

創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	最新の構造解析技術を活用した GPCR 創薬のための技術基盤の構築
代表機関名	学校法人関西医科大学
職名	教授
研究開発代表者名	小林 拓也
全研究開発期間	平成 30 年度～令和 2 年度

1. 研究開発成果

1)EP4 受容体と EP4 拮抗剤の共結晶化及び構造解析

京都大学では、これまでに EP4 拮抗剤 (ONO-AE3-208) の結合した不活性型 EP4 受容体の構造解析に成功した。既に立ち上がっているこれらのシステムを利用して、製薬企業が開発した他の EP4 拮抗剤の結合様式を解明することを目指した。研究協力機関から EP4 拮抗剤を提供してもらった。京都大学では、EP4 受容体の発現・精製、抗体の調製、EP4 受容体と EP4 拮抗剤の共結晶化を実施した。理化学研究所では、微結晶から効率的に高分解能のデータを取得するシステムを構築した。その結果、化合物 A を結合させた EP4 受容体で分解能 ~ 10 程度の結晶を得ることができた。しかし、その後、結晶化条件の最適化を試みたが、さらに分解能を向上することができず構造解析までには至らなかった。そこで、研究期間内に研究を遂行するために、ドッキングシミュレーションにより、既に決定されている不活性型 EP4 受容体のリガンド結合ポケットの立体構造を基にモデリングを検討し、一連の EP4 拮抗剤の結合様式を明らかにすることができた。EP4 拮抗剤が相互作用する受容体のアミノ酸残基を比較したところ、全てのプロスタグランジン受容体で保存されている第 7 膜貫通領域のアルギニン残基 (EP4 では Arg316) を軸に各々の EP4 拮抗剤で特徴的な相互作用様式を有していることが明らかとなった。今後、受容体の立体構造が決定されている場合、製薬企業の開発した薬剤が受容体にどのように結合しているのか、短時間で予測することが可能となる。これらの成果は、製薬企業など、創薬に携わる企業のニーズに対応するものである。立体構造が決定された受容体の数は年々増加しており、今後はドッキングシミュレーションで対応可能な化合物も増え、創薬の基盤としてさらなる展開が期待できる。

2)EP3, EP4/mini Gi の結晶化及び構造解析

京都大学と関西医科大では、G をコンパクトにした mini Gi および mini Gs、EP3 受容体および EP4 受容体の発現・精製、複合体 (EP3 受容体 / mini Gi、EP4 受容体 / mini Gs) の調製及び結晶化を実施した。理化学研究所では、微結晶から効率的に高分解能のデータを取得するシステムを構築した。その結果、分解能 ~ 3.5 程度の高分解能結晶を見出すことができた。構造解析を検討したところ、mini Gi が結合していない EP3 受容体単独の結晶であることが分かった。結晶化中、複合体 (EP3 受容体 / mini Gi) からゆっくりと mini Gi が乖離することで疎水性の高い EP3 受容体は急激に凝集することなく結晶を形成することができた可能性がある。次に、G 蛋白質共役受容体の新しい結晶化促進バインダーとして mini G が使えないか実証するため、同様に EP4/mini Gs の結晶化を検討した。LCP 法で 1152 条件、蒸気拡散法で 384 条件の結晶化条件

をスクリーニングした結果、蒸気拡散法から 13 条件で結晶が認められた。しかし、全て塩の結晶であることが判明した。受容体に結合する G 蛋白質の親和性は、受容体と G 蛋白質の種類、それらの組み合わせによって異なり、mini G が汎用性の高い結晶化促進バインダーとしては使用できないことが明らかとなった。近年、G 蛋白質が共役した受容体の構造解析は、複合体の高分解能結晶が得られるか得られないかで、構造解析ができるか否かが決まってしまう(all or nothing)という運に委ねられる X 線結晶構造解析から単一に精製できれば構造解析に挑戦することが可能なクライオ電子顕微鏡による複合体構造解析が主流となってきた。本プロジェクトでもクライオ電顕を用いた単粒子解析に大きく舵を切ることになった。

3)三量体 G 蛋白質の共役した EP3, EP4 受容体のクライオ電顕を用いた単粒子解析

京都大学と関西医科大では、EP 受容体と三量体 G 蛋白質の発現・精製、複合体(EP 受容体 / G 蛋白質)を調製した。単粒子解析データを BINDS・クライオ電顕ネットワークで取得するため、理化学研究所ではクライオ電顕に適した試料のスクリーニングを進めた。調製した複合体について、クライオ電顕で観察を試み、構造解析に使えるサンプル調製及び解析システムを構築した。その結果、EP4 受容体 / Gs 蛋白質複合体について、分解能 3.3 Å で電子顕微鏡マップを取得し、3D モデルを構築することに成功した。この成果をまとめた論文は令和 2 年 12 月米国科学誌「Structure」に掲載された。この研究の一部は、AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の課題番号 JP20am0101070 の支援を受けている(支援番号 0425)。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析は、新技術の創出に資するものであり、これらの成果は製薬企業など、創薬に携わる企業のニーズに対応するものである。本プロジェクトにおいて、代表機関と分担機関は十分な連携体制を構築することができた。今後は、製薬企業と共同研究を進めることで研究開発成果のさらなる展開を期待している。立ち上げた技術は、全ての受容体と G 蛋白質の複合体構造解析に応用可能であり、創薬の基盤として汎用性(応用性)が認められた。

今後の課題と方向性

今後、製薬企業との共同研究を中心に、京都大学と関西医科大では、G 蛋白質共役受容体と三量体 G 蛋白質を発現・精製し、複合体(受容体 / G 蛋白質)を調製する。単粒子解析データを BINDS・クライオ電顕ネットワークで取得するため、理化学研究所ではクライオ電顕に適した試料のスクリーニングを検討する。ターゲット受容体について、複合体の調製及びクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を目指す。現在、一般的に構造解析に使用する受容体は、決まった構造を取らないと考えられている長い細胞内ループ、フレキシビリティの高い C 末端領域を削っている。しかし、C 末端領域は G 蛋白質の選択性に関与しているという報告もあることから、受容体と G 蛋白質の組み合わせによっては、新たな構造を取り得る可能性もある。また、G 蛋白質以外のシグナル伝達分子(アレスチン)との相互作用についても、未だ解明されていないことが多い。さらに、 μ オピオイド受容体と δ オピオイド受容体はヘテロダイマーを形成することが知られている。この二量体化受容体に対するアゴニストは、モルヒネによる鎮痛耐性及び便秘を引き起こしにくいという報告がある。構造生物学的なアプローチにより、オリゴマー化した受容体をターゲットにした創薬にも貢献していきたい。

Approximately 70% of currently marketed drugs are known to target proteins that localize to the cell membrane, such as G-protein coupled receptors (GPCR), channels, membrane transport proteins, and membrane enzymes. However, the series of processes required to develop drugs that target these proteins, (e.g. detection of target molecules among other membrane proteins, assay system assembly, screening for lead compounds, and/or final optimization of drug dosage and delivery), requires considerable time, and has a low probability of success. Structural studies of membrane proteins could potentially lead us to discover potent compounds with less side effects for various disease conditions including cancer, hypertension and chronic inflammation. However, such structure-based drug discoveries remain stagnant, because it is still challenging to solve the structure of human membrane proteins.

To overcome the bottlenecks, we have developed a state-of-the-art technical platform for discovery of therapeutic antibodies directed to druggable membrane protein targets. Researchers of Kyoto University have established an ingenious antibody-assisted crystallographic approach and successfully applied it to determine the structures of human adenosine A2a receptor (Nature, 2012), bacterial homolog of Rce1, a therapeutic target in K-Ras induced cancer (Nature, 2013), human adiponectin receptors (Nature, 2015), human erythrocyte membrane anion exchanger (Band3)(Science, 2015), and rat fructose transporter GLUT5 (Nature, 2015). Recently, they have further improved the antibody protocols to efficiently generate “crystallization chaperones” that specifically recognize conformational epitopes of the extracellular domain of membrane proteins. With these technical advances, they have determined the crystal structures of human prostanoid EP4 receptor, human angiotensin II receptor type 2, and human dopamine D2 receptor.

In this project, we are focusing on GPCRs, which respond to a broad spectrum of chemical entities ranging from photons, protons and calcium ions, to small organic molecules (including odorants and neurotransmitters), peptides and glycoproteins. Many GPCRs are members of closely related subfamilies that respond to the same hormone or neurotransmitter but have different physiologic functions owing to the cells in which they are expressed and the differing signaling pathways they exploit (e.g., coupling through heterotrimeric G-proteins such as Gs, Gi, and Gq, but also β -arrestins). Using prostaglandin E receptor as a model, a new stream could emerge via X-ray crystallography, free electron laser, and single-particle cryo-electron microscopy for the determination of GPCR-signaling molecule complex structures. Based on the structural knowledge for molecular interactions between target membrane proteins and small molecule drugs, we would like to regulate rationally cellular functions for therapeutics.

2. 総合評価

優れている

【評価コメント】

蛋白質構造解析を専門とする適切な研究体制で、企業と連携しながらプロスタグランジン受容体 (EP3, EP4) を対象とした結晶構造からの結合様式の推定、クライオ電顕を用いた単粒子解析をすすめて GPCR 創薬の技術基盤構築を行ったことは評価できる。

今後、受容体との結合様式を解明することで、薬物の薬理活性・副作用を分析可能な基盤技術に発展させるとともに、製薬企業と協力しながら GPCR 創薬へ貢献されることを期待する。

以上