussen, S. G. F., Choi, H. -J., Rosenbaum, D. M. et al.: Crystal structure of the human  $\beta$  2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450, 383-387 (2007)
- 10) Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A. et al.: High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta$  2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 318, 1258-1265 (2007)
- 11) Day, P. W., Rasmussen, S. G. F., Parnot, C. et al.: A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat Methods*, 4, 927-929 (2007)
- 12) Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A. et al.: GPCR engineering yields high-resolution structural insights into  $\beta$  2-adrenergic receptor function. *Science*, 318, 1266-1273 (2007)
- 13) Rasmussen, S. G. F., Choi, H. -J., Fung, J. J. et al.: Structure of a nanobody-stabilized active state of the  $\beta$  2-adrenoceptor. *Nature*, 469, 175-180 (2011)
- 14) Steyaert, J. & Kobilka, B. K.: Nanobody stabilization of G protein-coupled receptor conformational states. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 21, 567-572 (2011)
- 15) Chun, E., Thompson, A. A., Liu, W. et al.: Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure*, 20, 967-976 (2012)
- 16) Caffrey, M.: Crystallizing membrane proteins for structure determination: use of lipidic mesophases. *Annu. Rev. Biophys.*, 38, 29-51 (2009)
- 17) Hanson, M. A., Cherezov, V., Griffith, M. T. et al.: A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human  $\beta$  2-adrenergic receptor. *Structure*, 16, 897-905 (2008)
- 18) White, J. F., Noinaj, N., Shibata, Y. et al.: Structure of the agonist-bound neuregulin receptor. *Nature*, 490, 508-513 (2012)
- 19) Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y. et al.: Crystal structure of the  $\beta$  2 adrenergic receptor- G<sub>s</sub> protein complex. *Nature*, 477, 549-555 (2011)
- 20) Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T. et al.: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289, 739-745 (2000)

## 著者プロフィール

### 天野 剛志 (Takeshi Tenno)

**略歴**：2004 年 愛媛大学大学院理工学研究科 修了, 同年 横浜市立大学大学院総合理学研究科 研究員, 2005 年 京都大学大学院工学研究科 研究員, 2007 年 神戸大学大学院医学系研究科 特命助教, 2011 年 名古屋大学理学部 特任助教を経て, 2012 年より名古屋大学大学院創薬科学研究科 助教。

**研究テーマ**：構造生物学的なアプローチによる膜タンパク質のシグナル受容機構の解明, および, マルチドメインタンパク質のシグナル伝達機構の解明。

**関心事**：とくに, タンパク質の構造変化をともなうシグナル伝達機構およびシグナル受容機構に興味があります。調製の困難な組換えタンパク質の新規の調製法の開発にも励んでいます。

廣明 秀一 (Hidekazu Hiroaki)

略歴 : 1992 年 大阪大学院薬学研究科博士課程 修了, 同年 日本ロシュ 研究所, 1996 年 生物分子工学研究所, 2001 年 横浜市立大学大学院総合理学研究科 助教授, 2007 年 神戸大学大学院医学系研究科 特命教授, 2011 年 名古屋大学理学部 教授を経て, 2012 年より名古屋大学大学院創薬科学研究科 教授.

研究テーマ : 創薬を志向したタンパク質ドメインの NMR 構造生物学.

関心事 : マルチドメインタンパク質および天然変性タンパク質の構造動態と機能発現の機構に興味があります. 研究オタクな大学院生を常時募集中.

研究室 URL : <http://presat-vector.org/hiroaki-lab/>

© 2013 天野剛志・廣明秀一 Licensed under a Creative Commons 表示 2.1 日本 License