

特集：ソフトな相互作用による膜インターフェイスの機能制御

クラス B GPCR 細胞外ドメインのペプチドリガンド分子認識機構

天野 剛 志¹, 廣 明 秀 一¹, 白 川 昌 宏²

Gタンパク質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) は、7回膜貫通型の膜タンパク質であり、光や化学物質など細胞外からのシグナルを受容し、Gタンパク質などを介してそのシグナルを細胞内へ伝える役割を果たしている。ヒトにも約800種類に及ぶGPCRが様々な生命機能を担っていると考えられており、医薬品開発において重要なターゲット群となっている。2007年から今年にかけて、クラスBに分類されるGPCRの細胞外ドメインとリガンド分子との複合体構造が相次いで報告され、これらの受容体の高いリガンド分子認識機構を理解する上で大きな進展があった。本稿ではこれら複合体構造について概説し、クラスB GPCRのリガンド分子認識機構と受容体活性化のモデルについて紹介する。

1. はじめに

ポストゲノムプロジェクトの一環として進められたタンパク質の立体構造決定プロジェクトにより、構造生物学関連のインフラは著しく整備され、数多くの可溶性タンパク質の立体構造が決定された。一方、膜タンパク質においては、その発現・可溶化・精製・結晶化の各条件の検討が必須であり、可溶性タンパク質に比べると構造解析例は少数である。その傾向はGPCRで特に顕著で、2000年にウシ由来ロドプシンの構造¹⁾が初めて報告されて以来、立体構造の報告は久しく途絶えていた。その理由として、GPCRの構造解析においては、リコンビナントタンパク質の大量

調製が困難であること、糖鎖などの翻訳後修飾や可溶化に用いる界面活性剤によってサンプルが不均一になりやすいこと、活性状態と不活性状態の動的平衡に起因する内部の構造の揺らぎが存在することなどが結晶化の障害となっていたからである。

むしろ構造生物学者が手をこまねいていたわけではなく、発現系や界面活性剤の条件検討を地道に行ったり、脂質キュービック相法や可溶化パートナーとしてのモノクローナル抗体の使用など様々な方法を編み出したりしてきた。そして2007年後半になって、GPCRとしては2種類目、リガンド受容型のGPCRとしては初めてとなるアドレナリンβ2受容体の結晶構造が報告された²⁻⁵⁾。詳細については原著、および他のレビュー⁶⁻⁹⁾を参照されたい。さらにごく最近、スルメイカ由来ロドプシン¹⁰⁻¹¹⁾とウシ由来オプシン (リガンド非結合型)¹²⁾の結晶構造が相次いで報告され、構造生物学的な観点からのGPCRのリガンド分子認識機構および活性化機構の解明が進みつつある。

著者らは、以前から下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PACAP) とその受容体である PAC1 に関する研究に携わった。さらに最近では血管作働性腸管ポリペプチド (vasoactive intestinal polypeptide; VIP) とその受容体である VPAC1, VPAC2 の構造とリガンド分子認識機構について NMR を使って解析を進めている。これらの受容体はク

¹ 神戸大学大学院医学研究科生化学・分子生物学講座構造生物学分野 (〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1)

² 京都大学大学院工学研究科 (〒615-8510 京都府京都市西京区京都大学桂)

Molecular mechanism for the ligand recognition by the extracellular domain of class B GPCR

¹ Takeshi Tenno and Hidekazu Hiroaki (Division of Structural Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University, 7-5-1 Suehiro-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan)

² Masahiro Shirakawa (Graduate School of Engineering, Kyoto University, Nishikyō-ku, Kyoto 615-8510, Japan)

表1 ヒトのクラス B GPCR

受容体名	主なりリガンド名	主な機能	PDB	参照
CALCR	カルシトニン (CT)	カルシウム濃度調節		39
CALRL	カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)	血管拡張		40
CRFR1	コルチコトロピン放出因子 (CRF) ウロコルチン (UCN)	副腎皮質刺激ホルモン分泌		41, 42
CRFR2	UCN	ストレス応答	1U34 (ドメイン単独) 2JNC (ドメイン単独) 2JND (複合体)	41, 42
GHRHR	成長ホルモン放出ホルモン (GHRH)	成長ホルモン分泌		43
GIPR	グルコース依存性インスリン分泌刺激 ポリペプチド (GIP)	インスリン分泌	2QKH (複合体)	44
GLP1R	グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)	インスリン, グルカゴン分泌	3C59 (複合体)	44
GLP2R	グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2)	腸管陰窩の細胞増殖		44
GLR	グルカゴン	グルコース代謝調節		45
PAC1	下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポ リペプチド (PACAP)	神経伝達	2JOD (複合体)	46
PTH1R	副甲状腺ホルモン (PTH) 副甲状腺関連ペプチド (PTHrP)	カルシウム濃度調節	3C4M (複合体)	47
PTH2R	TIP39	痛覚		47
SCTR	セクレチン	唾液分泌		48
VPAC1	血管作働性腸管ポリペプチド (VIP) PACAP	血管拡張, 筋弛緩など		49
VPAC2	VIP PACAP	血管拡張, 筋弛緩など		49

略語: CT: calcitonin, CGRP: calcitonin gene-related peptide, CRF: corticotropin-releasing factor, UCN: urocortin, GHRH: growth hormone-releasing hormone, GIP: glucose-dependent insulinotropic peptide, GLP: glucagon-like peptide, PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating enzyme, PTH: parathyroid hormone, PTHrP: parathyroid hormone-related protein, TIP39: tuberoinfundibular peptide of 39 residues, VIP: vasoactive intestinal peptide

ラス B に分類される GPCR であり, まだ全長構造は報告されていない。しかし, クラス B に特徴的な N 末端細胞外ドメインについては, 急速に構造的知見が得られてきており, 受容体活性化への最初のステップに対する構造的基盤が明らかになりつつある。本稿では報告された複合体構造について概説し, 脂質分子との相互作用によるペプチドリガンドのコンフォメーション変化を示す著者らのデータと合わせて, クラス B GPCR のリガンド分子認識機構と受容体活性化のモデルについて紹介する。

2. クラス B GPCR 細胞外ドメインとリガンド分子

1) 細胞外ドメイン

ゲノム配列を解析した結果から, ヒトでは約 800 種類の GPCR が存在するといわれている¹³⁾。アミノ酸配列を基にした分類¹⁴⁾では, クラス A には約 670 種類のヒト GPCR

が含まれており, すでに立体構造の報告されたロドプシンやアドレナリン β_2 受容体, オプシンはすべてクラス A に含まれる。一方, クラス B (クラス II またはセクレチンファミリーともいう) は表 1 に示すように, 15 種類のヒト GPCR が含まれている (クラス B には N 末端に長い細胞外領域をもつ LN7TM ファミリーも含まれているが, 異なるサブファミリーとして分類されることもあるため, 今回は除くことにする)。これらの GPCR はペプチドリガンドを認識して細胞内シグナルを活性化または抑制しており, 分泌系, 免疫系, 神経系, 代謝系, 血管系, 呼吸器系など生体内の様々な器官で広範な役割を果たしている。

クラス A と比べてクラス B の GPCR で大きく異なる点は, N 末端に 90~160 アミノ酸からなる細胞外ドメインが存在することである。このドメインはペプチドホルモンの結合には必須であるけれども, 図 1a に示すようにそれぞ

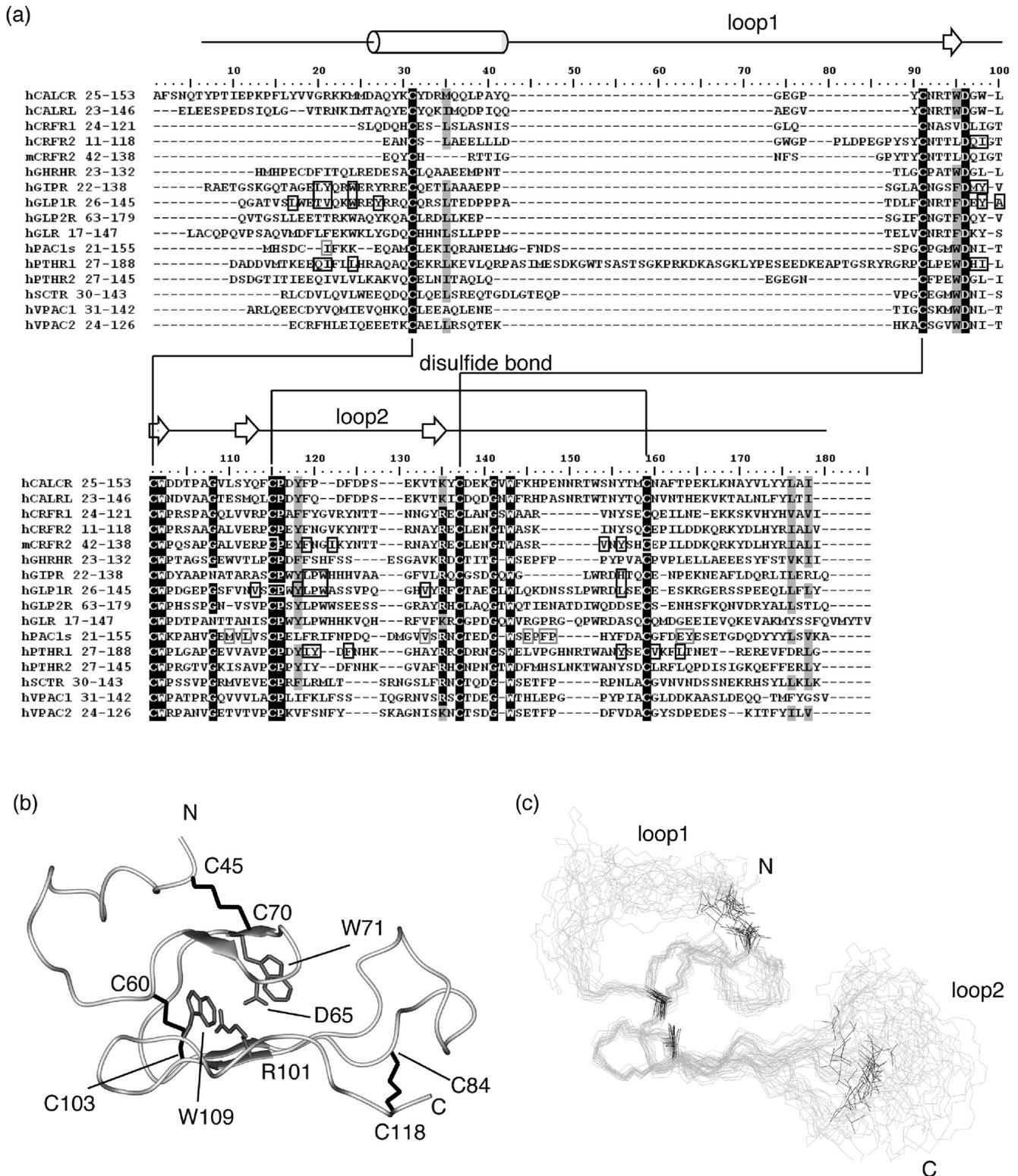


図1 クラス B GPCR の細胞外ドメインのアミノ酸配列と構造

(a) クラス B GPCR の細胞外ドメインのマルチプルアライメント. 受容体名の最初の小文字は, h: ヒト, m: マウスを示す. 分子内ジスルフィド結合を形成するシステイン残基を線で結んでいる. 受容体間で完全に保存されている残基を黒, 70% 以上保存されている残基を灰色で示している. 細胞外ドメインとペプチドリガンドとの間の疎水性相互作用に寄与している残基を黒色の枠で囲んでいる. hPAC1s の灰色の枠で囲んだ残基は, 変異導入により K_D が 2 倍以上低下した残基である²⁷⁾. アライメントの上部に示した二次構造は, hPAC1s の構造を示している. (b) マウス CRF2 β 受容体の細胞外ドメイン単独の構造 (PDB 2JNC). ジスルフィド結合を黒色, 受容体間で保存されているトリプトファン残基, アスパラギン酸残基, アルギニン残基を濃い灰色で示す. (c) CRF2 β 受容体の細胞外ドメイン単独の主鎖構造 20 個の重ね合わせ (PDB 2JNC). 立体構造図の作成は全て MOLMOL⁵⁰⁾を使用した.

に運動性の高い2箇所ループ領域に分かれることが明らかとなった(図1c)。

2) ペプチドリガンド

クラスB GPCRに結合する内在性リガンドは、カルシトニンファミリー、PACAP/グルカゴンファミリー、副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone; PTH)ファミリー、CRFファミリーに分類され、ペプチドホルモン、神経ペプチドとして様々な生理的機能を担っている。これらは長い前駆体ペプチドとして発現し、エンドペプチダーゼなどによるプロセッシングを受ける。そして、その多くはペプチジルグリシン α -アミド化モノオキシゲナーゼにより、ペプチドのC末端がアミド化される。図2aに示すように、成熟後のペプチドリガンドの長さは27~84残基までと様々であり、アミノ酸配列の保存性もN末端とC末端側を除いてほとんどない。N末端もしくはC末端側を欠損したペプチドを使った生化学的実験から、受容体の活性化にはN末端が、受容体への結合にはC末端側が必要であることが明らかとなっている^{16,17)}。

これらのペプチドの水溶液における構造をCDやNMRで解析すると、基本的には一定の構造をもたないランダムコイルの状態である。しかしながら、トリフルオロエタノール(trifluoroethanol; TFE)やジメチルスルホキシド(dimethylsulfoxide; DMSO)などの有機溶媒混合溶液や、生体膜環境に近いと考えられているドデシルホスホコリン(dodecylphosphocholine; DPC)ミセルに結合した状態では、これらのペプチドは両親媒性の α ヘリックスを形成している(図2b, c)^{18~22)}。著者がNMRで解析したPACAPについても、PACAP27²³⁾およびPACAP38(立石, PDB:2D2P)は、 α ヘリックスを形成しDPCミセルに結合していた。同様にVIP²⁴⁾においても、DPCミセルに結合した状態ではヘリックスに近いコンフォメーションをとっていることを示すNMRスペクトルが得られた(図2d, e)。一方、DMPC(1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)二重膜に結合した状態のPACAP21およびPACAP27の固体NMR解析により、これらのペプチドは伸びきったコンフォメーションをとっていることが示された²⁵⁾。したがって、クラスB GPCRに結合するペプチドリガンドは、周囲の環境に応じて異なるコンフォメーションをとる可能性が考えられる。

3. 細胞外ドメイン-ペプチドリガンド複合体構造

1) 複合体構造

前述のように2007年から今年にかけて、クラスB GPCRの細胞外ドメインとペプチドリガンドとの複合体構造が相次いで報告された(表1)。これらの構造のうち、CRF2 β 受容体(マウス)²⁶⁾とPAC1受容体(ループ2領域

が短いプライシングバリエーション)²⁷⁾についてはNMRで、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド(glucose dependent insulinotropic polypeptide; GIP)受容体²⁸⁾、グルカゴン様ペプチド(glucagon-like peptide; GLP)-1受容体²⁹⁾、PTH1受容体³⁰⁾についてはX線結晶法により解析された(図3a-e)。

まず各受容体の細胞外ドメインに注目すると、N末端の α ヘリックスやコア領域にある2組の逆平行 β シートは、ほぼ保存されていた(ただし、CRF2 β 受容体は α ヘリックスを形成すると思われる領域の途中から発現させているためか、 α ヘリックスは存在しない。またGLP-1受容体には5番目の β -ストランドが、GIP受容体とPTH1受容体には2本目の α -ヘリックスが、それぞれC末端側に存在する)。そして、受容体間で保存されているトリプトファン残基、システイン残基とジスルフィド結合は、立体構造上でもほぼ同じ位置に存在していた。したがって、クラスB GPCRの細胞外ドメインは、アミノ酸配列の保存性は低いにもかかわらず、一部の高度に保存されたアミノ酸によってそれらの基本フォールドが維持されていることが明らかとなった(図4a)。

唯一ドメイン単独とペプチドリガンドとの複合体の両方の構造が報告されているCRF2 β で比較すると、リガンドの結合により細胞外ドメインの構造は大きくは変化しないことが分かる。しかしながら、リガンドが主に相互作用しているループ2に注目すると、ドメイン単独の時は運動性が非常に高く一定の構造を保っていないのに対し、複合体を形成するとその運動性は抑えられ、リガンドをしっかりと包み込むかのようなコンフォメーションに固定されていた(図4b)^{15,26)}。その他の受容体ではドメイン単独の構造は報告されていない。しかし、各受容体のループ2領域はアミノ酸配列が特に保存されておらず、ループの長さも異なる。CRF2 β と同じようにドメイン単独の時は一定の構造をもたず、リガンドと相互作用することによってそのリガンドをしっかりと保持するコンフォメーションをとる可能性もある。

次にペプチドリガンドに注目すると、いずれもヘリックス構造を形成し、細胞外ドメインに相互作用していた(図3a-e)。それらの相互作用領域は、リガンドのC末端側が中心であり、今までに報告されていた生化学的解析の結果と一致していた。さらに、唯一アゴニストとの複合体であるGIPR-GIP複合体の構造(図3c)²⁸⁾では、受容体の活性化に重要なN末端側は細胞外ドメインの外部へ突き出していることが分かった。構造が報告されている他の4種類の複合体においても、結合しているリガンドのN末端はいずれも細胞外ドメインの外側に向いていた(図3a, b, d, e)^{26,27,29,30)}。これらのリガンドはアゴニストのN末端を欠損させたアンタゴニストであるので、その他4種類の細

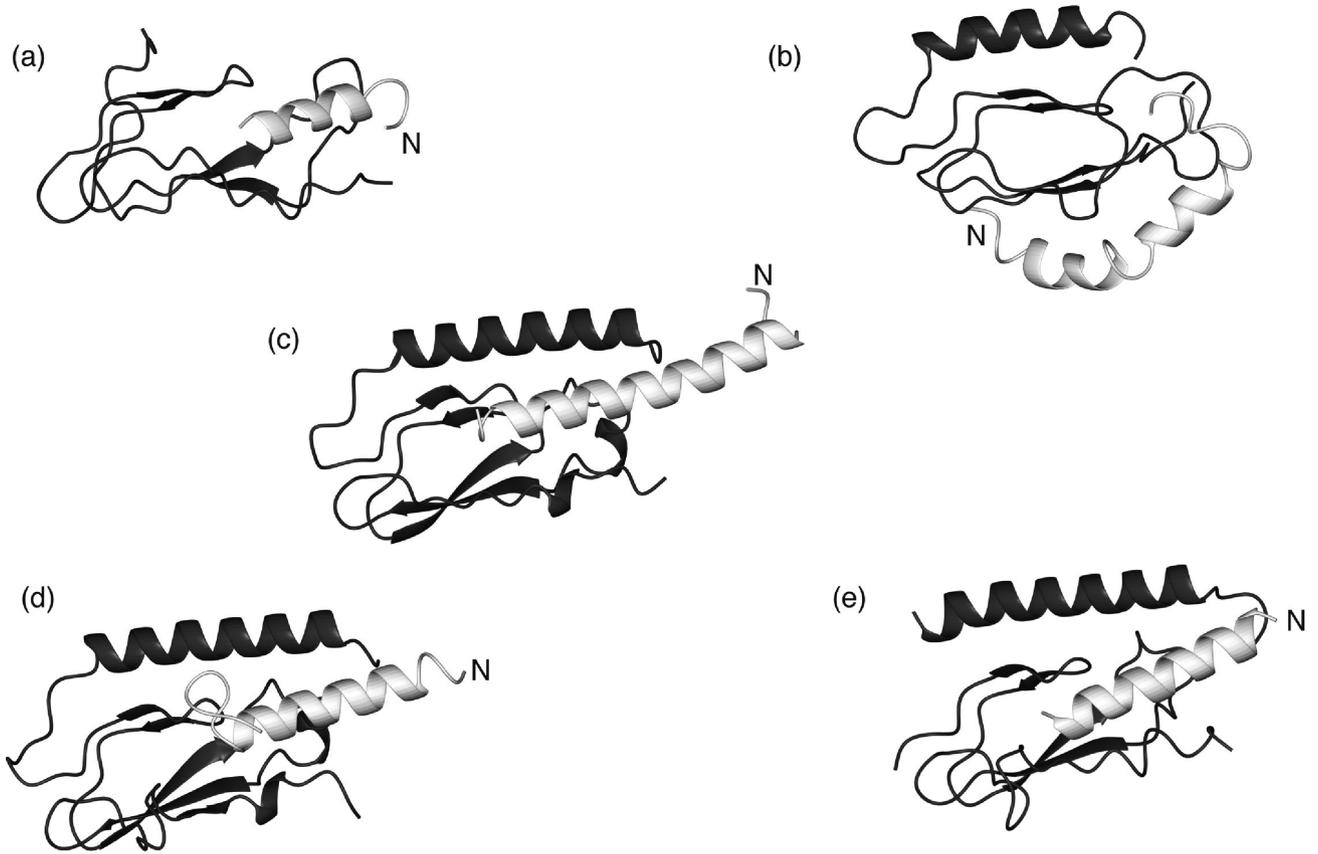


図3 クラス B GPCR の細胞外ドメインとペプチドリガンドとの複合体構造 (a) CRF2 β -アストレシン (アンタゴニスト)²⁶⁾, (b) PAC1s-PACAP38 (6-38) (アンタゴニスト)²⁷⁾, (c) GIPR-GIP (1-42) (アゴニスト)²⁸⁾, (d) GLP-1R-Exdein-4 (9-39) (アンタゴニスト)²⁹⁾, (e) PTH1R-PTH (15-34) (アンタゴニスト)³⁰⁾の複合体構造. 細胞外ドメインを黒色, ペプチドリガンドを灰色で示す.

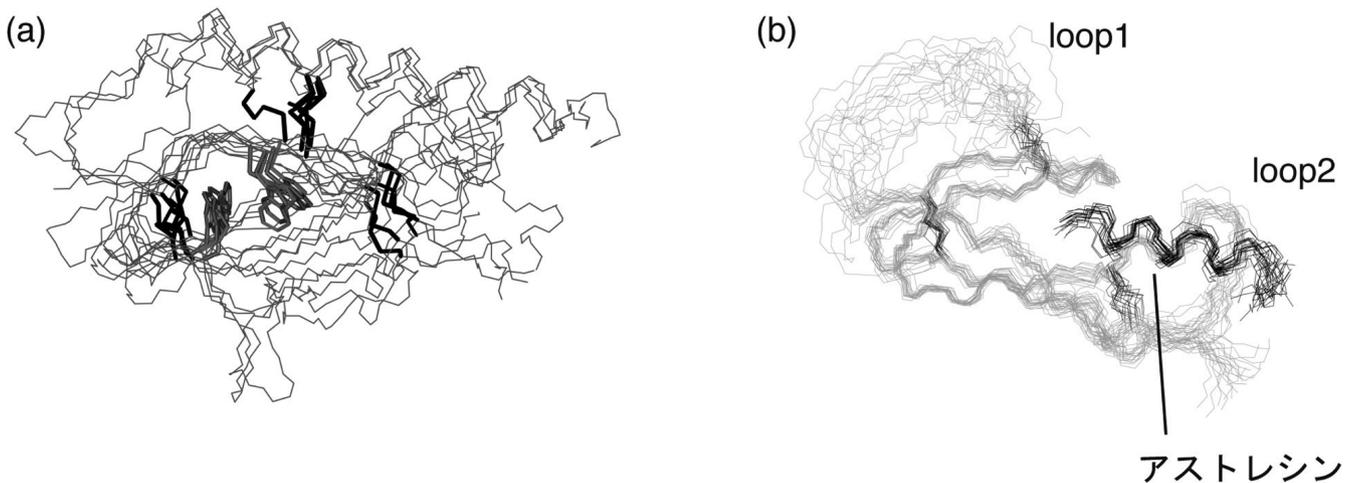


図4 複合体構造の比較 (a) 5種類の複合体のうち細胞外ドメインの主鎖構造のみを重ね合わせた図. ジスルフィド結合を黒色, 受容体間で保存されたトリプトファン残基を濃い灰色で示す. (b) CRF2 β -アストレシン複合体の20個の重ね合わせ図. 細胞外ドメインを灰色 (ジスルフィド結合は黒色), アストレシンを黒色で示す.

胞外ドメインにアゴニストが相互作用した場合は、それらのN末端は細胞外ドメインの外部へ突き出ているものと考えられる。したがって、一連の構造解析の結果は、ペプチドリガンドのC末端が受容体のN末端細胞外ドメインに結合する一方、リガンドのN末端は受容体の膜貫通領域の細胞表面側へ差し込まれて膜貫通ヘリックスまたは細胞外ループなどのN末端細胞外ドメイン以外の細胞外領域と相互作用することで受容体が活性化するというモデル^{15,31)}を支持する結果であった(後述)。

2) 細胞外ドメインのペプチドリガンド分子認識機構

報告された複合体の相互作用面に注目すると、受容体のN末端細胞外ドメインは α ヘリックスのN末端側、 β 1- β 2ストランドのリンカー領域、第2ループ、そしてC末端領域がリガンドとの主たるインターフェイスを構成していた(PAC1s受容体に関しては、相互作用面について詳細な記述がないため、変異体を使った結合実験の結果からの推測である)。その相互作用面には芳香族アミノ酸、ロイシン、バリンなど大きな側鎖をもつ疎水性残基が集まり、疎水性表面を形成していた。一方、リガンド側も受容体の細胞外ドメインと同様にインターフェイスに疎水性残基が並んでおり、細胞外ドメインとリガンドは主に疎水性相互作用によって結合していることが明らかとなった(図5a-e)²⁶⁻³⁰⁾。

興味深いことに、各受容体のほぼ同じ領域が相互作用面となっているにもかかわらず、受容体によってリガンドのトポロジーが異なっている。各複合体の構造について細胞外ドメインを基準に重ね合わせると、GIP受容体、GLP-1受容体、PTH1受容体は、ほぼ同じ位置にリガンドが配置されているのに対し、CRF2 β 受容体ではやや細胞外ドメイン側に寄っていた(図7)。さらにPAC1s受容体では他の4種類の受容体とは全く異なる位置にリガンドが存在し、その向きも反対であった。結合しているリガンドのトポロジーが違う理由の一つは、受容体によって相互作用面を構成している第2ループのアミノ酸配列が異なることで、ループのコンフォメーションおよび相互作用表面の形状が異なっている可能性が考えられる。さらに詳しく見てみると、疎水性相互作用に参与している疎水性残基が受容体やリガンドによって少しずつ異なっているため、これがリガンド特異性の一端を担っている可能性がある(図1a, 図2a)。

前述の疎水性相互作用以外に、細胞外ドメインとリガンドの間には、水素結合と静電的相互作用も存在していた。これらの相互作用は数としては少ないものの、リガンド特異性の鍵となっている可能性が指摘されている。CRF2 β 受容体-アストレシン複合体では、Glu86-Arg35間の静電的相互作用、Phe88カルボニル基-Asn34側鎖間の水素結

合がリガンド認識に重要であり、Asn34, Arg35に変異を導入すると親和性が低下した(図5a)²⁶⁾。またPTH1受容体-PTH(15-34)複合体では、Asp137-Arg20の静電的相互作用が重要であり、Arg20に変異を導入すると親和性が約半分に減少した(図5e)³⁰⁾。これらのリガンドのアミノ酸は、その他のペプチドリガンドには保存されていないので、特異性を決めている可能性がある(図2a)。

一連の複合体構造の報告からもう一つ重要な知見が得られた。それはペプチドリガンドのC末端アミド化の機能である。第2章で述べたように、内在性ペプチドリガンドの多くがアミド化酵素によってアミド基に変換されている。C末端がアミド化されると未修飾ペプチドよりも高い活性をもつことは知られていたが、詳しいメカニズムは分かっていなかった^{32,33)}。CRF2 β 受容体-アストレシン複合体の解析により、C末端アミド基が分子内水素結合によりヘリックス構造の安定化、分子間水素結合によって細胞外ドメインとの相互作用の安定化に寄与していることが明らかとなった(図5a)²⁶⁾。また、PTH1受容体-PTH(15-34)複合体においても、化学合成により残ったC末端アミド基が同様の水素結合を形成していた(図5e)。したがって、C末端アミド化されたペプチドリガンドは、より強く細胞外ドメインに相互作用することで高い活性を示す機構が示唆された。

3) クラスB GPCR活性化モデルとコンフォメーション変化

現在、クラスB GPCRにおいて提唱されている活性化メカニズムのモデルは、(1)ペプチドリガンドのC末端側が受容体の細胞外ドメインに結合し、(2)ヘリックスを形成したリガンドのN末端が受容体の膜貫通ヘリックスまたはN末端以外の細胞外領域と相互作用することで活性化するというものである。このモデルは「two-step binding model」^{15,26,31)}、または「two-domain model」^{16,17)}とよばれている。

このモデルで重要なのは、リガンドのC末端側がヘリックスを形成することである。実際にヘリックス形成能を弱めたリガンド変異体は、受容体の活性化能も低下すると報告されている^{19,34-36)}。一連の複合体の構造解析においても、ヘリックスの安定化に寄与すると思われるリガンド、実験条件が選ばれている²⁶⁻²⁹⁾。クラスBに結合するペプチドリガンドは、水溶液中ではランダムコイル、DMSOなどの疎水の環境下ではヘリックスを形成しているので、生体中では細胞外ドメインへ結合したとき、生体膜に結合したときにヘリックスを形成すると考えられる(図7)。

一方、リガンドのN末端は疎水的な環境下でも一定の構造をもっていない^{21-23,37)}。しかしながら、著者らが以前に決定したPAC1受容体に結合した状態のPACAP21の立体構造では、N末端の3残基は伸びた構造を、続く3-7番

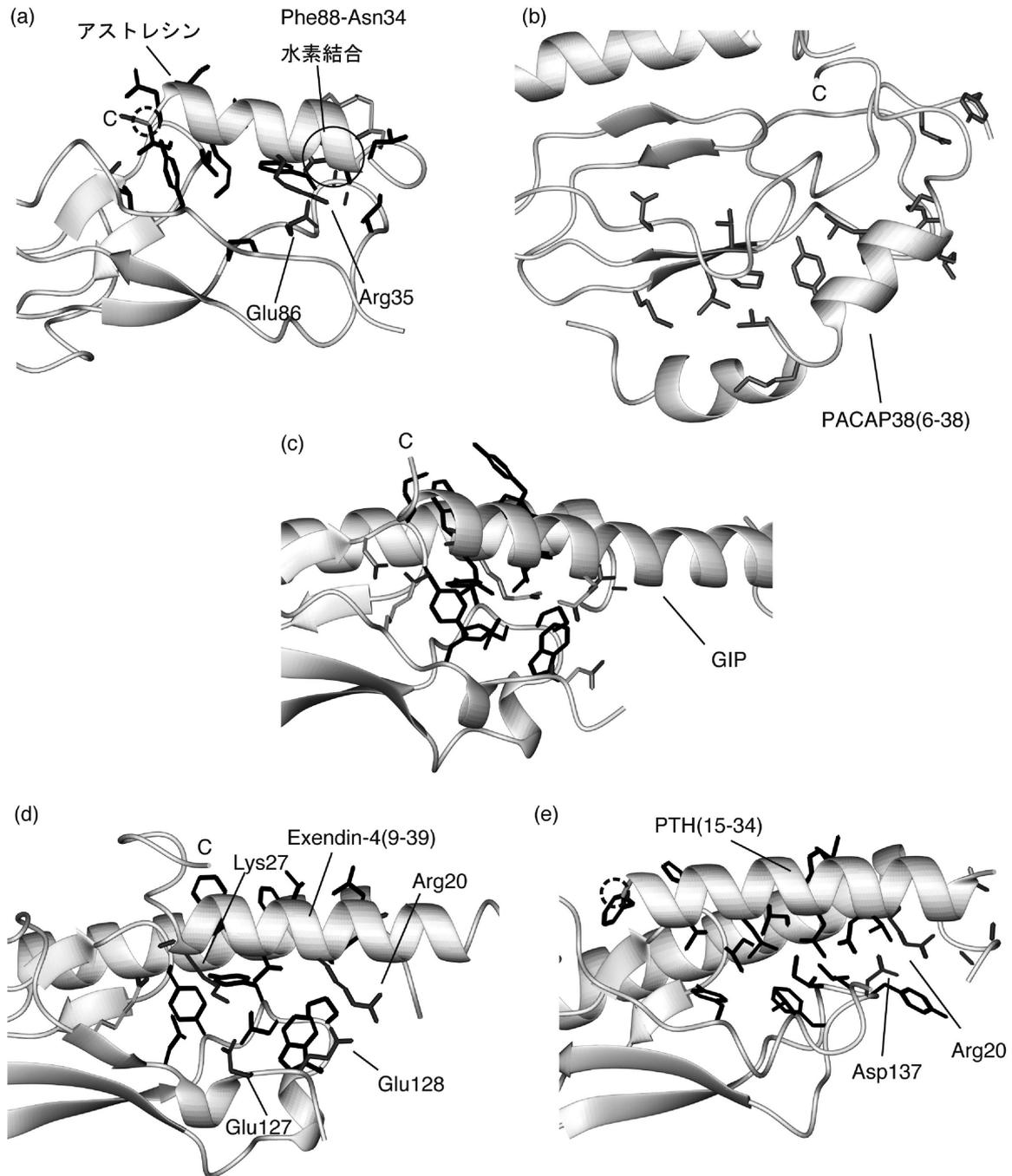


図5 リガンド分子認識の詳細

(a)CRF2 β -アストレシン, (b)PAC1s-PACAP38 (6-38), (c)GIPR-GIP (1-42), (d)GLP-1R-Exendin-4 (9-39), (e) PTH1R-PTH (15-34) 複合体のリガンド分子認識部位の拡大図。細胞外ドメイン、ペプチドリガンドを灰色で示す。各論文に記述されている分子間相互作用において重要な残基のうち、疎水性相互作用に関与するものは黒色、静電的相互作用および水素結合は濃い灰色で示す。特に重要な相互作用については、残基名を付記した。なお、(b)に関しては、詳細な相互作用機序について触れられていないので、変異導入により親和性が低下した残基(図2a)を示す。(a)と(e)の破線の丸印は、C末端アミド基の位置を示す。リガンドのC末端アミド基が相互作用に重要であると両論文にて指摘されているものの、PDBに登録されている座標データには含まれていなかった。

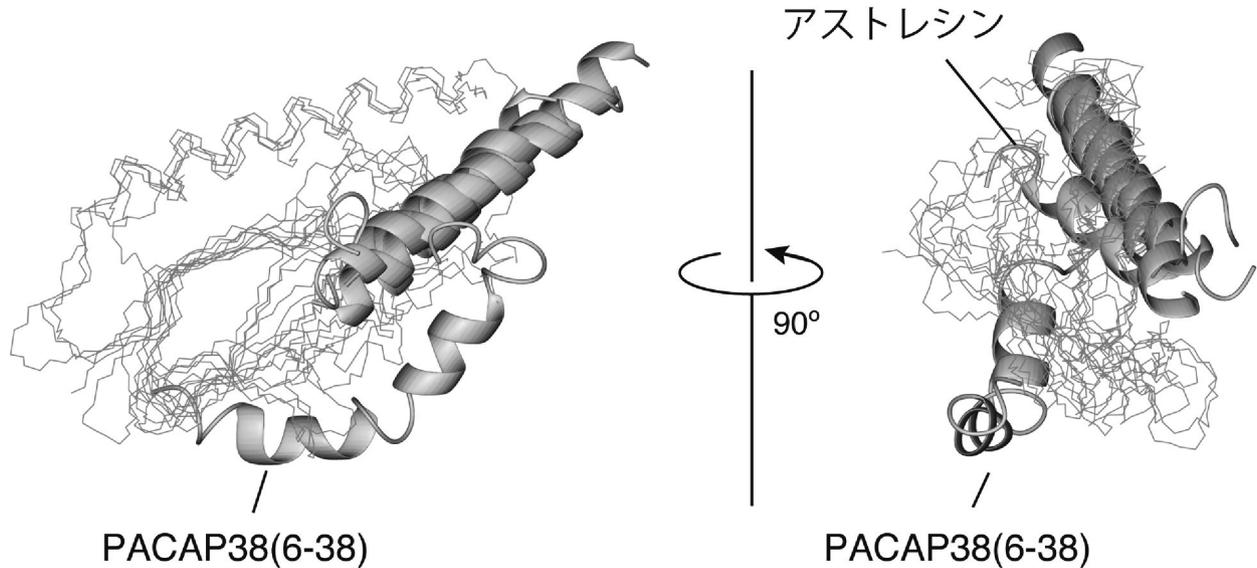


図6 各細胞外ドメインに結合したペプチドリガンドのトポロジー

5種類の複合体の受容体細胞外ドメインに対する重ね合わせ図。細胞外ドメインはラインで、ペプチドリガンドはリボンで示す。大きく異なるトポロジーを示したリガンドについてはその名前を付記した。

目の残基はII'型とI型の β ターンを有する特異な β コイル構造をもっていた²³⁾。この結果は、ペプチドリガンドのN末端では、受容体の膜貫通領域に相互作用するときに、ランダムな構造から β コイル構造へのコンフォメーション変化が起きることを示唆している。そして、このコンフォメーション変化によって生じる疎水性表面と塩基性表面は、受容体への結合において大きく寄与していた²³⁾。クラスB GPCRに結合するペプチドリガンドのN末端の配列は保存性が高いことから、PACAP以外のリガンドに関しても同様のコンフォメーション変化を起こす可能性がある^{17, 23)}。

以上のことから、ペプチドリガンドがクラスB GPCRに結合する際には、リガンド側では2回のコンフォメーション変化、受容体側では細胞外ドメインのループのコンフォメーション変化を伴っており、これらの変化が受容体の活性化に重要であると考えられる。

4. おわりに

GPCRの活性化では、リガンド分子の結合により受容体の膜貫通領域のコンフォメーションが変化し、その変化がさらに細胞内ループのコンフォメーションを誘起し、最終的に細胞内のヘテロ三量体Gタンパク質を活性化していると考えられている。本稿で紹介した研究などから、クラスB GPCRの系で分子間相互作用によって生じるリガンドや受容体のN末端細胞外ドメインのコンフォメーション変化が明らかとなった。しかしながら、受容体活性化機構の解明までにまだ多くの課題が残っている。クラスB GPCRには、現在までに膜貫通領域の構造は報告されてお

らず、クラスA GPCRの結晶構造からモデルを構築して検証している段階である。また、リガンドが受容体の細胞外ドメインに結合したあと、そのN末端はどのように受容体の他の部分へ提示されるのか、今のところ不明である。そしてリガンド認識機構についても、創薬に重要な特異性を見いだすためには、より多くの複合体の構造情報が必要である。

この数年でGPCRの構造生物学的研究は急速に進展しており、本稿を執筆している最中にもアドレナリン β 1受容体の結晶構造がネイチャー誌に発表された³⁸⁾。GPCRの分子認識機構、活性化機構を解明する上で、構造情報は非常に有用な情報であるので、今後報告される構造解析の結果に注目したい。

文 献

- 1) Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Trong, I.L., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., & Miyano, M. (2000) *Science*, 289, 739-745.
- 2) Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T. S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R. P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F.X., Weis, W.I., & Kobilka, B.K. (2007) *Nature*, 450, 383-388.
- 3) Day, P.W., Rasmussen, G.F., Parnot, C., Fung, J.J., Masood, A., Kobilka, T.S., Yao, X.-J., Choi, H.-J., Weis, W.I., Rohrer, D.K., & Kobilka, B.K. (2007) *Nature Methods*, 4, 927-929.
- 4) Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S. G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., & Stevens, R.C. (2007) *Science*, 318, 1258-1265.

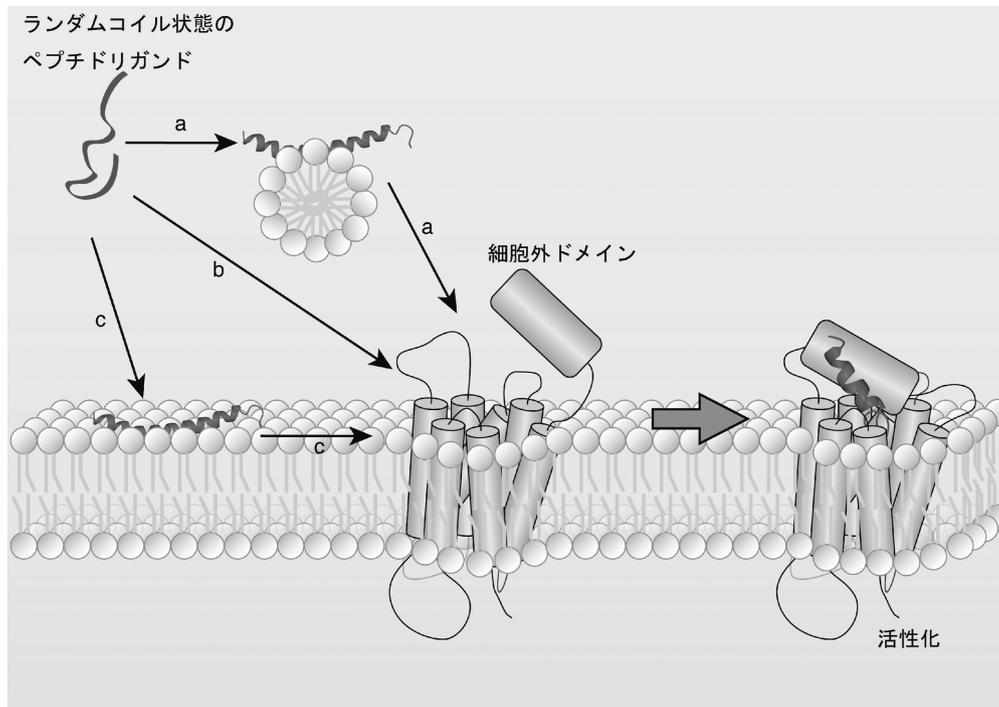


図7 クラス B GPCR のリガンド分子認識および活性化のモデル

受容体の膜貫通ヘリックスを円柱，細胞外ドメインを長方形，ペプチドリガンドをリボンで示す。溶液中ではペプチドはランダムコイル状態のコンフォメーションをとっている（左上）。a：リガンドは，細胞外の脂質ミセルなどに非特異的相互作用することによりヘリックスを形成して，そして細胞外ドメインに結合する，b：直接細胞外ドメインに相互作用してヘリックスを形成する，c：細胞膜に非特異的相互作用することによりヘリックスを形成して，そして細胞外ドメインに結合する（中央）。受容体の細胞外ドメインに結合したペプチドリガンドのN末端が受容体の膜貫通領域に相互作用して，受容体を活性化する（右）。相互作用の際には，ペプチドリガンドのN末端は特異的な β ターン構造をとっている。

- 5) Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S. G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Yao, X.-J., Weis, W.I., Stevens, R.C., & Kobilka, B.K. (2007) *Science*, **318**, 1266–1273.
- 6) Kobilka, B. & Schertler, G.F.X. (2008) *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**, 79–83.
- 7) Shukla, A.K., Sun, J.-P., & Lefkowitz, R.J. (2008) *Mol. Pharmacol.*, **73**, 1333–1338.
- 8) Audet, M. & Bouvier, M. (2008) *Nature Chem. Biol.*, **4**, 397–403.
- 9) 天野剛志，廣明秀一(2008)蛋白質核酸酵素，**53**，256–264.
- 10) Murakami, M. & Kouyama, T. (2008) *Nature*, **453**, 363–367.
- 11) Shimamura, T., Hiraki, K., Takahashi, N., Hori, T., Ago, H., Masuda, K., Takio, K., Ishiguro, M., & Miyano, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 17753–17756.
- 12) Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.-W., & Ernst, O.P. (2008) *Nature*, **454**, 183–187.
- 13) Gloriam, D.E., Fredriksson, R., & Schiöth, H.B. (2007) *BMC Genomics*, **8**, 338–405.
- 14) Horn, F., Bettler, E., Oliveira, L., Campagne, F., Cohen, F.E., & Vriend, G. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 294–297.
- 15) Grace, C.R.R., Perrin, M.H., DiGruccio, M.R., Miller, C.L., Rivier, J.E., Vale, W.W., & Riek, R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12836–12841.
- 16) Hoare, S.R.J. (2005) *Drug Discov. Today*, **10**, 417–427.
- 17) Neumann, J.-M., Couvineau, A., Murail, S., Lacapère, J.-J., Jamin, N., & Laburthe, M. (2008) *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 314–319.
- 18) Thornton, K. & Gorenstein, D.G. (1994) *Biochemistry*, **33**, 3532–3539.
- 19) Kapurniotu, A. & Taylor, J.W. (1995) *J. Med. Chem.*, **38**, 836–847.
- 20) Pellegrini, M., Royo, M., Rosenblatt, M., Chorev, M., & Mierke, D.F. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 10420–10427.
- 21) Kweon, J., Lee, H.-J., Kim, Y.-M., Choi, Y.-S., & Lee, K.-B. (1999) *FEBS Lett.*, **456**, 343–348.
- 22) Alaña, I., Malthouse, J.P.G., O’Harte, F.P.M., & Hewage, C. M. (2007) *Proteins*, **68**, 92–99.
- 23) Inooka, H., Ohtaki, T., Kitahara, O., Ikegami, T., Endo, S., Kitada, C., Ogi, K., Onda, H., Fujino, M., & Shirakawa, M. (2001) *Nature Struct. Biol.*, **8**, 161–165.
- 24) Tenno, T., Goda, N., Tateishi, Y., Tochio, H., Mishima, M., Hayashi, H., Shirakawa, M., & Hiroaki, H. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 305–314.
- 25) Komi, N., Okawa, K., Tateishi, Y., Shirakawa, M., Fujiwara, T., & Akutsu, H. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 3001–3011.
- 26) Grace, C.R.R., Perrin, M.H., Gulyas, J., RiGruccio, M.R., Cattle, J.P., Rivier, J.E., Vale, W.W., & Riek, R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4858–4863.
- 27) Sun, C., Song, D., Davis-Taber, R.A., Barrett, L.W., Scott, V. E., Richardson, P.L., Pereda-Lopez, A., Uchic, M.E., Solomon,

- L.R., Lake, M.R., Walter, K.A., Hajduk, P.J., & Olejniczak, E. T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7875–7880.
- 28) Parthier, C., Kleinschmidt, M., Neumann, P., Rudolph, R., Manhart, S., Schlenzig, D., Fanghänel, J., Rahfeld, J.-U., Demuth, H.-U., & Stubbs, M.T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13942–13947.
- 29) Runge, S., Thøgersen, H., Madsen, K., Lau, J., & Rudolph, R. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 11340–11347.
- 30) Pioszak, A.A. & Xu, H.E. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5034–5039.
- 31) Perrin, M.H., Grace, C.R.R., Riek, R., & Vale, W.W. (2006) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1070**, 105–119.
- 32) Prigge, S.T., Mains, R.E., Eipper, B.A., & Amzel, L.M. (2000) *Cell Mol. Life Sci.*, **57**, 1236–1259.
- 33) Walsh, G. & Jefferies, R. (2006) *Nature Biotechnol.*, **24**, 1241–1252.
- 34) Onoue, S., Matsumoto, A., Nagano, Y., Ohshima, K., Ohmori, Y., Yamada, S., Kimura, R., Yajima, T., & Kashimoto, K. (2004) *Eur. J. Pharmacol.*, **485**, 307–316.
- 35) Rijkers, D.T.S., Kruijtzter, J.A.W., van Oostenbrugge, M., Ronken, E., den Hartog, J.A.J., & Liskamp, R.M.J. (2004) *ChemBioChem*, **5**, 340–348.
- 36) Peggion, E., Mammi, S., Schievano, E., Silvestri, L., Schiebler, L., Bisello, A., Rosenblatt, M., & Chorev, M. (2002) *Biochemistry*, **41**, 8162–8175.
- 37) Neidigh, J.W., Fesinmeyer, R.M., Prickett, K.S., & Andersen, N.H. (2001) *Biochemistry*, **40**, 13188–13200.
- 38) Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G.W., Tate, C.G., & Schertler, G.F.X. (2008) *Nature*, in press.
- 39) Pondel, M. (2000) *J. Exp. Pathol.*, **81**, 405–422.
- 40) Brain, S.D. & Grant, A.D. (2003) *Physiol. Rev.*, **84**, 903–934.
- 41) Dautzenberg, F.M., Kilpatrick, G.J., Hauger, R.L., & Moreau, J.-L. (2001) *Peptides*, **22**, 753–760.
- 42) Dautzenberg, F.M. & Hauger, R.L. (2002) *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 71–77.
- 43) Lin-Su, K. & Wajnrach, M.P. (2002) *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **3**, 313–323.
- 44) Baggio, L.L. & Drucker, D.J. (2007) *Gastroenterology*, **132**, 2131–2157.
- 45) Sherwood, N.M., Krueckl, S.L., & McRory, J.E. (2000) *Endocr. Rev.*, **21**, 619–670.
- 46) Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., & Vaudry, H. (2000) *Pharmacol. Rev.*, **52**, 269–324.
- 47) Gensure, R.C., Gardella, T.J., & Jüppner, H. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **382**, 666–678.
- 48) Chu, J.Y.S., Yung, W.H., & Chow, B.K.C. (2006) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1070**, 27–50.
- 49) Groneberg, D.A., Rabe, K.F., & Fischer, A. (2006) *Eur. J. Pharmacol.*, **533**, 182–194.
- 50) Koradi, R., Billeter, M., & Wüthrich, K. (1996) *J. Mol. Graph.*, **14**, 51–55.
-