

グレリン受容体のX線結晶構造解析 から分かったこと

椎村祐樹・児島将康・

●久留米大学分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門

要約

グレリンは、胃から分泌されるペプチド・ホルモンである。分泌されたグレリンは、脂肪酸修飾を受けて活性型となり、グレリン受容体に作用することによって、成長ホルモンの分泌促進や摂食亢進、血圧降下作用、体温低下作用などさまざまな中枢・末梢作用を示す。このように、脂肪酸の修飾によって活性が制御されるホルモンは、グレリンのほかに報告されていない。つまりグレリン受容体は、グレリンの脂肪酸修飾の有無を厳密に識別する独自の認識機構を備えていると考えられる。著者らは、この認識機構を明らかにするためにX線結晶構造解析法を用いて、アンタゴニストが結合したグレリン受容体の立体構造を3.3 Å分解能で決定した。得られた構造情報から、グレリン受容体のリガンド結合ポケットに、極性アミノ酸の局在と隙間構造の2つの特徴があることを明らかにした。さらにグレリン受容体変異体を用いた結合実験を行い、グレリン受容体はこれら2つの構造的特徴を利用して活性型グレリンを認識している可能性を見出した。

KEY WORDS グレリン、グレリン受容体、X線結晶構造解析

はじめに

グレリンは、成長ホルモン放出促進因子受容体（グレリン受容体）の内因性リガンドとして、1999年にラットの胃から発見されたペプチド・ホルモンである¹⁾。当初、脳下垂体からの成長ホルモンの分泌を促進するホルモンとして同定されたが、その後の研究で、摂食量の増加や血圧降下作用、体温低下作用などさまざまな中枢・末梢作用があることが報告されている²⁾。これらのことからグレリンは、生体内にエネルギーを貯蔵するホルモンであると考えられている。グレリンは、28アミノ酸で構成されるペプチド・ホルモンであるが、3番目のセリン残基が炭素数8の飽和脂肪酸（オクタン酸）の修飾を受けて初めて生理活性を示す（図1）。脂肪酸修飾を持たないグレリン（デスアシル・グレリン）は、グレリン受容体に結合することができないため、グレリン受容体を介した生理作用を示さ

ない。つまり、グレリン受容体は、グレリンの脂肪酸修飾の有無を識別するための独自の認識機構を備えていると考えられるが、その認識機構は不明であった。

本稿では、筆者らが決定したアンタゴニスト結合型グレリン受容体の構造と、その構造情報から明らかにした活性型グレリン認識機構について概説する³⁾。

1 グレリン受容体の構造**1 | グレリン受容体の精製・結晶化**

グレリン受容体は、Gタンパク質共役受容体（GPCR）といわれるタンパク質ファミリーに属している。GPCRは構造的な揺らぎの大きい膜タンパク質で、一般に精製や結晶化が困難である。そこで筆者らは、グレリン受容体安定化変異体と

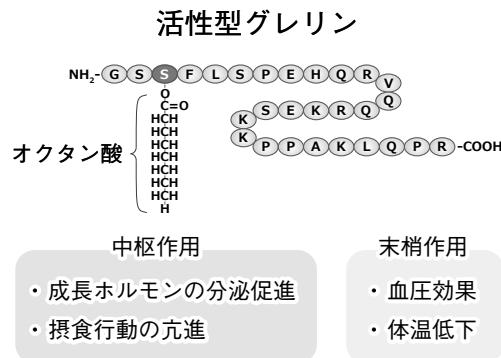


図1 活性型グレリンとその生理作用

抗グレリン受容体抗体を作製することでこの問題を解決した。

グレリン受容体安定化変異体を作製するために、まずグレリン受容体のN末端やC末端を欠失させた。N末端やC末端のように特定構造を持たない領域は、タンパク質の不安定性に関わるためである。また欠失させたN末端には可溶性タンパク質であるアポシトクロムb₅₆₂変異体を融合させることで結晶形成の促進を図った。さらにグレリン受容体の安定性を向上させるために、Thr130Lys(130番目のスレオニンをリジンにした変異)を導入した。この変異は、出芽酵母発現系とGFP蛍光検出系を組み合わせた変異体スクリーニングで見出したもので、グレリン受容体はこのアミノ酸変異によって安定化しなければ精製することができなかった(図2a)。このグレリン受容体安定化変異体が、グレリン活性を維持していることはシグナルアッセイで確認している。

加えて、抗グレリン受容体抗体を作製した。GPCRのような膜タンパク質を精製するためには可溶化が必須であるが、その際、GPCRは界面活性剤のミセルに包埋されるため、タンパク質-タンパク質相互作用による結晶形成が困難な状態になる。抗体は可溶性タンパク質であり、界面活性剤のミセルに包埋されることがないので結晶形成のための足場となると考えられている(図2b)。

このような創意工夫の末に、グレリン受容体-抗

グレリン受容体抗体の結晶化に成功し、3.3 Å 分解能で構造決定するに至った。

2 | 全体構造

構造決定したグレリン受容体は、典型的なGPCRの構造、つまり7回膜貫通ドメインと細胞内に短い両親媒性のヘリックスを有していた(図3)。また細胞外領域では、Cys116とCys198がジスルフィド結合していたが、このような細胞外のジスルフィド結合もGPCRの多くでみられる特徴である。作製した抗グレリン受容体抗体は、細胞内第3ループ(ICL3; intracellular loop3)を認識していた。ICL3は、GPCRがGタンパク質と相互作用する領域で、GPCRの構造の中でも最も搖らぎの大きい領域である。つまり抗体はICL3に結合することによって、結晶形成の足場となるだけではなく、グレリン受容体の安定性を向上する役割も担っていた。実際に、グレリン受容体単体とグレリン受容体-抗グレリン受容体抗体複合体の熱安定性を比較したところ、単体のTm値が57.5°Cであったのに対し、複合体のTm値は62.0°Cと熱安定性を5°C程度向上させていた。

3 | リガンド結合ポケットにみられる特徴

グレリン受容体の全体構造が、典型的なGPCRの構造であったのに対して、リガンドが結合する領域であるリガンド結合ポケットには2つの特徴

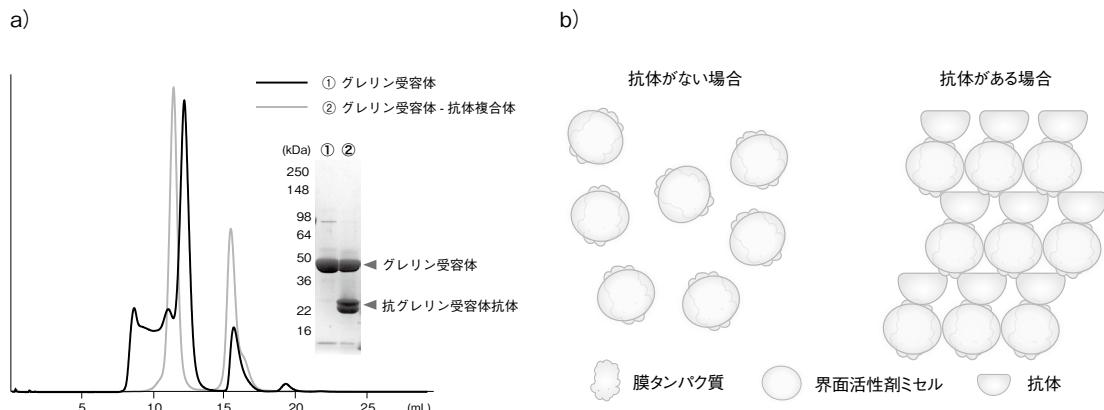


図2 ゲルリン受容体の精製と抗体による結晶化

a) ゲルリン受容体精製時のゲルfiltrationクロマトグラフィーパターン（①ゲルリン受容体単体を青色で、②ゲルリン受容体・抗体複合体を赤色で示した）と SDS-PAGE の CBB 染色像。良好な单分散性と純度の高い精製ができていることがわかる。

b) 抗体が膜タンパク質の結晶形成を促進するモデル。抗体がない場合、膜タンパク質は界面活性剤ミセルからわずかに露出した部分で結晶形成する必要があるが、抗体は可溶性タンパク質なので、界面活性剤ミセルに包埋されず、結晶形成の足場となると考えられる。

→ 66 ページにカラー掲載

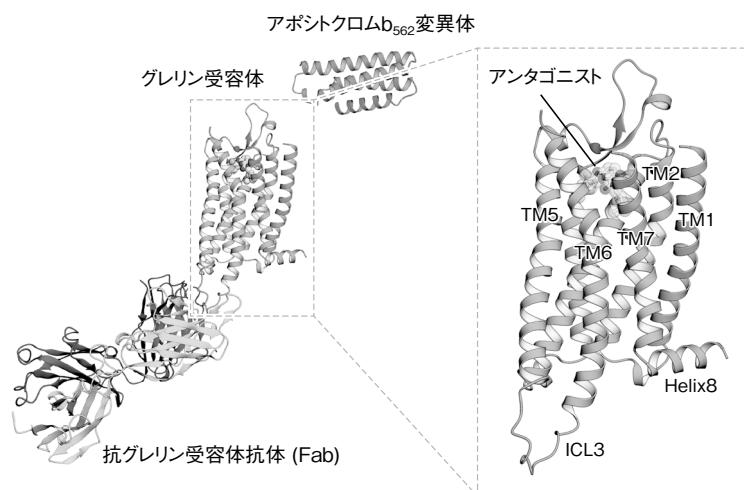


図3 ゲルリン受容体の全体構造

ゲルリン受容体をオレンジ、アボシクロム b₅₆₂ 変異体をマゼンタ、抗ゲルリン抗体の H鎖を赤、L鎖を緑で示した。アンタゴニストは空間充填モデルで示した。

→ 66 ページにカラー掲載

がみられた。二股に分かれたリガンド結合ポケットの形状と、膜貫通ヘリックス (TM; transmembrane) 6と7の間にみられる大きな隙間構造である。私たちはこれらをそれぞれBifurcated pocketならびにCrevasseと名付けた。

Bifurcated pocketは、これまでに構造が決定されている GPCR ではみられない特徴である。一般的な GPCR の場合、リガンド結合ポケットは“つば型”で2つに分割されてはいない。グレリン受容体では、リガンド結合ポケット内部で Glu124 と Arg283 がイオン結合することによって Bifurcated pocket を形成していた (図 4a)。また、アンタゴニストはこのイオン結合を跨ぐよ

うにして、配位していた。

Crevasse と名付けた隙間構造は、脂質を内因性リガンドとする GPCR でみられる特徴である。例えば、プロスタグランジン EP4受容体⁴⁾ (PDBID: 5YHL) では TM1 と TM7 の間に隙間構造を持ち、GPR40⁵⁾ (PDBID: 4PHU) では、TM3 と TM4 の間に大きな開裂があることが知られている (図 4b)。一方で、グレリン受容体のようなペプチドを内因性リガンドとする GPCR ではこのような隙間構造はみられない。つまり、グレリン受容体はペプチドを受容する GPCR で唯一、脂質受容 GPCR と同じ特徴を有していると言える。

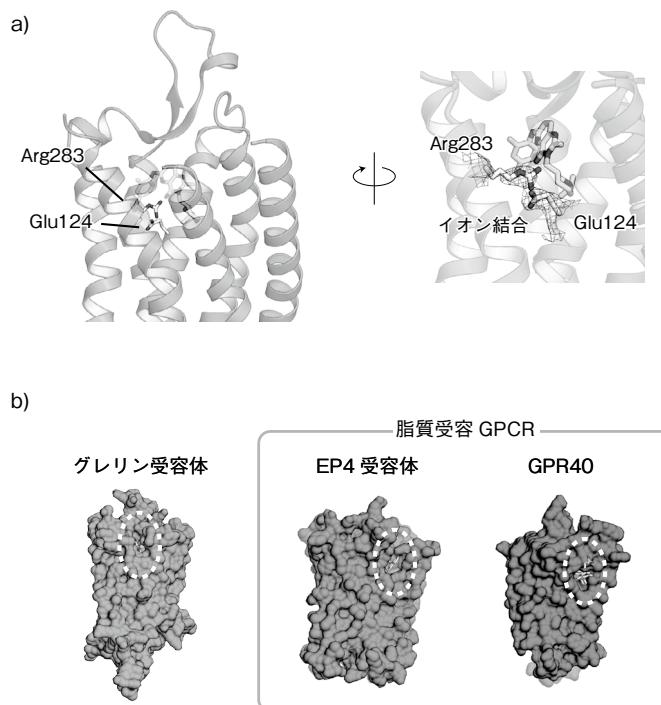


図 4 グレリン受容体のリガンド結合ポケットに見られる特徴

- a) Glu124 と Arg283 がイオン結合することによってリガンド結合ポケットを2つに分割していた。
- b) グレリン受容体は、脂質受容 GPCR と同様に膜貫通ヘリックス間に大きな隙間構造を形成していた。隙間構造を白い点線で示した。隙間構造によって、受容体内部に結合しているリガンドを受容体の外側から確認することができる。

2 構造情報から推察される グレリン結合モード

1 | ペプチド部

ペプチドを内因性リガンドとするGPCRにおいて、リガンド結合ポケット内の極性アミノ酸の重要性が報告されている。例えば、アンジオテンシンAT2受容体⁶⁾(PDBID: 5XJM)は、ペプチド性リガンドとの共結晶で構造決定されたが、この構造情報から、AT2受容体のArg182やLys215といった極性アミノ酸は、ペプチドリガンドの主鎖を認識することが明らかになっている。グレリン受容体のリガンド結合ポケットには、Bifurcated pocketの形成に関わるGlu124とArg283のほかにAsp99とArg102の4つの極性アミノ酸が存在している。そこで、グレリン受容体の4つの極性アミノ酸をそれぞれアラニンに変異させたグレリン受容体変異体を作製し、活性型グレリンとの結合実験を行った。その結果、4つのグレリン受容体変異体はいずれも活性型グレリンとの結合能が減衰した。これらの知見から、グレリン受容体においても4つの極性アミノ酸が、グレリンのペプチド主鎖を認識するものと示唆される。

2 | オクタン酸部

上述のようにグレリン受容体はCrevasseと名付けた大きな隙間構造を持ち、このような構造的特徴は脂質受容GPCRによくみられる。グレリン受容体のCrevasseの形成に関わるアミノ酸を抽出すると5つのフェニルアラニンが局在していることが分かった(図5)。グレリン受容体がグレリンのオクタン酸部を受容するためには、リガンド結合ポケットに疎水性部分が必要である。フェニルアラニンは疎水性アミノ酸であるため、フェニルアラニンが集積したCrevasseは疎水的な環境にある。そこでこれらのフェニルアラニンをアラニンに変異させたグレリン受容体と活性型グレリンの結合実験を行った結果、作製したグレリン受容体変異体は、活性型グレリンとの結合能が減衰した。このことから、グレリンのオクタン酸部はCrevasseの

疎水性環境と相互作用していると考えられる。

脂質受容GPCRに結合した脂溶性リガンドの配向を検討すると、GPR40のようにリガンドが受容体側面から細胞膜側に突き抜けた配向⁵⁾とスフィンゴシンS1P1受容体(PDBID: 3V2Y)のようにリガンド結合ポケット下部に向かう配向⁷⁾の大きく2通りがあるようである(図6)。グレリンのオクタン酸の配向もこの2つのいずれかであると考えられるが、そのいずれであるかを明らかにするためには、活性型グレリンが結合したグレリン受容体の構造を決定する必要がある。

3 おわりに

2021年1月に、グレリンの低分子アナログであるアナモレリン(商品名:エドルミズ)が、がん悪液質の治療薬として医薬品承認された。がん悪液質は、食欲不振とエネルギー消費量の増加によって骨格筋量が減少する病態である。毎年、世界中で1800万人以上が新たにがんに罹患しているが、そのうち50-80%ががん悪液質を発症し、死因の22%に関連している¹⁾。これまでがん悪液質の治療薬は存在しなかつたが、アナモレリンの承認によって生存率の向上や治療の継続、生活の質の改善が見込まれる。一方で欧州では、アナモレリンのグレリン様作用から期待される骨格筋量の増加が僅かであるとして認可に至っていない。つまり、アナモレリンによるグレリン受容体活性化能は十分なものとは言えず、化学修飾に改善の余地を残していると考えられる。グレリン受容体作用薬は、がん悪液質に加えて、拒食症や老化による衰弱などさまざまな疾患に適応が拡大する可能性があり、創薬標的として市場価値が高い。より効果の高いグレリン受容体作用薬の開発のために、グレリン受容体の構造情報のさらなる拡充が望まれる。

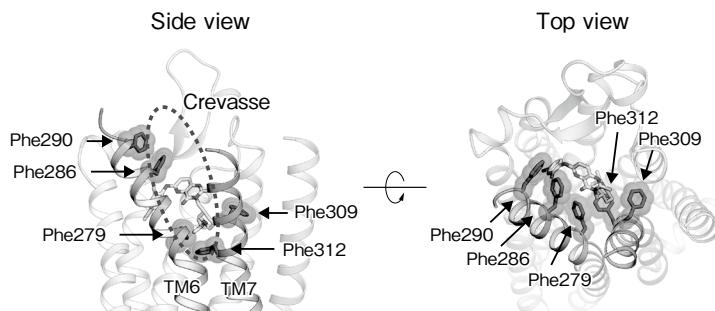


図 5 Crevasse に存在するフェニルアラニンの集積

→ 67 ページにカラー掲載

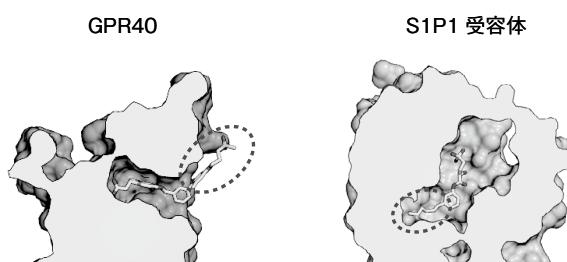


図 6 脂質受容 GPCR で見られる脂質リガンドの配向

GPR40 (左) と S1P1受容体 (右) に結合したリガンドの脂溶性領域を赤い点線で囲んだ.

→ 68 ページにカラー掲載

文 献 —

- 1) Kojima M, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660, 1999
- 2) Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* 85: 495-522, 2005
- 3) Shiimura Y, et al. Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode. *Nat. Commun.* 11: 1-9, 2020
- 4) Toyoda Y, et al. Ligand binding to human prostaglandin E receptor EP 4 at the lipid-bilayer interface. *Nat. Chem. Biol.* 15: 18-26, 2019
- 5) Srivastava A, et al. High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature* 513: 124-127, 2014
- 6) Asada H, et al. Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25: 1-9, 2018
- 7) Sanna MG, et al. Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* 335: 851-855, 2012

Structure of ghrelin receptor using X-ray crystallography

Yuki Shiimura, Masayasu Kojima

Division of Molecular Genetics, Institute of Life Science, Kurume University

Ghrelin, a peptide hormone consisting of 28 amino acids, was originally discovered in the stomach of rat as an endogenous ligand for GHSR (growth hormone secretagogue receptor, now called the ghrelin receptor) in 1999. Ghrelin has many physiological functions, playing roles in growth hormone secretion, appetite stimulation, hypotension and hypothermia. The unique feature of ghrelin is its Serine 3 acyl-modification, which is essential for ghrelin's activity, whereas des-acyl ghrelin (i.e., ghrelin lacking the acyl-modification) is inactive. However, it remains to be elucidated why the acyl-modification of ghrelin is necessary for activity. To address these questions, we determined the crystal structure of the ghrelin receptor bound to antagonist at 3.3 Å resolution. The structural information indicates that the ligand-binding pocket of the ghrelin receptor has two features: polar amino acid localization (Asp99, Arg102, Glu124 and Arg283) and gap structure between transmembrane 6 and 7 bundles, which is rich in hydrophobic amino acids including a cluster of phenylalanine residues. Mutagenesis analyses suggest that these features found in ligand-binding pocket of the ghrelin receptor recognize active ghrelin.

Keyword: Ghrelin, Ghrelin receptor, GHSR, X-ray crystallography

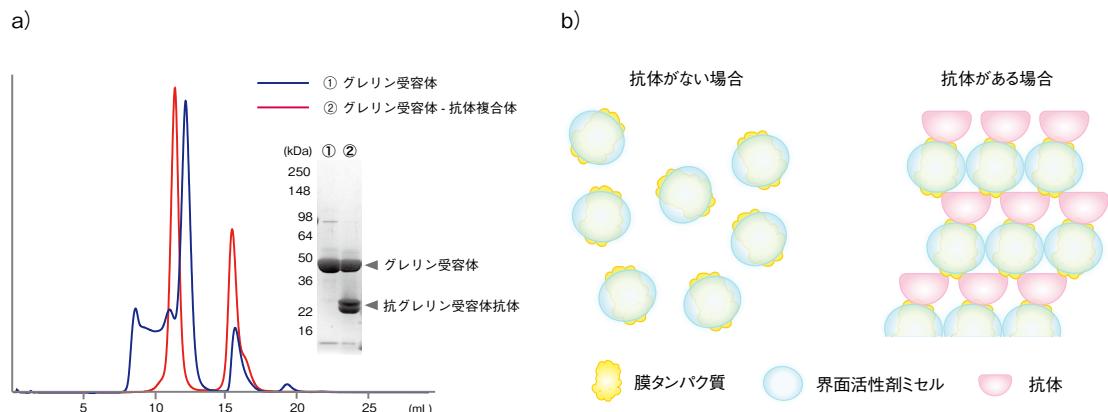
Address for correspondence

67 Asahi-machi, Kurume-shi, Fukuoka 830-0011, Japan
E-mail address: shiimura_yuuki@kurume-u.ac.jp



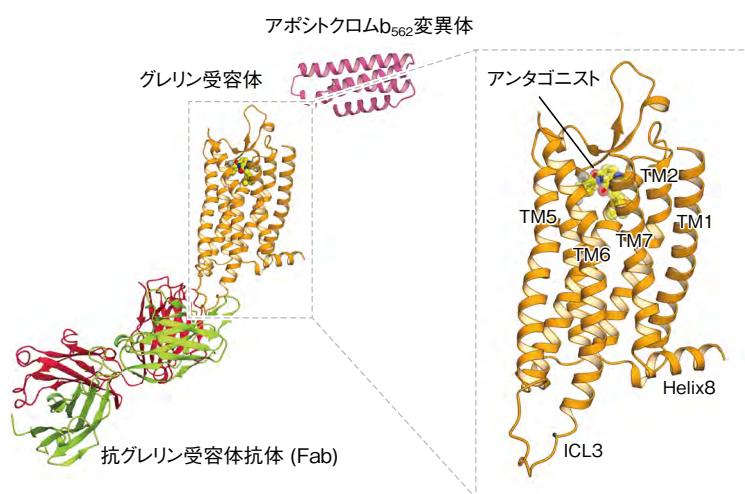
■ 椎村祐樹略歴

2007年 ●九州保健福祉大学薬学部 卒業
2009年 ●鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
修士課程修了
九州保健福祉大学薬学部 助手
2014年 ●日本学術振興会 特別研究員
2015年 ●久留米大学大学院博士課程 修了
2016年 ●京都大学大学院医学研究科
分子細胞情報学 特定研究員
2017年 ●久留米大学分子生命科学研究所 助教
現在に至る

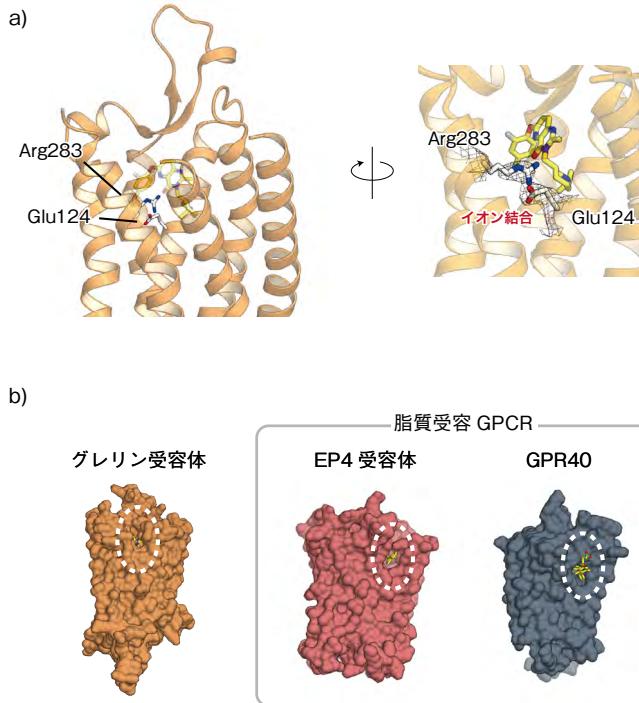


(8 ページ掲載) 図 2 グレリン受容体の精製と抗体による結晶化

- a) グレリン受容体精製時のゲルfiltrationクロマトグラフィーパターン (①グレリン受容体単体を青色で、②グレリン受容体 - 抗体複合体を赤色で示した) と SDS-PAGE の CBB 染色像。良好な单分散性と純度の高い精製ができていることがわかる。
- b) 抗体が膜タンパク質の結晶形成を促進するモデル。抗体がない場合、膜タンパク質は界面活性剤ミセルからわずかに露出した部分で結晶形成する必要があるが、抗体は可溶性タンパク質なので、界面活性剤ミセルに包埋されず、結晶形成の足場となると考えられる。

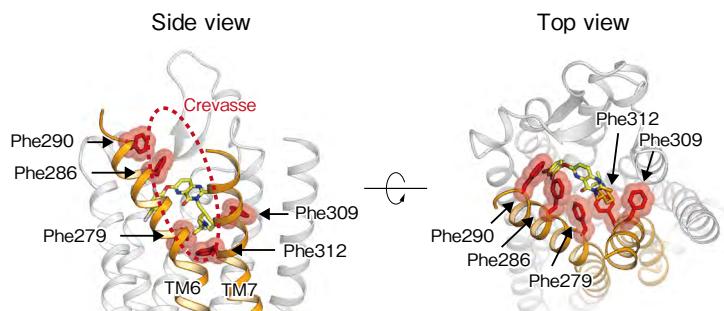


(8 ページ掲載) 図 3 グレリン受容体の全体構造

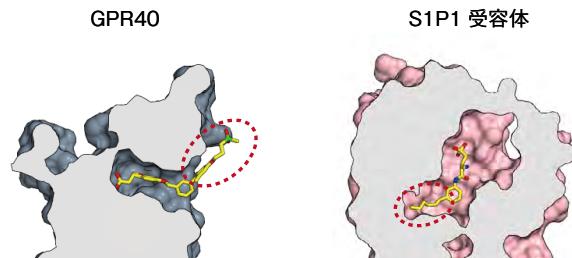


(9 ページ掲載) 図 4 グレリン受容体のリガンド結合ポケットに見られる特徴

- a) Glu124 と Arg283 がイオン結合することによってリガンド結合ポケットを 2 つに分割していた.
 b) グレリン受容体は、脂質受容 GPCR と同様に膜貫通ヘリックス間に大きな隙間構造を形成していた。隙間構造を白い点線で示した。隙間構造によって、受容体内部に結合しているリガンドを受容体の外側から確認することができる。



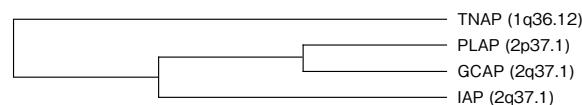
(11 ページ掲載) 図 5 Crevasse に存在するフェニルアラニンの集積



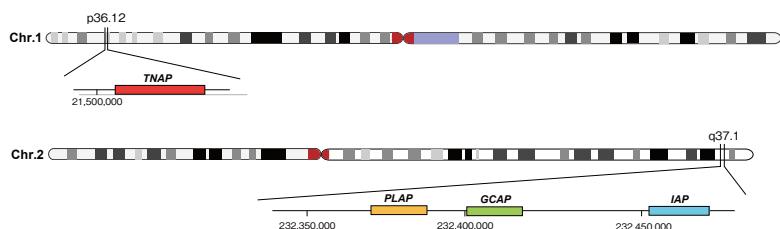
(11 ページ掲載) 図 6 脂質受容 GPCR で見られる脂質リガンドの配向

GPR40 (右) と S1P1受容体 (左) に結合したリガンドの脂溶性領域を赤い点線で囲んだ。

(A)



(B)



(14 ページ掲載) 図 1 各 ALP の相同性

- (A) ヒトにおける組織非特異型ALP (TNAP), 胎盤型ALP (PLAP), 生殖細胞型ALP (GCAP), 小腸型ALP (IAP) の相同性
- (B) *TNAP*遺伝子は一番染色体に, *PLAP*遺伝子, *GCAP*遺伝子, *IAP*遺伝子は二番染色体に位置している。