論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※　　第　　号

氏　　名　志甫谷　渉

論　文　題　目　ヒト由来エンドセリン受容体Ｂ型のＸ線結晶構造解析

論文審査担当者

主　査	名古屋大学教授	藤吉	好則
委　員	名古屋大学教授	廣明	秀一
委　員	名古屋大学准教授	大嶋	篤典

別紙1-2

論文審査の結果の要旨

エンドセリン受容体は、強力な血管収縮物質として発見されエンドセリンと命名された21アミノ酸からなるペプチド性のホルモンと結合して、重要な生理機能を制御するGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。この受容体には2つのサブタイプが発見されており、エンドセリン受容体A型（ET_AR）とエンドセリン受容体B型（ET_BR）と命名されている。これらの受容体は、脳や、肺、心臓、腎臓、消化管などに発現していることが確認されている。これら2つの受容体、ET_AR と ET_BR のリガンド（アゴニスト）としては、エンドセリン－１（ET-1）、エンドセリン－２（ET-2）、そして、エンドセリン－３（ET-3）の3種類の21アミノ酸からなるペプチド性ホルモンが知られている。ET_ARは、ET-1とET-2に高い親和性を有するが、ET-3への親和性は低く、ET-1およびET-2のおよそ100分の１である。一方、ET_BRに関しては、これら3つのリガンドに対する親和性はいずれに対しても同程度で、極めて高い。実際に、KD値は20pMであり、受容体を分解しないとこれらのリガンドは受容体に結合したままであるほど高い親和性を示している。これらのGPCRは、血圧の制御や神経発生、体液中の水分の割合の調節になど関わり、我々の身体の恒常性を保つために重要な生理機能を担っている。それゆえ、すでにエンドセリン受容体の低分子アンタゴニストとして、ET_ARとET_BRの両方に非選択的に結合するボセンタンと名付けられた化合物が肺動脈性高血圧症の治療薬として大いに効果を上げている。さらに、ET_AR選択性を向上させたマシセンタンと呼ばれる薬剤も使われている。ET_BR選択的アンタゴニストとしては、K-8794という化合物が見出されている。他にもアンブリセンタンと名付けられたアンタゴニストも肺動脈性高血圧症の治療薬として使われている。ET_ARは血管平滑筋細胞に発現して血管収縮や細胞増殖に関わっていることが知られている。ET_BRは、血管内皮細胞に発現が見られ、NOシグナルを介して血管拡張の機能を担うとされている。このET_BRは、急激な血圧変化だけでなく、慢性的な高血圧や、がんなどを始めとする疾病に関わっており、創薬標的としても非常に興味深いGPCRである。

その生理機能や創薬標的としての重要性から、研究室ではET_BRの構造解析を目指した研究を長年続けてきた。すなわち、長年このET_BRの構造解析に挑戦して、様々な試みを行ってきた結果、構造を安定化する変異体の作製に成功した。申請者は、ET_BRの構造解析という極めて困難な研究課題に果敢に挑戦し、その構造安定化変異体を活用すると共に、Kobilkaらにより開発されたT4リゾチームを融合したET_BR-T4Lの最適な融合体を作製することによって、しかも様々な結晶化条件を試みることによって、高分解能の構造解析に適した結晶を作製することに成功した。その結果、上記ペプチド性ホルモンのET-1とこのET_BR-T4Lとの複合体の結晶化に成功した。この様にして作製した結晶とＸ線結晶学を用いて、ET_BR と ET-1との複合体の構造を、2.8Å分解能で解析することに成功した。さらに、リガンドが結合していないET_BR-T4Lの良質な結晶を作製することにも成功して、リガンドが結合していない状態のET_BRの構造

を 2.5Å で解析する事にも成功した。すなわち、リガンド非結合型とリガンド結合型の ET_BR の構造解析に成功した。これら 2 つの構造は、T4 リゾチームを細胞内第 3 ループに融合させた状態で構造解析しているので、G タンパク質を活性化する構造変化を生理的に正確に決定することはできていない。しかし、申請者は、この構造解析によって、エンドセリン受容体のアゴニストである ET-1 が ET_BR と強く結合する詳細な構造情報を明らかにした。ET-1 と ET_BR との相互作用面積はおよそ 1,500Å2 と極めて広範囲の相互作用をしていること、また、細胞外領域に形成されているβシートや N 末端領域がこのリガンドをフタするような結合様式をとることによって、ET-1 は ET_BR に対して高い親和性を有することを、詳細に理解できるようにした。リガンドを結合していない構造と結合した構造の比較から、特に 6 番目と 7 番目のヘリックスが細胞外側で 4Å 程度と大きく動くことも明らかにした。これらの結果は Nature 誌に第 1 著者として発表した（Shihoya et al., **Nature, 537,** 363-368 (2016)）。さらに、ボセンタンと ET_BR 選択的アンタゴニストとして開発された K-8794 という化合物との 2 種類のアンタゴニストとの複合体の構造解析にも成功して、論文を投稿している。ボセンタンは受容体の深い位置の中心部と相互作用しており，ET_BR の 16 残基によって認識されていた。ボセンタンの中心には負に帯電しているスルホンアミドが存在しており，ET-1 の C 末端を模倣する形で ET_BR の正電荷を帯びた側鎖と相互作用していた。この結果は，ET_BR への結合にはリガンドの負電荷が，正電荷を有する ET_BR の残基と相互作用することにより結合するので、負に帯電した電荷がこの受容体への結合に重要であることを示唆している。ボセンタンは世界初の経口投与可能なエンドセリン受容体アンタゴニストとして治療薬として使われており，実際にエンドセリン受容体のアンタゴニストの大部分はボセンタンを基に設計された誘導体である。ボセンタン誘導体の間ではこのスルホンアミドの保存性が極めて高いため，全てのエンドセリン受容体アンタゴニストは，スルホンアミドと正電荷をもつ残基との相互作用を起点とした結合様式であることが推定された。ボセンタン結合型の全体構造や膜貫通領域の配置はリガンド非結合型と酷似しているので，申請者は、ボセンタンは 6 番目と 7 番目の膜貫通ヘリックスの構造変化を抑えることによってエンドセリン受容体を拮抗的に阻害できる機構を提案した。

上述のように本論文においては、創薬標的として最も重要と考えられている代表的 GPCR である ET_BR と代表的なアゴニストである ET-1 との複合体の構造を解析するとともに、リガンドが結合していない ET_BR の構造も解析して、第 1 著者として Nature 誌に論文を発表し、さらに、2 種類のアンタゴニストの構造解析にも成功した。これらの結果は、血圧制御薬のみならず、抗癌剤の開発にとって重要な構造情報を与えている。従って、当審査委員会は、論文が博士（創薬学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。