—Review for award—

プロスタノイド受容体活性化機構の解明 —EP3 受容体の X 線結晶構造解析—

森本和志

Activation Mechanism of Prostanoid Receptors —X-ray Crystallography of EP3 Receptor—

Kazushi Morimoto

Department of Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University;
Konoe-cho, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

(Received August 30, 2020)

Prostanoids [prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs)] are a series of bioactive lipid metabolites that function in an autacoid manner *via* activation of cognate G protein-coupled receptors (GPCRs). The nine subtypes of prostanoid receptors (DP1, DP2, EP1, EP2, EP3, EP4, FP, IP, TP) are involved in a wide range of functions, including inflammation, immune response, reproduction, and homeostasis of the intestinal mucosa and cardiovascular system. Among the prostanoid receptors, the structure of antagonist-bound DP2, which belongs to the chemoattractant receptor family, was previously determined. However, the mechanisms of prostanoid recognition and receptor activation remained elusive. To address this issue, we determined the crystal structures of antagonist-bound EP4 and PGE₂-bound EP3. The EP3-PGE₂ complex exhibits an active-like conformation, including outward movement of the cytoplasmic end of transmembrane (TM) 6 relative to the cytoplasmic end of TM6 of the EP4 complex. The carboxyl moiety of PGE₂ is recognized through three hydrogen bonds formed by highly conserved residues: Y114^{2,65}, T206^{Extracellular loop 2 (ECL2)}, and R333^{7,40} (superscripts denote Ballesteros-Weinstein numbering). In addition, the ω -chain of PGE₂ orients toward TM6, which appears to contribute to receptor activation. The structure reveals important insights into the activation mechanism of prostanoid receptors and provides a molecular basis for the binding modes of endogenous ligands. These findings should facilitate the development of subtype-selective and non-PG-like ligands.

Key words—X-ray crystallography; G protein-coupled receptor; prostanoid; prostaglandin

1. はじめに

プロスタグランジン (prostaglandin; PG) は、生体膜リン脂質に含まれるアラキドン酸を出発物質として産生される最も代表的な生理活性脂質であり、産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase; COX) の阻害薬は非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) として広く世界中で使用されている。

PG 類には主要なものとして PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , プロスタサイクリン (prostacyclin; PGI₂), トロンボキサン A₂ (thromboxane; TXA₂) の 5 種が存在し、PG と TX を合わせてプロスタノイドと呼ばれる。一方、その受容体には DP1, DP2, EP1,

EP2, EP3, EP4, FP, IP, TP の 9 種の G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) が存在しており、それぞれ異なるシグナル系に共役する (Fig. 1).¹⁾ このうち DP2 受容体は、他の PG 受容体とは全く異なる一次配列を有しており、ケモカイン受容体ファミリーに属する。

2007 年に β_2 アドレナリン受容体の結晶構造が報告されて以来、数多くの GPCR の構造が決定され、新薬開発のための有益な情報を与えてきた。しかしながら、これらの結晶構造の多くは合成リガンドを結合した不活性型構造であり、生理的リガンドによる活性化機構を明らかにした例は β_2 受容体や A_{2A} アデノシン受容体など数例しかなかった。²⁾ また PG 受容体に関しては、DP2 受容体の結晶構造が 2018 年に報告された³⁾ のみであり、その他の PG 受容体ファミリーの GPCR について詳細な立体構造は不明であった。

本稿では最近筆者らが明らかにしたアンタゴニス

京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学 (〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町)

e-mail: k.morimoto@mfour.med.kyoto-u.ac.jp

本総説は、2019 年度日本薬学会関西支部奨励賞 (物理系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Biogenesis of PGs and Signaling Pathways of Cognate Receptors

Arachidonic acid is converted to PGH_2 by the action of COX, and then PGH_2 is metabolized to PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 , and TXA_2 . Each PG exerts its function *via* the activation of cognate receptors. DP1, EP2, EP4, and IP are coupled to Gs. DP2 and EP3 are coupled to Gi/o. EP1, FP, and TP are coupled to Gq. The crystal structures of the circled receptors have been determined.

Fig. 2. Crystallization Strategies for Prostanoid Receptors

Receptors are shown in white with transparent surface representation. Fusion partners and an antibody are shown in gray with transparent surface representation. Ligands are shown as sticks. Fusion partners were fused to the third intracellular loops of EP3 (PDB code 6AK3) and TP (PDB code 6IIU), and the N-terminus of TP. Antibody Fab fragment was bound to EP4 (PDB code 5YWY). Because the fusion partner (modified bRIL; mbRIL) of EP3 was not modeled due to weak density, the corresponding part of 5-HT_{2A}-mbRIL (PDB code 6A93) is merged into EP3. Junctions between the receptors and fusion partners are shown as N and C.

ト結合 EP4 受容体⁴⁾及び PGE_2 結合 EP3 受容体⁵⁾の立体構造について、DP2 受容体や同時に報告された TP 受容体の構造⁶⁾と比較しつつ、PG の認識機構や受容体活性化メカニズムについて紹介したい。

2. GPCR の構造解析手法

一般的に GPCR は野生型では非常に不安定であり、発現量も低く精製が困難である場合が多い。さらに結晶パッキングに寄与する膜外領域が非常に狭いため、結晶化も困難であった。これに対し Cherezov らは、それまで界面活性剤ミセルに包まれた状態で行うのが一般的であった結晶化を、脂質キュービック相 (lipidic cubic phase; LCP) 法と呼ばれる脂質二重層中で結晶化する方法に変更し、結晶性を劇的に改善することに成功した。⁷⁾ さらに受

容体の細胞内第 3 ループに T4 リゾチーム (T4L) を挿入することで、結晶性と安定性の両方を改善できることが見い出され、以来 T4L と同様に用いることのできる融合タンパク質 (Fusion partner) が数多く探索されてきた。⁸⁾ PG 受容体についても DP2, EP3, TP はこの手法を用いることで構造決定が達成された (Fig. 2)。^{3,5,6)} 一方, Fusion partner

森本和志

京都大学大学院医学研究科特定助教、博士 (薬学)。2013 年京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了、2014 年京都大学大学院医学研究科研究員、2015 年日本学術振興会特別研究員 (PD) を経て 2019 年より現職。

Fig. 3. Overall Structures of Prostanoid Receptors

Top (A) and side (B) view of DP2 (PDB code 6D26), EP3 (PDB code 6AK3), EP4 (PDB code 5YWY), and TP (PDB code 6IIU) are shown as cartoon and surface representations, respectively. Extracellular caps (N-terminus in DP2 and second extracellular loops in EP3, EP4, and TP) are shown in gray, and other parts are shown in white. Ligands are shown as sticks. Arrows indicate side gaps between TM1 and TM7.

の代わりに特異的な抗体を結合させる方法もまた有力な方法として用いられてきており、EP4については細胞外に抗体の Fab 断片を結合させることで構造決定に至っている。⁴⁾

また GPCR は動的な性質のために構造的揺らぎが大きく、結晶化に成功しても分解能が上がらないことが多い。この揺らぎは熱安定性とも相関しており、安定性の向上が GPCR の構造決定には不可欠な要素となる。⁹⁾ 一般的にはリガンドの結合が安定性向上には最も有効であるが、それだけでは不十分な場合には点変異導入による安定化が必要となる。¹⁰⁾ PG 受容体は熱安定性が十分ではなく、EP3については4カ所、EP4については2カ所の安定化点変異を膜貫通領域に導入することで構造決定に至っている。^{4,5)}

3. PG 受容体の全体構造

一般的に GPCR はすべて7回膜貫通 (transmembrane; TM) 構造を呈する点では共通しているが、リガンド結合やヘリックス間の距離、細胞外領域などの細部はそれぞれ異なっており、これらを明らかにするためには原子分解能レベルの構造情報が不可欠となる。

通常、多くの GPCR のリガンドは細胞外の水溶液環境から直接、膜貫通領域のリガンド結合ポケットに結合するが、一部の脂質受容 GPCR では細胞外領域が覆われており、脂質二重層中からリガンド

が結合するモデルが提唱されていた。^{11,12)} EP3, EP4, TP については、細胞外第二ループ (extracellular loop 2; ECL2) が β ヘアピン構造をとっており、これが細胞外側を完全に覆っていた (Fig. 3)。さらにこの ECL2 はジスルフィド結合を介して TM3 につなぎ止められており、容易には構造変化しないものと推測された。一方、EP4 及び TP では TM1 と TM7 の間が開いており、リガンドは脂質二重層に入ったのち、側面的間隙から結合するものと考えられた。実際、分子動力学法を用いた計算シミュレーションによってもこのモデルを支持する結果が得られている。⁴⁾ また ECL2 のアミノ酸配列は DP2 を除く PG 受容体間でよく保存されており、ECL2 による覆いは PG 受容体ファミリーに共通した特徴であると考えられる。

一方、DP2 受容体は前述のように一次配列は大きく異なっているが、N 末端ヘリックス (Nt) が細胞外側を塞いでいること、そのヘリックスがジスルフィド結合を介して TM5 に固定されていること、TM1 と TM7 の間に間隙がみられることが報告されており、³⁾ PG 受容体に共通した特徴として非常に興味深い (Fig. 3)。

4. GPCR の残基指定方法

GPCR はすべて7回膜貫通の共通した構造を持つため、Ballesteros-Weinstein (BW) 番号¹³⁾と呼ばれる大まかな位置を残基番号に加えて右肩に併記す

る方法が取られる。例えば前述のジスルフィド結合を形成する残基は EP3 では C130^{3,25} と示され、ドットの前が TM 番号を、ドットの後には各 TM で最もよく保存される残基を 50 としたときの相対位置を意味する。TM3 の場合、細胞内側に存在する DRY モチーフ中の R155^{3,50} を基準として、そこから数えて 25 残基手前に位置することを意味する。以下ではこの BW 番号を用いて PG 受容体によるリガンド認識や受容体活性化機構について概説する。

5. PG 受容体のリガンド認識

PGE₂ の化学構造は大きく分けて、プロスタン環と呼ばれる中央の 5 員環、 α 鎖と呼ばれる脂肪酸鎖、その反対側の ω 鎖と呼ばれるアルキル鎖からなる [Fig. 4(A)]。PG 類はアラキドン酸を出発物質として産生される性質上、すべてカルボキシル基を有しており (Fig. 1)、また PG 受容体を標的とした化合物にもカルボキシル基を持つものが多い。¹⁾ そのため、これまでに決定された PG 受容体の構造はすべてカルボキシル基を有するリガンドが結合した状態で決定されている (Fig. 4)。^{3-6,14)}

ロドプシンでは Lys^{7,43} にレチナールが結合しているが、その近傍に存在する Arg^{7,40} は DP2 を除くすべての PG 受容体で保存されており、PG 類のカルボキシル基と結合する残基の候補としてクローニング当初から注目されてきた。¹⁵⁾ 実際、これまでに決定された DP2 以外のすべての PG 受容体で Arg^{7,40} がリガンドのカルボキシル基との相互作用に係わっており、これまでの仮説が裏付けられることとなった (Fig. 4)。^{4-6,14)}

一方、構造決定の成果として、Arg^{7,40} 以外にも TM2 や ECL2 もまたカルボキシル基の認識に係わっていることが明らかとなった (Fig. 4)。^{4-6,14)} TM2 の細胞外末端 2.65 ポジションは TP では His、その他の PG 受容体では Tyr と非常によく保存されており、EP3, EP4, TP いずれにおいてもカルボキシル基との相互作用がみられている。また ECL2 の β ヘアピン末端には IP 及び TP では Ser、その他の PG 受容体では Thr が存在しており、EP3 及び TP の構造においてカルボキシル基との相互作用がみられた。ECL2 については β ヘアピン全体がよく保存されていることから、これまでもその重要性が指摘されてきており、EP2 及び EP4 において Thr から Ser 変異への変異は影響がないものの、

Ala への変異では PGE₂ による活性化がほとんど消失することが報告されていた。¹⁶⁾ また筆者らによる EP3 を用いた実験によってもこれらのアミノ酸残基の Ala 変異体では、PGE₂ による活性化が著しく減弱することを確認している [Fig. 5(A)]。

一方、 ω 鎖部分については TM6 方向に向かって伸びており、TM3, 5-7, ECL2 によって作られる疎水性のポケットに収容されていた [Figs. 4(A) and (B)]。また TP 受容体においても同様に、アンタゴニストの ω 鎖に相当する部分が TM6 方向に伸びており [Fig. 4(D)]、PG 受容体では共通して α 鎖をポケットの入り口側に、 ω 鎖をポケットの奥へ向けて結合するものと考えられる。これに対し DP2 受容体は、細胞外側が覆われており TM1, 7 間に間隙がみられるという点では共通するが [Fig. 3(A)]、リガンドはポケットの奥に存在する R170^{4,64} や K210^{5,42} などの塩基性のアミノ酸を介して、カルボキシル基を奥に向けて結合しており [Fig. 4(E)]³⁾、全く異なる方法でリガンドを認識している点が興味深い。

プロスタン環部分には 9 位と 11 位に置換基があり、PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} で異なるのはこの置換基のみであるが、EP3 は PGE₂ に対して 100 倍以上の選択性を持つ [Fig. 5(B)]。¹⁸⁾ しかしながら EP3 と 9 位のケトンとは特異的な相互作用はみられず、11 位の水酸基に対しても M58^{1,42} と弱い相互作用がみられるのみであった [Figs. 4 (A) and (B)]。加えて M58^{1,42}A 変異体や 11 位水酸基を欠く 11-deoxy PGE₂ を用いた実験でも、活性の低下は 10 分の 1 以内であり M58^{1,42} を介した相互作用の寄与は限定的であることが示された (Fig. 5)。以上の結果より、PG 受容体は 9 位と 11 位の置換基を特異的に認識するというよりはむしろ、置換基の違いによって生じる 5 員環構造全体の歪みの変化を認識している可能性が考えられた。

6. PG 受容体の活性化機構

一般的に、GPCR の細胞外側に結合した作動薬はリガンドポケットの収縮を引き起こし、いくつかの特徴的なアミノ酸残基の構造変化を経て、TM6 細胞内側の外側への大きな変位として活性化情報を伝える。¹⁹⁾ これによって生じた細胞内側のスペースに対して、G タンパク質は α サブユニットの C 末端ヘリックスを介して結合することで活性化を受ける。

Fig. 4. Ligand-binding Modes in Prostanoid Receptors

(A) Schematic representation of the interactions between EP3 and PGE₂. Salt bridge and hydrogen bonds are shown as black dashed lines. Circles indicate residues that are highly conserved among prostanoid receptors. Residues in which mutations decrease signaling activity are shown in bold letters. (B–E) EP3 (B), EP4 (C), TP (D), and DP2 (E) are represented as white cartoons. Ligand-binding pockets are shown as surface representations. Ligands and receptor residues forming the ligand-binding pocket are shown as sticks. Salt bridges and hydrogen bonds are shown as black dashed lines. Residues forming a salt bridge or hydrogen bonds with ligands are shown in bold letters.

Fig. 5. Signaling Activities of EP3 Mutants and PGE₂ Analogs

Signaling activities were measured by TGF α shedding assay,¹⁷⁾ and the negative logarithm of the EC₅₀ (pEC₅₀) values were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.0001$; ND, not determined up to 10⁻⁶ M agonist. Data are means $\pm$ S.E.M. ($n = 3-6$ for each concentration of agonist). (A) EP3 mutants were stimulated with PGE₂. (B) Wild-type EP3 was stimulated with PGE₂ analogs.

不活性（拮抗薬結合）型構造である EP4 や TP と比較して、作動薬結合型構造である EP3 ではまず、TM1 の細胞外側が大きく内側に変位していた (Fig. 6). それによって TM1 と TM7 の間のリガンド侵入口は完全に塞がり、ポケットの収縮を来していた (Figs. 3 and 4). 一方、細胞内側では TM6 が大きく外側に開いており、活性型構造の特徴を呈していた (Fig. 6). この構造変化は TM6 中央に存在する CWxP モチーフを起点としており、特にその中の Trp^{6,48} は toggle switch と呼ばれ、GPCR 活性化に重要な残基であることが知られている.¹⁸⁾ PGE₂ の ω 鎖はポケット末端に位置するこの W295^{6,48} へ向かって伸びており、 ω 末端を介した相互作用が受容体活性化に重要であると考えられた (Fig. 6).

一方、多くのクラス A GPCR では TM2 の中央に Asp^{2,50} 残基が存在しており、その周辺残基が Na⁺ 結合ポケットを形成している.²⁰⁾ この Na⁺ 及びその周辺の水クラスターは不活性状態の維持に働いているとされており、活性型 GPCR では Na⁺ 結合ポケットが消失することが知られる. PG は代謝酵素である 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase によって 15 位水酸基が酸化されることによって活性が著しく低下するが [Fig. 5(B)], 15 位水酸基は D99^{2,50} の近傍に位置しており、Na⁺ 結合ポケットの構造変化に係わっている可能性が考えられた

Fig. 6. EP3 Is in an Active-like Conformation

Alignment of EP3 (in black with white spheres for PGE₂; PDB code 6AK3) with the inactive state of EP4 (in white; PDB code 5YWY) and TP (in white; PDB code 6IIU). W295^{6,48} of EP3 is shown as sticks. Arrows indicate the displacement of EP3 relative to EP4 and TP. Helix 8 of EP4 and TP was omitted for clarity.

[Figs. 4(A) and (B)].

7. おわりに

本総説では、EP3-PGE₂ の構造を中心に PGE₂ の結合様式や想定される受容体の活性化機構について紹介した. PG 受容体ではそのほかに DP2, EP4, TP の不活性型構造が決定されており、これらの構造情報は PG 受容体を標的とした作動薬や拮抗薬の迅速かつ合理的な設計に役立つものと期待される. 一方で、PG 受容体活性化機構のより正確な理解のためには、同一サブタイプにおける活性型及び不活性型の構造比較が不可欠であると考えられる. また PG 選択性の分子機構解明のためには、DP1 や FP などその他のサブタイプの構造決定も依然として課題として残されており、今後の研究の進展に期待したい.

謝辞 本稿で紹介した研究は、京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学で行われたものであり、多大なるご指導、ご支援を賜りました岩田 想教授、小林拓也准教授（現 関西医科大学教授）に厚く御礼申し上げます. さらに、回折データの収集・解析にご協力頂いた寿野良二特定助教（現 関西医科大学講師）、EP4 の構造を決定された豊田洋輔博士を始めとする共同研究者の先生方に心より御礼申し上げます. また本研究は、大型放射光施設 SPring-8 との共同利用成果となります. 本研究

は、日本学術振興会、日本医療研究開発機構の支援を受けて行われたものであり、ここに感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Hirata T., Narumiya S., *Chem. Rev.*, **111**, 6209–6230 (2011).
- 2) Wacker D., Stevens R. C., Roth B. L., *Cell*, **27**, 414–427 (2017).
- 3) Wang L., Yao D., Deepak R. N. V. K., Liu H., Xiao Q., Fan H., Gong W., Wei Z., Zhang C., *Mol. Cell*, **72**, 48–59 (2018).
- 4) Toyoda Y., Morimoto K., Suno R., Horita S., Yamashita K., Hirata K., Sekiguchi Y., Yasuda S., Shiroishi M., Shimizu T., Urushibara Y., Kajiwaraya Y., Inazumi T., Hotta Y., Asada H., Nakane T., Shiimura Y., Nakagita T., Tsuge K., Yoshida S., Kuribara T., Hosoya T., Sugimoto Y., Nomura N., Sato M., Hirokawa T., Kinoshita M., Murata T., Takayama K., Yamamoto M., Narumiya S., Iwata S., Kobayashi T., *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 18–26 (2019).
- 5) Morimoto K., Suno R., Hotta Y., Yamashita K., Hirata K., Yamamoto M., Narumiya S., Iwata S., Kobayashi T., *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 8–10 (2019).
- 6) Fan H., Chen S., Yuan X., Han S., Zhang H., Xia W., Xu Y., Zhao Q., Wu B., *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 27–33 (2019).
- 7) 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., *Science*, **318**, 1258–1265 (2007).
- 8) Xiang J., Chun E., Liu C., Jing L., Al-Sahouri Z., Zhu L., Liu W., *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 1055–1069 (2016).
- 9) Zhang X., Stevens R. C., Xu F., *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 79–87 (2015).
- 10) Vaidehi N., Grisshammer R., Tate C. G., *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 37–46 (2016).
- 11) Hanson M. A., Roth C. B., Jo E., Griffith M. T., Scott F. L., Reinhart G., Desale H., Clemons B., Cahalan S. M., Schuerer S. C., Sanna M. G., Han G. W., Kuhn P., Rosen H., Stevens R. C., *Science*, **335**, 851–855 (2012).
- 12) Cao C., Tan Q., Xu C., He L., Yang L., Zhou Y., Zhou Y., Qiao A., Lu M., Yi C., Han G. W., Wang X., Li X., Yang H., Rao Z., Jiang H., Zhao Y., Liu J., Stevens R. C., Zhao Q., Zhang X. C., Wu B., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 488–495 (2018).
- 13) Ballesteros J. A., Weinstein H., *Methods Neurosci.*, **25**, 366–428 (1995).
- 14) Audet M., White K. L., Breton B., Zarzycka B., Han G. W., Lu Y., Gati C., Batyuk A., Popov P., Velasquez J., Manahan D., Hu H., Weierstall U., Liu W., Shui W., Katritch V., Cherezov V., Hanson M. A., Stevens R. C., *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 11–17 (2019).
- 15) Hirata M., Hayashi Y., Ushikubi F., Yokota Y., Kageyama R., Nakanishi S., Narumiya S., *Nature*, **349**, 617–620 (1991).
- 16) Stillman B. A., Audoly L., Breyer R. M., *Eur. J. Pharmacol.*, **357**, 73–82 (1998).
- 17) Inoue A., Ishiguro J., Kitamura H., Arima N., Okutani M., Shuto A., Higashiyama S., Ohwada T., Arai H., Makide K., Aoki J., *Nat. Methods*, **9**, 1021–1029 (2012).
- 18) Abramovitz M., Adam M., Boie Y., Carrière M., Denis D., Godbout C., Lamontagne S., Rochette C., Sawyer N., Tremblay N. M., Belley M., Gallant M., Dufresne C., Gareau Y., Ruel R., Juteau H., Labelle M., Ouimet N., Metters K. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1483**, 285–293 (2000).
- 19) Weis W. I., Kobilka B. K., *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 897–919 (2018).
- 20) Katritch V., Fenalti G., Abola E. E., Roth B. L., Cherezov V., Stevens R. C., *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 233–244 (2014).