

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

ヒト由来 MrgD-G タンパク質複合体の構造解析による  
活性化機構の解明

論文題目

氏名 鈴木 翔大

## 論文内容の要旨

Mas-related G protein-coupled receptors (MRGPR)は硬骨魚類から分岐した後、四肢動物が進化させた比較的新しい G タンパク質共役型受容体(GPCR)群である。MRGPR family は神経系や免疫系に発現する受容体であることが知られており、主に痛覚や痒みのシグナルを担う受容体と考えられている。その中でも Mas-related G protein-coupled receptor D (MrgD)は、脊髄後根神経節だけでなく心血管系、網膜神経細胞などに発現し、痛みや痒みのシグナル伝達を行うだけでなく血圧の調節や、網膜毛細血管の維持にも関与することが報告されている。これまでに MrgD の内在性アゴニストとして  $\beta$ -alanine、GABA、alamandine、5-oxo-eicosatetraenoic acid が同定されているが、これらのリガンドがどのように MrgD に結合し受容体を活性化させるのか明らかではない。また MRGPR family は恒常活性の高いことが知られており、リガンドに依存しない活性化機構にも注目が置かれている。本研究では、MrgD のリガンド非結合状態(apo)と  $\beta$ -alanine を結合させた状態のそれぞれについて、ヘテロ三量体 Gi タンパク質との複合体構造を高分解能で決定し、リガンド結合ポケットの同定と受容体活性化機構に関して理解することを目的とした。

MrgD についてクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行うために、大量発現系および精製方法を検討した。MrgD 単独の精製は受容体の不安定性のため困難と判断し、MrgD、ドミナントネガティブ Gi (DNGi)、G $\beta$  $\gamma$  を昆虫細胞で共発現させた。発現させた細胞を回収後、細胞を  $\beta$ -alanine を加えてインキュベートし、細胞内で複合体を形成させた。さらに複合体を安定化させるため、Gi-G $\beta$  $\gamma$  の解離を抑制する一本鎖抗体(scFv16)を混合し、 $\beta$ -alanine-MrgD-DNGi-G $\beta$  $\gamma$ -scFv16 (MrgD-Gi)複合体の精製に成功した。精製した MrgD-Gi 複合体を用いてクライオ電子顕微鏡用凍結グリッドの最適化

を行い、薄いアモルファスの氷の層に MrgD-Gi 複合体粒子がモノレイヤー状に均一に詰まった条件を決定した。得られた試料をクライオ電子顕微鏡(Cryo-EM)で撮影し、単粒子解析を行い、MrgD-Gi 複合体の apo 状態を分解能 2.8 Å で β-alanine 結合状態を分解能 3.1 Å で構造決定した。得られた Cryo-EM マップから MrgD-Gi 複合体の 2 つの状態について原子モデルを構築することに成功した。MrgD の全体構造は、すでに構造決定された他の GPCR と同様に 7 つの膜貫通ヘリックスバンドルを形成していた。リガンド結合ポケットは細胞外ループで覆われておらず露出した構造をとり、この特徴はメラノコルチン受容体(Israeli et al. 2021 Science)や MrgX 受容体(Yang et al. 2021 Nature, Cao et al. 2021 Nature) と共通していた。

apo 状態では細胞外側に形成されたリガンド結合ポケットに 2 つの水分子が確認された。一方で、β-alanine 結合状態では、水分子が確認された位置より細胞外側に apo 状態では見られなかった大きな密度が観測され、その密度を β-alanine と同定するとともに、リガンド結合ポケットであることを明らかにした。β-alanine の認識に関与する MrgD のアミノ酸を同定するため、NanoBiT-G-Protein dissociation assay と呼ばれる手法を用いてリガンド濃度依存的な G タンパク質の活性の評価を行った。MrgD-Gi 複合体の立体構造が示す β-alanine との相互作用に関与する残基について、それぞれアラニン置換体を作製し活性を評価し、シグナル活性が低下するアミノ酸残基を β-alanine の認識に必要なアミノ酸残基として同定した。

MrgD の結合ポケットは過去に報告された GPCR の通常のリガンド結合ポケットとは異なり β-alanine は細胞外表面に露出していた。これは MrgD に特徴的な構造であり、β-alanine が 4-20μM という低い EC50 を説明するものであった。MrgD の 6 番目の膜貫通ヘリックス(TM6)は、その細胞質側で受容体の中心から外側に開いた構造をしていた。これは構造既知の活性型 GPCR に見られる共通した特徴である。TM6 の細胞外側は約 20° TM3 側に傾いており、MrgX (Yang et al. 2021 Nature, Cao et al. 2021 Nature) と一致することから MRGPR family に共通した特徴である可能性が考えられた。

class A GPCR の 70%はトグルスイッチと呼ばれるトリプトファンを TM6 の中心に持つが、MrgD はこの位置に S234 を持つ。正規の GPCR の活性化機構ではリガンドの結合がこのトグルスイッチを直接押すことで受容体を活性化するが、MrgD は β-alanine が S234 と相互作用しない一方で、TM6 の細胞外側の W241 が β-alanine を直接認識し、TM3 の Y106 と相互作用を形成することによって TM6 が TM3 を側へ大きく傾けていた。これが受容体の活性化に寄与することを検証するため、MrgD の TM3 と TM6 間の相互作用に関わる嵩高い側鎖のアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作製し、活性を評価した。その結果、アラニン変異体では β-alanine のポテンシーが大幅に低下した。このことから TM3-TM6 間の細胞外側の相互作用がリガンド依存的な活性化に重要であることを示した。次に代表的な class A GPCR としてドーパミン受容体(D3R)を選択しトグルスイッチの構造を比較した。MrgD の S234 は活性化状態

の D3R のトグルスイッチであるトリプトファン側の側鎖と同じ位置に配置されており、S234 がトグルスイッチとして機能する可能性が考えられた。しかし、S234 をグリシンに置換した MrgD 変異体を作製し活性を評価したところ、野生型と同等の活性を保持していたことから MrgD の S234 はトグルスイッチとして機能しない事を示した。MrgX (Yang et al. 2021 Nature, Cao et al. 2021 Nature) は MrgD の S234 の位置にグリシンを持ち、これはトグルスイッチとして機能しないことから、MRGPR family は共通してトグルスイッチを持たない可能性が示唆された。

apo 状態と  $\beta$ -alanine 結合状態の MrgD の構造を比較すると、主鎖の Ca に関しては RMSD=0.37 Å という値で全体構造は類似していたが、リガンド結合ポケットのアミノ酸側鎖の配置は異なっていた。Apo 状態では W241 が Y106 と Y109 の間にはまり込むように相互作用していた。さらに、リガンド結合ポケットに位置する 2 つの水分子はリガンドを模倣しており、TM6 の傾きの維持に寄与していた。 $\beta$ -alanine が結合すると、apo 状態において受容体の外側に配置されていた F242 や W246 といった嵩高いアミノ酸側鎖が受容体の内側に移動して TM3 と TM6 間の相互作用が強まっていたことから、これがリガンド依存的なシグナルを引き起こすと考えられる。この結果は、MrgD が高い恒常活性を持ちながら、アゴニストによる刺激にも応答できることを示している。

以上のように、今回のクライオ電子顕微鏡による研究で、MrgD の恒常活性と内在性アゴニストである  $\beta$ -alanine による活性化の構造的基盤を明らかにした。また、MrgD は正規のトグルスイッチを持たないユニークな活性化メカニズムを持つことを示した。これらの結果は、MRGPR family の活性化機構の詳細な理解や MrgD を標的とした薬剤設計に資する知見を提供するものである。