

218. $\beta 3$ アドレナリン受容体の単粒子解析

志甫谷 渉

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻 構造生命科学研究室

Key words : アドレナリン, G 蛋白質共役受容体, クライオ電子顕微鏡法

緒言

アドレナリンは闘争・逃走反応を引き起こすホルモンで、心血管系に大きく作用する。アドレナリンはアドレナリン受容体 (AR) に結合して働く。この受容体は α AR と β AR に分かれ、 β AR はさらに 3 つのサブタイプがある。これらは心臓や平滑筋など異なる生理的役割を担っている。 $\beta 3$ AR は脂肪組織の脂肪分解や膀胱の平滑筋の弛緩に関与し、肥満や糖尿病との関連もあるが、種差があるため肥満や糖尿病の治療薬としては承認されていない。しかし、選択的 $\beta 3$ AR アゴニストは過活動膀胱の治療薬として研究されている。

ミラベグロンは過活動膀胱の治療薬として初めて承認された $\beta 3$ AR アゴニストで、副作用が少ない [1]。ビベグロンも日本で過活動膀胱の治療薬として承認され、過敏性腸症候群の第 2 相試験中である。しかし、これらの薬剤は臨床用量で $\beta 1$ AR も刺激するため、心拍数や血圧の上昇を伴う副作用があり、 $\beta 3$ AR の選択性を向上させる余地がある。

最近の β AR の構造解析の進展により、 β AR の薬理学と活性化機構が明らかになっている。しかし、 $\beta 3$ AR の構造情報がないため、その選択性のメカニズムはほとんど分かっていない。本研究では、ミラベグロンによって活性化された $\beta 3$ AR とヘテロ三量体 Gs タンパク質との複合体のクライオ電子顕微鏡構造を決定し、その結合特性や活性化、選択性の構造的基盤を報告する [2]。こうした構造情報は、新たな治療薬開発に役立つ情報を提供する。

方法

1. 構造解析最適な受容体の選抜

ヒト $\beta 3$ AR の精製を試みたが、発現量が少ないため、最初は失敗した。そこで、構造解析のために、様々な脊椎動物の $\beta 3$ AR タンパク質を蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィーでスクリーニングし、高発現で単分散のピークプロファイルを持つ有望な候補として、イヌの $\beta 3$ AR を同定した。イヌとヒトの $\beta 3$ AR は、83%の配列同一性と 87%の配列類似性を有している。 $\beta 2$ AR 欠損 HEK293 細胞を用いた NanoBiT-G⁺ protein dissociation assay により、ミラベグロンおよびイソプロテレノール (アドレナリンアナログ) に対するヒトおよびイヌの $\beta 3$ AR の薬理特性を評価した。イヌ $\beta 3$ AR に対するミラベグロンおよびイソプロテレノールの EC₅₀ 値はそれぞれ 0.45 nM および 2.8 nM であり、ヒト $\beta 3$ AR に対するそれは 4.6 nM および 64 nM である。イヌの $\beta 3$ AR に対するリガンドの効力が明らかに向上しているのは、その発現量が増加していることに一部起因している。

2. クライオ電子顕微鏡法を用いた単粒子解析

発現および精製効率を高めるため、イヌ $\beta 3$ AR の C 末端 380~405 残基を除去した。この切断は Gs カップリング活性を変化させなかった。G 蛋白質との複合体の構造解析に際して、構造研究用に開発され安定型 G タンパク質である miniGs タンパク質を用いた。哺乳細胞発現系を用いてミラベグロン結合状態の $\beta 3$ AR を発現・精製し、miniGs ヘテロ三量体 (miniGs, $\beta 1$, $\gamma 2$) および GPCR-Gs 複合体を安定化するナノボディ Nb35 と複合

形成を行った。 β 3AR-mini-Gs-Nb35 複合体の全体構造を、3.2 Å 分解能で決定した。得られた密度マップにより、ミラベグロンを含む β 3AR シグナル伝達複合体全体の分子構造を構築することができた。

結果および考察

1. β 3AR-Gs タンパク質複合体の全体構造

β 3AR-Gs タンパク質複合体の全体構造を図 1 に示す。 β 3AR は 7 回膜貫通ヘリックス (TM1-7) と TM7 に続くヘリックス 8 (H8) からなり、典型的なクラス A GPCR の構造を有していた。細胞外ループ (ECL) 2 は 2 ターンのヘリックスを形成していたが、ミラベグロンは、 β 3AR の細胞外側に開いた結合ポケットに結合していた。改変型三量体 Gs タンパク質は、 β 2AR-三量体 Gs タンパク質複合体の結晶構造と似た配向で β 3AR と相互作用していた。また、Nb-35 は mini-G α s-G β G γ 界面に位置しており、先行研究結果と合致する構造であった。

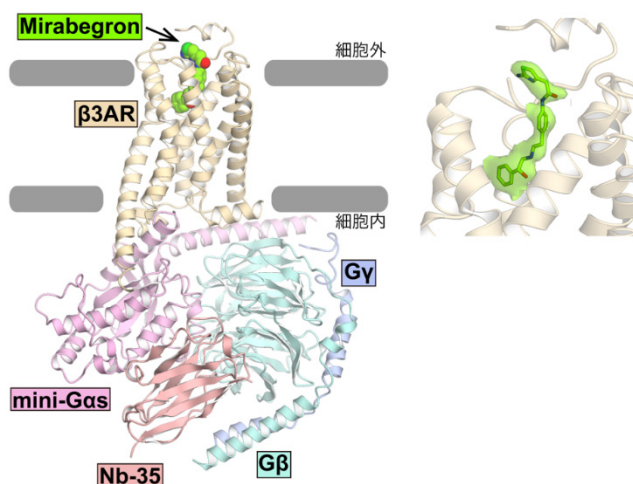


図 1. β 3AR-Gs タンパク質複合体構造
複合体全体構造と観測されたミラベグロンに相当する密度マップ。

2. ミラベグロンの結合様式

β 3AR に対するミラベグロンの結合部位は、内在性リガンドの結合するオルソステリックサイトと、細胞外側のエキソサイトの 2 つの領域に分けられる。

まず、オルソステリックサイトについて詳細に考察する。 β ARs のオルソステリックサイトは β ARs 間で高度に保存されており、 β 1AR や β 2AR に対してはカテコールアミン類が同様の結合様式で相互作用し、受容体を活性化することが示されている 38,39。そこで、ミラベグロン結合による β 3AR 活性化機構について考察するため、ミラベグロン結合型 β 3AR と内在性リガンドであるアドレナリン結合型 β 2AR を比較した (図 2)。 β 1AR や β 2AR においては、Asp3.32 および Asn7.39 はリガンド結合に重要であることが示されており、実際に、アドレナリン結合型 β 2AR ではアドレナリンの水酸基およびアミノ基と水素結合を形成している。この Asp3.32 および Asn7.39 は β 3AR においてミラベグロンの水酸基およびアミノ基と同様の水素結合を形成しており、他の β ARs 作動薬と同様の結合様式を示していた。

また、先行研究から、受容体の活性化には、Ser5.42 や Ser5.46 と作動薬との水素結合形成による細胞外側の TM5 の内側への動きが重要であることが示唆されていたが、本構造では、ミラベグロンにおいてカテコールにあたる部分はフェノールに置換され、水酸基を持たないため、この水素結合は観察されなかった。このことから、 β 3AR においては、Ser5.42 や Ser5.46 がミラベグロンによる受容体活性化に重要ではなく、先述した Asp3.32 および Asn7.39 が受容体活性化に重要であることが示唆された。また、オルソステリックサイトにおけるミラベグロンの結合は、アドレナリンなどのリガンドと比較して弱いことが明らかになった。

一方でエクソサイトにおいては、ミラベグロンは $\beta 3AR$ のECL2の主鎖と水素結合を形成しており、さらにECL3やTM7に存在する側鎖と分子間相互作用していた(図3)。こうした相互作用は、オルソステリックサイトでの弱い結合様式を補完しており、ミラベグロンが $\beta 3AR$ に対してnMオーダーの高い結合能を示すことを説明できる。これらの周辺残基は、 βARs サブタイプ間で保存性が低く、 $\beta 3AR$ 選択的なミラベグロンの結合に関与していると考えられる。

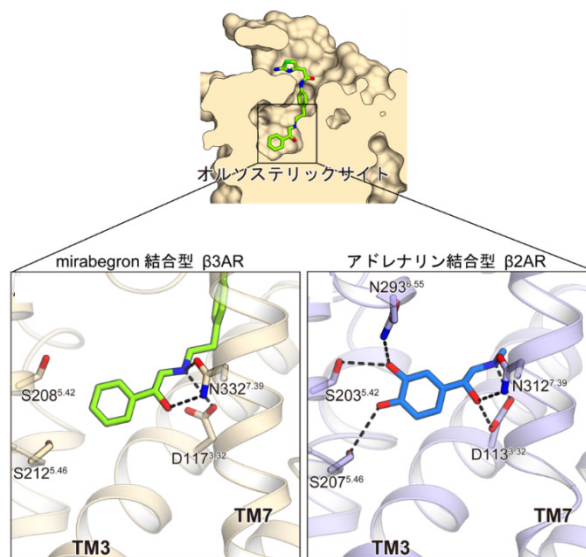


図2. オルソステリックサイトの比較

ミラベグロン結合型 $\beta 3AR$ とアドレナリン結合型 $\beta 2AR$ (PDB: 4LDO)において、作動薬の結合に重要な残基を表示している。黒の点線は水素結合をあらわす。

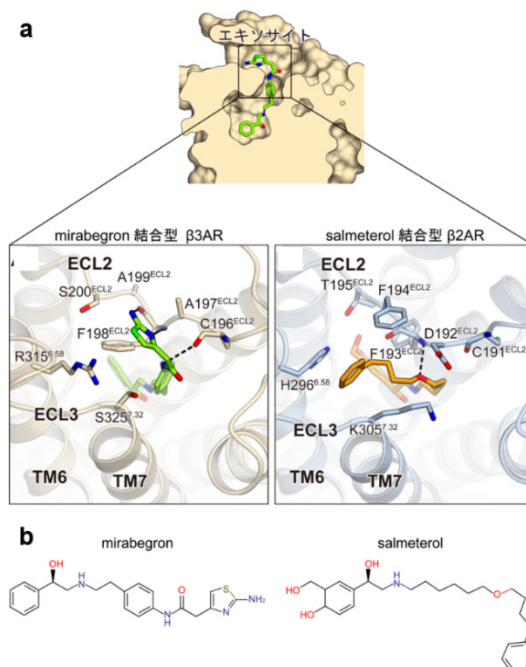


図3. エキシサイトの比較

- a) ミラベグロン結合型 $\beta 3AR$ とサルメテロール結合型 $\beta 2AR$ (PDB: 6MXT)において、作動薬の結合に重要な残基を表示している。黒の点線は水素結合をあらわす。
- b) ミラベグロンおよびサルメテロールの構造式。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院理学系研究科構造生命科学研究室の名切千恵彩元大学院生、濡木理教授、および東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野の井上飛鳥教授である。

文 献

- 1) Chapple CR, Cardozo L, Nitti VW, Siddiqui E, Michel MC. Mirabegron in overactive bladder: a review of efficacy, safety, and tolerability. *Neurourol Urodyn*. 2014 Jan;33(1):17-30. doi: 10.1002/nau.22505. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24127366
- 2) Nagiri C, Kobayashi K, Tomita A, Kato M, Kobayashi K, Yamashita K, Nishizawa T, Inoue A, Shihoya W, Nureki O. Cryo-EM structure of the β_3 -adrenergic receptor reveals the molecular basis of subtype selectivity. *Mol Cell*. 2021 Aug 5;81(15):3205-3215.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2021.06.024. Epub 2021 Jul 26. PMID: 34314699