

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

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

氏名 志甫谷 渉

論文内容の要旨

エンドセリン受容体(ETR)は、21 アミノ酸からなるペプチドホルモン「エンドセリン」をアゴニストとして受容する、G タンパク質共役受容体 (GPCR) である。エンドセリン受容体には $ET_A R$ ・ $ET_B R$ の2種類が存在し、血圧の制御や体液中の水分濃度の調整、神経発生など、体内の恒常性を司る様々な生理機能を担っている。エンドセリンの中でも、ET-1 は生体内で最も強力な血管収縮物質であり、 $ET_A R$ ・ $ET_B R$ 両方に非常に高い親和性で結合する($K_d=10^{-11}$ M)。体内の ET-1 濃度の異常上昇は、高血圧・心肥大などの循環器疾患やがんの原因となっている。そのため、ETR のアンタゴニストは高血圧やがん、腎臓病の治療薬として研究開発が進められており、代表的な例としてボセンタンが肺動脈性高血圧に対する治療薬として使われている。一方、 $ET_B R$ 選択的なアゴニストは腫瘍細胞特異的な血圧降下作用を持ち、抗がん剤の効能を向上させることができるため、がんに対する化学療法として注目されている。本研究では、アゴニストやアンタゴニストがどのようにエンドセリン受容体に作用するのか、その分子機構を解明するために、ヒト由来 $ET_B R$ と様々なリガンドとの複合体のX線結晶構造解析を行った。その結果、ET-1 による $ET_B R$ 活性化機構やアンタゴニストによる阻害機構を解明し、構造に指南された、エンドセリン受容体を標的とする創薬が実現可能となった。

第1章では、エンドセリンや受容体の発見から、その生理機能、創薬標的としての可能性についての最新の知見を解説した。エンドセリン受容体に関して夥しい数の薬学的・医学的な研究が行われており、エンドセリン受容体に対して薬理活性を持つ化合物の発見やその臨床応用に寄与してきた。その一方で、薬剤やエンドセリンがどのようにエンドセリン受容体に作用するのか、変異体実験だけでは皆目見当がつかない状況であり、エンドセリン受容体の立体構造情報が待ち望まれていた。

第2章では、ヒト由来 $ET_B R$ の構造決定について示した。X線結晶構造解析のために、昆虫細胞発現系を用いてヒト由来 $ET_B R$ の大量発現に成功し、その精製系を確立した。しかし、野生型 $ET_B R$ は構造が柔軟で親水性領域が乏しく結晶構造解析が困難であった。構造を安定化し結晶化を促進するために、熱安定性変異の導入や細胞内第3ループに構造が安定

な T4L (T4 リゾチーム) を融合した結晶化に適する改変体 ET_BR-T4L を作製した。20 種類以上の異なる融合位置の ET_BR-T4L を発現・精製し結晶化を試みた結果、ヒト由来 ET_BR と ET-1 の複合体を分解能 2.8 Å で決定した。さらに、T4L を構造の柔軟な領域を削った mT4L に改変することによって、リガンド非結合状態の不活性型の ET_BR 構造を分解能 2.5 Å で決定した。アンタゴニストとの結合能を下げていた熱安定性変異の一部を戻すなどの工夫を行った結果、ボセンタンおよびその誘導体が結合した ET_BR 構造をそれぞれ分解能 3.5 Å、2.2 Å で決定した。

第 3 章では、複合体構造から得られた ET-1 と ET_BR の相互作用について示した。ET-1 は、ET_BR の細胞外領域の β シートや N 末端領域を含めた、7 本の膜貫通領域で構成されている結合ポケット全体と密な相互作用を形成していた。特に、ET_BR の細胞外領域が ET-1 を上から覆う蓋のような構造を形成していた。ET-1 と ET_BR の相互作用面積は約 1,500 Å² であり、これまでに決定されたリガンド-GPCR 間の相互作用の中で最も広範であった。こうした特徴は、ET-1 の ET_BR に対する高親和性かつ不可逆な結合に寄与すると考えられた。ET-1 の活性に重要な C 末端は、ET_BR の結合ポケットの奥深くに位置しており、K181, K273, R343 といった ET_BR の正電荷を持つ残基と強固に結合していた。

第 4 章では、リガンド非結合型の ET_BR 構造の詳細を示した。リガンド非結合状態では、結合ポケットは大きく開いた状態であり、ET-1 のような大きなペプチドを受容するために重要であると考えられた。ET-1 結合型との比較から、TM 6、7 の結合ポケット内部への 4 Å の大きな構造変化が ET-1 の結合および受容体活性化に重要であることが明らかになった。ペプチド受容性 GPCR のリガンド非結合状態の構造はこれが世界初であり、世界に先駆けてペプチド受容性 GPCR の構造変化を解明した。

第 5 章では、アンタゴニストが結合した ET_BR 構造の詳細を示した。ボセンタンは受容体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正電荷をもつ ET_BR の側鎖と相互作用していた。この事実は、ET_BR への結合にはリガンドの負電荷が、正電荷をもった ET_BR の残基によって認識されることがリガンド結合に重要であることを示している。ボセンタンは世界初の経口投与可能な ETR アンタゴニストであり、ETR アンタゴニストの大部分はボセンタンの誘導体である。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 ETR 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。リガンド非結合型の全体構造や膜貫通領域の配置はボセンタン結合型と酷似しており、ボセンタンは TM6、7 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ことを明らかにした。

第 6 章では総合討論として、本研究で明らかになったアゴニストやアンタゴニストの作用機序の構造基盤を元に、今後どのようにエンドセリン受容体に対する新規薬剤を設計していけばよいのかを議論した。