

京都大学	博士（医科学）	氏名	野島慎五
論文題目	Cryo-EM Structure of the Prostaglandin E Receptor EP4 Coupled to G Protein (Cryo-EM 単粒子解析法によるプロスタグランジン受容体 EP4-G タンパク質複合体の構造解析)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>プロスタグランジン (PG) は脂質の一種であるアラキドン酸から合成される細胞間シグナル伝達物質であり、炎症や女性生殖などの様々な生理現象に関わる。PG には PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGL<sub>2</sub> などの種類があり、それぞれを認識する受容体 (DP1-2、EP1-4、FP、IP) が存在する。これらの受容体は細胞外から PG を受容し、細胞内側に存在する G タンパク質にシグナルを受け渡す G タンパク質共役受容体 (GPCR) である。G タンパク質は α サブユニット (Gα)、β サブユニット (Gβ)、γ サブユニット (Gγ) のヘテロ三量体 (Gαβγ) を形成し、主に Gα の種類が下流のシグナル伝達を決定する。PGE<sub>2</sub> の受容体は EP1、EP2、EP3、EP4 の 4 種類が存在し、リガンドが同一でありながら共役する G タンパク質の種類が異なる。このうち EP4 では Gα の一種である Gs が主に結合する。EP4 は急性心不全、潰瘍性大腸炎、骨粗鬆症などの治療薬の対象であり、その作動薬 (アゴニスト) の開発が進められている。先行研究では拮抗薬 (アンタゴニスト) と結合した不活性型の EP4 および、PGE<sub>2</sub> と結合したアゴニスト結合型の EP3 の構造が明らかにされているが、G タンパク質と結合した状態の PG 受容体の構造は解かれておらず、G タンパク質との結合様式は解明されていなかった。そこで本研究では EP4 の活性機構の解明を目的とし、EP4-Gs 複合体の構造解析を行った。</p> <p>まず EP4、改変型 Gs、Gβ-Gγ 二量体、複合体を安定化させるための一本鎖抗体 (ナノボディ) Nb35 をそれぞれ発現・精製し、精製タンパク質と PGE<sub>2</sub> を混合することで PGE<sub>2</sub>-EP4-Gsβγ-Nb35 複合体を作製した。この複合体をクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) で撮影したところ、5,743 枚の画像から全部で 170,433 個の良好な粒子の二次元投影像が確認された。それらに対して単粒子解析を行うことで分解能 3.3 Å の電子顕微鏡像を取得し、3 次元構造モデルを構築することに成功した。</p> <p>得られた構造と不活性型 EP4 の構造を比較したところ、不活性型で観測されたリガンドの侵入経路と思われる溝が閉じていることが確認された。また EP4 の膜貫通ヘリックス 6 (TM6) が細胞内側で受容体の中心から外側に向けて開いた構造をしていた。これは構造既知の活性型 GPCR に共通した特徴であり、G タンパク質の C 末端が結合する空間を形成していると考えられている。しかしながら、EP4 の TM6 の開き具合は他の GPCR-Gs 複合体よりも小さく、本来 Gs の C 末端が結合している位置に TM6 が存在していた。一方で EP4 の TM7 は、他の GPCR-Gs 複合体よりも細胞内側で受容体中心から遠い位置に存在し、本来 TM7 がある位置で Gs の C 末端が EP4 と結合していた。これらの違いにより、これまで解明された GPCR-Gs 複合体の構造では存在しなかった、TM2 と Gs の C 末端との結合が確認された。さらに Gs との結合残基を変異させた際のシグナル活性への影響を調べると、PG 受容体に保存された TM2 のフェニルアラニン (Phe54) が EP4 による Gs の活性化に重要であることが判明した。また TM7 の細胞内側にも PG 受容体で保存されたトリプトファン (Trp327) が存在し、外側に向いたこの側鎖が TM7 の開き方に関係することが示唆された。以上の結果から、G タンパク質との結合に関する EP4 のこれらの構造的特徴は、PG 受容体に共通していると考えられる。これらの知見は活性機構に基づいた EP4 作動薬の開発への応用が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

プロスタグランジン (PG) は炎症などに関わる細胞間シグナル伝達物質である。PG の一種である PGE<sub>2</sub> には 4 種類の受容体 (EP1、EP2、EP3、EP4) が存在している。先行研究では PGE<sub>2</sub> 結合型の EP3、不活性型の EP4 の構造が明らかになったが、活性型の EP4 の構造および G タンパク質と結合した状態の PG 受容体の構造は解かれていなかった。本研究では EP4 の活性機構の解明を目的とし、EP4-Gs 複合体の構造をクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) による単粒子解析法により決定した。

得られた構造から、EP4 では EP3 と同様の PGE<sub>2</sub> の結合様式をしていたが、リガンドポケットの最奥部に EP3 にはない空間が EP4 に存在することが判明した。また不活性型 EP4 に存在する、リガンドの侵入経路と思われる溝が活性型 EP4 では閉じていることが確認された。さらに EP4 の細胞内側での膜貫通ヘリックス 6 (TM6) の開き具合は、他の GPCR-Gs 複合体よりも小さいという特徴があった。この特徴のため、これまで解明された GPCR-Gs 複合体の構造では存在しなかった、TM2 と Gs の C 末端との結合が確認された。さらに Gs との結合残基を変異させた際のシグナル活性への影響を調べると、TM2 のフェニルアラニン (Phe54) が EP4 による Gs の活性化に重要であることが判明した。この Phe54 は PG 受容体で保存されているため、他の PG 受容体でも活性に重要であることが示唆された。

以上の研究はプロスタグランジン受容体 EP4 の活性化メカニズムの解明に貢献し、プロスタグランジンの生理活性に関する研究の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 3 年 2 月 15 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降