

- 12) Cao, Z., Tavender, T.J., Roszak, A.W., Cogdell, R.J., & Bulleid, N.J. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 42257–42266.
- 13) Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T., & Hendershot, L. M. (2002) *Mol. Biol. Cell*, 13, 4456–4469.
- 14) Rutkevich, L.A., Cohen-Doyle, M.F., Brockmeier, U., & Williams, D.B. (2010) *Mol. Biol. Cell*, 21, 3094–3105.
- 15) Jeso, B.D., Park, Y., Ulianich, L., Treglia, A. S., Urbanas, M. L., High, S., & Arvan, P. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, 25, 9793–9805.
- 16) Kang, K., Park, B., Oh, C., Cho, K., & Ahn, K. (2009) *Anti-oxid. Redox Signal.*, 11, 2553–2561.
- 17) Williams, D.B. (2006) *J. Cell Sci.*, 119, 615–623.
- 18) Jessop, C.E., Tavender, T. J., Watkins, R.H., Chambers, J.E., & Bulleid, N.J. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 2194–2202.

佐藤 吉美, 稲葉 謙次

(九州大学生体防御医学研究所蛋白質化学分野)

Protein disulfide bond formation system in mammalian cells
Yoshimi Sato and Kenji Inaba (Division of Protein Chemistry, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)
投稿受付:平成24年2月20日

ヒト由来ヒスタミン H1 受容体の結晶構造の決定

1. はじめに

Gタンパク質を介したシグナル伝達に関与しているGタンパク質共役型受容体(GPCR)は、ヒトに約800種類存在する膜タンパク質である。GPCRは、7本の膜貫通ヘリックス(TM1~TM7)を持つことで知られるが、一次配列や機能により6種類のクラスに分けられ、大半のものがクラスAに属す。GPCRは活性化状態と不活性化状態の平衡状態で存在していると考えられ、基底状態でもある程度の活性を持つ。GPCRのリガンドは効果により3種に分けられ、アゴニストは活性化状態に、インバースアゴニストは不活性化状態に平衡を偏らせる。アンタゴニストは、結合しても平衡状態に影響を与えない。生命に必須の役割を担っているGPCRは多くの疾患に関与し、30%を超える医薬品の標的ともなっている。GPCRの機能を解明するためにも、GPCRを標的とする薬剤を効率良く開発するためにも、GPCRの構造情報は必須であるが、その立体構造を決定することは難しい。そのため、われわれが最近発表

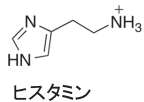
したヒスタミンH1受容体(H1R)¹⁾の構造より前には、構造既知のヒト由来GPCRは、β2アドレナリン受容体²⁾、アデノシンA2a受容体³⁾、CXCケモカイン受容体4(CXCR4)⁴⁾、ドーパミンD3受容体⁵⁾だけであった。本稿ではH1Rの結晶構造解析について紹介する。

2. ヒスタミン H1 受容体と抗ヒスタミン薬

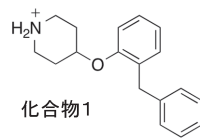
ヒスタミン受容体は、生体アミンの一種であるヒスタミンを受容するGPCRで、ヒトには機能の異なる4種類のヒスタミン受容体(H1R, H2R, H3R, H4R)が存在する。H1Rは全身に分布し、主に花粉症などのアレルギー反応に関与している。体内にアレルゲンが侵入すると肥満細胞からヒスタミンが放出される。そのヒスタミンが平滑筋や血管内皮細胞などに存在するH1Rに結合するとH1Rは活性化状態に平衡を偏らす。その結果、平滑筋収縮・血管拡張・血管透過性亢進などが引き起こされ、かゆみや鼻水などのアレルギー症状が発生する。一方、脳に発現しているH1Rは、脳内で神経伝達物質として働いているヒスタミンを受容し、睡眠覚醒サイクルの制御や記憶に関与している。

H1Rのインバースアゴニストである抗ヒスタミン薬は、H1Rを不活性化状態で安定化し、アレルギー症状を抑える。抗ヒスタミン薬は、ヒスタミンと同様に正電荷を持ち、ピリラミン、ドキシセピンなどの第一世代と、オロパタジン、フェキソフェナジンなどの第二世代に分類される(図1)。古くから使用されている第一世代抗ヒスタミン薬は、高い中枢移行性と低い受容体選択性のため多くの副作用を示す。高い中枢移行性は分子の疎水性に起因するが、血液脳関門を通過した第一世代抗ヒスタミン薬は、脳内のH1Rの働きを抑制して鎮静作用を示す。また、第一世代抗ヒスタミン薬はムスカリン受容体、セロトニン受容体、アドレナリン受容体などの他のアミン受容体にも結合し、それらの働きを抑制するため、抗コリン作用による口渇や目眩などの副作用を引き起こす。例えば、ドキシセピンはH1Rに対する親和性が0.69 nMと非常に高いが、セロトニン5-HT_{2A}受容体、ムスカリンM1受容体、アドレナリンα1受容体、ドーパミンD2受容体に対してもそれぞれ3.3 nM, 6.8 nM, 38 nM, 63 nMと高い親和性を示す⁶⁾。これに対し、第二世代抗ヒスタミン薬は、多くのものがカルボキシ基を持つため親水性が高くっており(図1)、血液脳関門を通過しにくくなって中枢移行性が低下し、鎮静作用が減少している。更に、第二世代抗ヒスタミン薬は、受容体選択性も改善され、抗コリン作用などの副作用

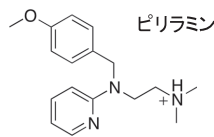
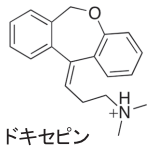
アゴニスト



フラグメント分子



第一世代抗ヒスタミン薬



第二世代抗ヒスタミン薬

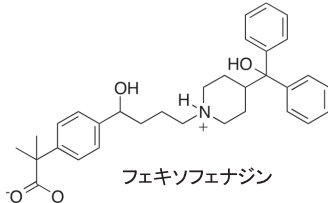
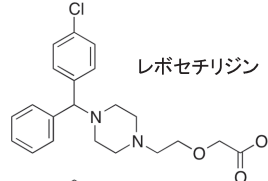
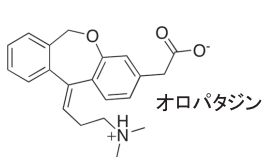


図1 ヒスタミン H1 受容体の各種リガンドの構造
第一、第二世代抗ヒスタミン薬の他に、アゴニストであるヒスタミンと、結晶構造を基に行った virtual screening により選択された化合物 1 の構造も示す。

も軽減している。しかしながら、第二世代抗ヒスタミン薬は第一世代抗ヒスタミン薬に比べ、H1R に対する親和性が低く、また、完全な効果がでるまで時間がかかるものもある。更に、重篤な副作用が報告される場合もあり、副作用がより少なく効果の高い抗ヒスタミン薬の開発が望まれる。そこでわれわれは、効率の良い薬剤開発に役立てるため、H1R の構造解析研究を行った。

3. ヒスタミン H1 受容体の大量発現と結晶化

GPCR の構造解析が難しい一因として、GPCR の細胞内での発現量が非常に低いため、結晶化に必要な量を天然の組織から精製することが難しいことがあげられる。そのため GPCR の構造解析研究において最初に行うことは、機能を保ったタンパク質の大量発現系を確立することである。われわれは、安価で簡単に培養できるメタノール資化

酵母 *Pichia pastoris* を用いて H1R の大量発現に成功した⁷⁾。これに対し、H1R 以外のヒト由来 GPCR の構造解析研究では、培養コストが高く細胞の取り扱いも難しい昆虫細胞が大量発現に利用されている²⁻⁵⁾。大量発現させたコンストラクトは、H1R の二カ所の糖鎖結合部位を含む N 末端の 19 残基を削り、更に、柔軟性が高く構造をとりにくいとされる細胞内第三ループを T4 リゾチームに置換して安定性を上昇させたものである。このコンストラクトは、ヒスタミンや抗ヒスタミン薬に対して野生型と同等の結合活性を持つ¹⁾。

H1R の結晶化は、 $\beta 2$ アドレナリン受容体²⁾の結晶化に用いられた lipidic cubic phase (LCP) 法で行った。LCP 法は、モノオレインなどの脂質二重膜内に精製した膜タンパク質を再構成して結晶化する手法で、膜タンパク質が生体内に近い環境で安定に存在できることや、脂質二重膜内に埋もれた疎水性領域でも結晶成長に必要な分子間接触が生じることにより、良質な結晶を得られる可能性が上昇する。結晶化に際しては、第一世代抗ヒスタミン薬であるドキシセピンを結合させ H1R を不活性化状態に固定した。

4. ヒスタミン H1 受容体の構造

われわれは、H1R の立体構造を 3.1 Å の分解能で決定した (図 2)。細胞内側、TM5 と TM6 の間には結晶化のために挿入された T4 リゾチームが存在するが、図 2 では簡便のため表示していない。GPCR の構造は、7 本の膜貫通ヘリックス領域は相同性が高いが、細胞膜外のループ領域は多様性に富むことが知られている⁸⁾。H1R の構造も同様で、膜貫通ヘリックス領域は、特にアミン受容体である $\beta 2$ アドレナリン受容体²⁾、ドーパミン D3 受容体⁵⁾と類似の構造をしていた (C α 原子位置の平均二乗偏差 1.3 Å)。また、最も類似性の低かったアデノシン A2a 受容体と比べても C α 原子位置の平均二乗偏差は 2.3 Å であった。一方、ループ領域に関しては構造の類似性が低く、他の GPCR で見られるヘリックスや β シートなどの二次構造も存在しなかった。ドキシセピンは、細胞膜の中心よりやや細胞外側に膜貫通ヘリックスに囲まれて結合していた (図 2)。構造精密化の過程で、ドキシセピン結合部位の細胞外側、リガンド結合ポケットの入口付近に、塩基性アミノ酸に囲まれた強い電子密度が観察された。われわれは、結晶化条件に 300 mM のリン酸アンモニウムが存在することを考慮し、この部位にリン酸イオンを当てはめた (図 2)。

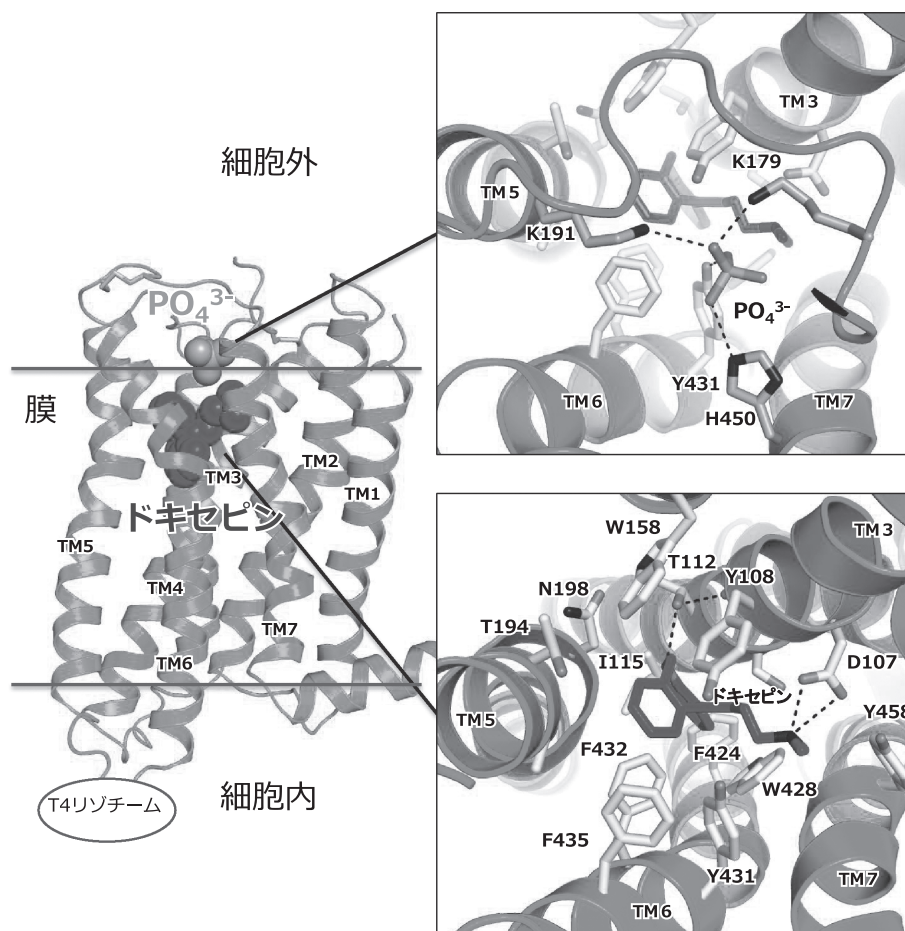


図2 ヒスタミン H1 受容体の構造
 枠内は、リン酸イオン結合部位 (上) とドキシセピン結合部位 (下) を細胞外側 (図の上側) から見た図。

5. 立体構造から解明された抗ヒスタミン薬の受容体選択性の分子機構と新規薬開発に向けた化合物の virtual screening

ドキシセピンは、その三級アミンの正電荷で、Asp107 と相互作用していた (図2)。このアスパラギン酸残基は、アミン受容体の TM3 上で完全に保存されており、他のアミン受容体の構造でも同様の相互作用がリガンドと受容体の間に形成されている^{2,5)}。また、変異型 H1R の研究から、この相互作用は抗ヒスタミン薬やヒスタミンの結合に必須であることが示されている⁶⁾。ドキシセピンの3つのリングは、更に奥の疎水性部位に結合しており、TM3 上の Tyr108, Ser111, Thr112, Ile115, TM4 上の Trp158, TM5 上の Thr194, Asn198, Phe199, TM6 上の Phe424, Trp428,

Tyr431, Phe432, Phe435, TM7 上の Tyr458 に囲まれている。このうち、Trp158 と Asn198 以外の残基は、他のアミン受容体で高度に保存されている。また、Trp158 と Asn198 は、ドキシセピンと僅かに相互作用しているだけである。更に、ドキシセピンは奥深くに結合しているため、リガンドの特異性に貢献する細胞外第二ループ上の残基⁹⁾とは相互作用していない。これらのことから、第一世代抗ヒスタミン薬が他のアミン受容体にも高い親和性を示す理由は、H1R の第一世代抗ヒスタミン薬結合部位の構造が、他のアミン受容体でも高度に保存されているためであることが明らかとなった。

リン酸イオンは、細胞外第二ループ上の Lys179, TM5 上の Lys191, TM6 上の Tyr431, TM7 上の His450 と相互作用していた (図2)。Tyr431 を除くこれらの残基は、他

のアミン受容体では全く保存されていないため、リン酸結合部位付近は、H1R に特有な構造であると考えられる。

次にわれわれは、第二世代抗ヒスタミン薬がH1Rに対して高い選択性を持つ理由を調べるために、結晶構造を基に第二世代抗ヒスタミン薬のドッキングモデルを計算した。図3に花粉症の薬としてもよく使われているオロパタジン(商品名アロレック)、レボセチリジン(同ザイザル)、フェキソフェナジン(同アレグラ)のモデル構造を示す。ドキシペミンにカルボキシ基が結合しただけのオロパタジン(図1)ではリン酸イオンも結合していたが(図3A)、他2種の薬剤ではカルボキシ基がリン酸イオン結合部位を占め、Lys179やLys191などと相互作用していた(図3B, C)。これらのことから、第二世代抗ヒスタミン薬の高い受容体選択性は、分子の一部がH1Rに特有な構造を持つ部位に結合するために生じていることが示唆された。

近年、fragment-based drug designと呼ばれる少数の原子からなるフラグメント分子を利用した創薬手法が注目されている。そこでわれわれは、H1Rの結晶構造を基に、フラグメント分子の virtual screening を行った¹⁰⁾。その結果、10万個のライブラリーから26種の化合物を選択することに成功した。そのうちの19種は実際に6 nM から10 μMの親和性を持っており、結晶構造を利用することにより高確率で薬剤候補化合物を選択できることを示した。そのう

ち最も親和性の高かった化合物1(図1)の結合モデルを図3Dに示す。

6. おわりに

本稿でも示したように、GPCRのリガンド結合部位は、各GPCRで構造の異なる細胞外ループ領域にも及ぶため、新規薬剤の開発には、既知構造を鋳型にした予測構造からの情報では限界があり、実際に薬剤の標的となるGPCRの構造情報が不可欠である。2007年に初めてのヒト由来GPCRとしてβ2アドレナリン受容体²⁾の立体構造が発表されて以降、ほぼ毎年のように新規のGPCRの構造が発表されている。今年は特に多く、本稿の締め切り直前になりムスカリンM2受容体¹¹⁾及びM3受容体¹²⁾、スフィンゴシン1-リン酸受容体¹³⁾の構造が発表され、更に、μ及びκ-オピオイド受容体の構造もProtein Data Bankに登録された。また、β2アドレナリン受容体¹⁴⁾とアデノシンA2a受容体¹⁵⁾については、アゴニストが結合した活性化状態の構造が昨年相次いで発表されている。機能的にも医薬の面からも重要なGPCRの構造は今後も次々と決定されるであろう。今後、これらの結晶構造が創薬に活用され、副作用が少なく効果の高い薬剤が迅速に効率良く開発されることを期待する。

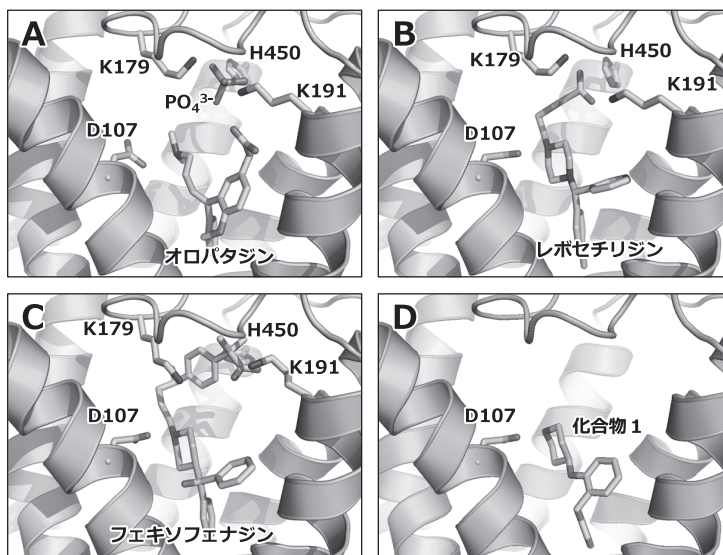


図3 第二世代抗ヒスタミン薬と化合物1の結合モデル

A) H1Rとオロパタジンの結合モデル。B) H1Rとレボセチリジンの結合モデル。C) H1Rとフェキソフェナジンの結合モデル。D) H1Rと化合物1の結合モデル。

謝辞

本研究は京都大学分子細胞情報学研究室の岩田想教授、The Scripps Research Institute の Raymond Stevens 教授、VU University Amsterdam の Rob Leurs 教授の共同研究として行われた。各ラボのメンバーに深く感謝致します。

- 1) Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., Kobayashi, T., Stevens, R.C., & Iwata, S. (2011) *Nature*, 475, 65–70.
- 2) Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., 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.
- 3) Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P., & Stevens, R.C. (2008) *Science*, 322, 1211–1217.
- 4) Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., & Stevens, R.C. (2010) *Science*, 330, 1066–1071.
- 5) Chien, E.Y., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G.W., Hanson, M.A., Shi, L., Newman, A.H., Javitch, J.A., Cherezov, V., & Stevens, R.C. (2010) *Science*, 330, 1091–1095.
- 6) Nonaka, H., Otaki, S., Ohshima, E., Kono, M., Kase, H., Ohta, K., Fukui, H., & Ichimura, M. (1998) *Eur. J. Pharmacol.*, 345, 111–117.
- 7) Shiroishi, M., Kobayashi, T., Ogasawara, S., Tsujimoto, H., Ikeda-Suno, C., Iwata, S., & Shimamura, T. (2011) *Methods*, 55, 281–286.
- 8) Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R.C. (2012) *Trends Pharmacol. Sci.*, 33, 17–27.
- 9) Peeters, M.C., van Westen, G.J., Li, Q., & Ijzerman, A.P. (2011) *Trends Pharmacol. Sci.*, 32, 35–42.
- 10) de Graaf, C., Kooistra, A.J., Vischer, H.F., Katritch, V., Kuijter, M., Shiroishi, M., Iwata, S., Shimamura, T., Stevens, R.C., de Esch, I.J., & Leurs, R. (2011) *J. Med. Chem.*, 54, 8195–8206.
- 11) Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W.I., Okada, T., Kobilka, B.K., Haga, T., & Kobayashi, T. (2012) *Nature*, 482, 547–551.
- 12) Kruse, A.C., Hu, J., Pan, A.C., Arlow, D.H., Rosenbaum, D.M., Rosemond, E., Green, H.F., Liu, T., Chae, P.S., Dror, R.O., Shaw, D.E., Weis, W.I., Wess, J., & Kobilka, B.K. (2012) *Nature*, 482, 552–556.
- 13) Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhardt, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., Sanna, M.G., Han, G.W., Kuhn, P., Rosen, H., & Stevens, R.C. (2012) *Science*, 335, 851–855.
- 14) Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., & Kobilka, B.K. (2011) *Nature*, 477, 549–555.
- 15) Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G.W., Jacobson, K.A., Gao, Z.G., Cherezov, V., & Stevens, R.C. (2011) *Science*, 332,

322–327.

島村 達郎

(京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学講座)

Structure of histamine H1 receptor

Tatsuro Shimamura (Department of Medical Chemistry and Cell Biology, Kyoto University Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

ポリユビキチン鎖選択的結合による細胞機能制御

1. ユビキチンとポリユビキチン鎖

ユビキチン (Ub) は 76 残基からなる進化的に非常によく保存されたタンパク質ですべての真核生物に存在する。その構造は球状の領域 (1 から 71 アミノ酸残基の領域) と、ある程度自由に構造変化をおこすループ領域 (72 から 76 アミノ酸残基の領域) からなる¹⁾。Ile44 を中心とした疎水性のパッチが存在し、多くの場合このパッチで様々な受容体と相互作用する²⁾。

Ub はその C 末端グリシン残基を用いて、標的タンパク質リシン残基の側鎖アミノ基とイソペプチド結合を介して結合することでタンパク質の機能を様々に制御する。また、Ub 自身のアミノ基を介して連続的に Ub が繋がることによりポリ Ub 鎖と呼ばれるポリマーも形成する。実際には Ub の七つのリシン残基のアミノ基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) に加えて、N 末端のアミノ基を介して直鎖状に繋がることもあるため、結合に使われるアミノ基の違いによって 8 種類の Ub 鎖が合成される^{3,4)}。この結合様式の違いによって Ub 鎖は様々な構造と機能を持つ。例えば、生体内で最も豊富に存在する K48 結合型 Ub 鎖はプロテアソームによる分解シグナルとしてはたらく⁵⁾。一方、K63 結合型 Ub 鎖は DNA 修復、タンパク質合成、免疫や炎症に関わる細胞内シグナル伝達、受容体の下方制御などのプロセスではたらく^{3,6,7)}。また直鎖状 Ub 鎖も NF- κ B シグナリングの制御に関わることが近年明らかとなってきた³⁾ (図 1)。

生体内には特定の Ub 鎖を選択的に認識するタンパク質が存在し、これらが繋がり方の異なる Ub 鎖を認識することで、それぞれの Ub 鎖は異なる生体内プロセスのシグナ