

2023年2月28日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

### 自己免疫疾患に関わるシグナル複合体の立体構造を解明 ～ 脂質受容体に対する創薬開発に貢献 ～

#### 【発表のポイント】

- リゾホスファチジルセリン (リゾ PS)<sup>(注1)</sup> 受容体 GPR174 とシグナル伝達因子 Gs が会合したシグナル伝達複合体<sup>(注2)</sup> の構造基盤を明らかにしました。
- リゾ PS は GPR174 の側面に結合することで、受容体の構造変化を引き起こし、Gs シグナルをオンにすることを解明しました。
- 本研究は、バセドウ病<sup>(注3)</sup>をはじめとする自己免疫疾患等へのリゾ PS 受容体を標的とした創薬開発に貢献すると期待されます。

#### 【概要】

脂質分子には細胞膜を形作る役割のほかに、生理活性をもつシグナル分子としての一面もあります。リゾリン脂質と呼ばれる脂質分子は、細胞間のシグナル伝達因子として生体内で様々な生理機能を司ることが知られています。このうち、リゾ PS と呼ばれる脂質分子については免疫系細胞に対する様々な作用が知られており、3種のリゾ PS 特異的受容体を介して機能します。リゾ PS 受容体の1種である GPR174 は、その遺伝子変異が自己免疫疾患であるバセドウ病に関連していることが知られています。

東北大学大学院薬学研究科の井上飛鳥教授・生田達也助教らのグループは、中国ハルビン工業大学の Yuanzheng He 教授らのグループとの共同研究により、リゾ PS が結合して活性型構造へと変化した GPR174 と Gs タンパク質からなるシグナル伝達複合体の立体構造を解明し、機能解析を行うことで、リゾ PS の認識基盤を解明しました。今回の研究成果は、GPR174 を標的とする自己免疫疾患治療薬の開発に貢献するとともに、他の脂質受容体に対する薬剤の開発にも役立つことが期待されます。

本研究の成果は、日本時間 2023 年 2 月 23 日に科学雑誌 Nature Communications 誌に掲載されました。

## 【詳細な説明】

脂質分子は細胞膜を形作る役割のほかに生理活性をもつシグナル分子としての一面も持っています。細胞膜の構成脂質であるリン脂質は脂肪酸を2本結合するのに対し、リゾリン脂質は結合する脂肪酸が1本のみであることから、疎水性の違いにより容易に脂質膜から脱離して、近傍や遠方の細胞に働きかけることができます。このような作用を有するリゾリン脂質として、リゾホスファチジルセリン（リゾ PS、図1）が知られています。例えば、傷害を受けた組織の細胞からリゾ PS が放出され、マクロファージ<sup>(注4)</sup>に作用することで炎症誘発性サイトカインを放出させることが報告されています。リゾ PS の生理活性は細胞膜表面に存在する G タンパク質共役型受容体（GPCR）である3種のリゾ PS 受容体（GPR34, P2Y10, GPR174）を介して作用することが知られています。このうち、GPR174 は免疫系の細胞に高発現していることが知られており、下流シグナルタンパク質を介して免疫制御機構に関与していることが示唆されています。実際、自己免疫疾患のひとつであるバセドウ病の発症と GPR174 のミスセンス変異<sup>(注5)</sup>は関連していることが知られています。この変異は GPR174 の発現量を上昇させることが知られているため、GPR174 のシグナルを抑制する薬剤は、自己免疫疾患に対する治療薬になる可能性があります。これまでに様々な脂質受容体の立体構造が解明されてきましたが、リゾ PS 受容体の立体構造は決定されておらず、リゾ PS がどのように認識されているのかには不明な点が残されていました。

今回、東北大学大学院薬学研究科の井上飛鳥教授・生田達也助教らのグループは、中国ハルビン工業大学の Yuanzheng He 教授らのグループとの共同研究により、リゾ PS が結合した GPR174 の立体構造をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析<sup>(注6)</sup>によって決定しました。また、NanoBiT システム<sup>(注7)</sup>を用いた変異体解析や分子動力学シミュレーション<sup>(注8)</sup>を通じてリゾ PS がどのように GPR174 に認識されているかを明らかにしました。

リゾ PS は GPR174 の細胞膜側に開いた溝に挟みこまれるようにして結合していました（図2）。この認識機構を実際に確かめるために、リガンド刺激による GPR174 の活性化を計測する手法の開発を試みました。典型的な GPCR は下流シグナルタンパク質である三量体 Gs タンパク質（Gas サブユニット、Gβ サブユニット、Gγ サブユニットから構成される）と一過的な会合後にすぐに乖離するのに対して、GPR174 は Gs タンパク質と安定的な結合を形成することを見出しました。この現象を利用して、GPR174 と Gs タンパク質にそれぞれ NanoBiT ルシフェラーゼ断片を融合した改変体を培養細胞に発現させ、リガンド刺激後の GPR174 と Gs タンパク質の近接を NanoBiT ルシフェラーゼ発光によって検出することで GPR174 の活性化を測定することに成功しました（図3A）。次に、リゾ PS 結合位置の近くに存在する GPR174 のアミノ酸残基について、それぞれアミノ酸置換した変異 GPR174 を作製し、リガンド刺激依存的

な Gs タンパク質との結合を NanoBiT 法により測定しました。その結果、塩基性のアミノ酸残基（アルギニンやリジン）を中性のアミノ酸残基（アラニン）に置換するとリゾ PS による Gs 結合能が消失することから、リゾ PS 結合位置の中でもこれら塩基性残基がリゾ PS の認識と受容体の活性化構造変化に重要であることがわかりました（図 3 B）。さらに、リゾ PS の認識機構をより詳細に明らかにするために、リゾ PS 結合型 GPR174 の分子動力学シミュレーション<sup>(注6)</sup>を行いました（図 3 C）。シミュレーション中において、ダイナミックに動いていたことから、リゾ PS の位置をクラスタリング解析したところ、いくつかの異なる状態に分類されることがわかりました。いずれの状態においても、変異体実験によって重要性が示された塩基性アミノ酸残基との相互作用は維持されていました。さらに、リゾ PS によって活性化される GPR174 は、特徴的な Gas サブユニットとの結合様式をとっていることもわかり（図 4）、GPR174 は他の受容体とは異なる Gas サブユニットの活性化状態を介してシグナル伝達を引き起こすことが示唆されました。

本研究において解明されたリゾ PS 受容体 GPR174 の立体構造基盤をもとに免疫系の細胞に発現する GPR174 の活性を抑える薬を開発することで、バセドウ病をはじめとした自己免疫疾患に関わる治療薬の開発に役立つことが期待されます。

本研究は、日本学術振興会（JSPS）の科学研究費助成事業（JP21H04791、JP21H05113、JPJSBP120213501、JPJSBP120218801）、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）の創発的研究支援事業（JPMJFR215T）、上原記念生命科学財団、第一三共生命科学振興財団など多くの支援を受けて実施されました。

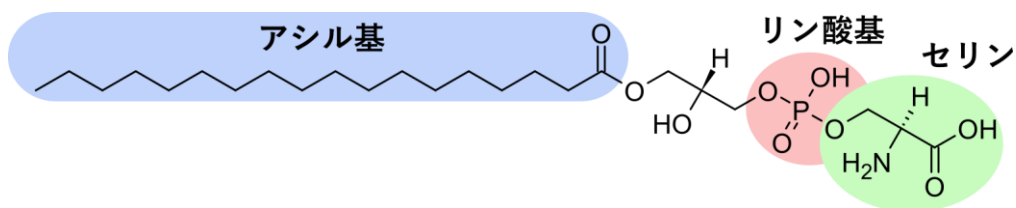


図1 リゾホスファチジルセリン (リゾ PS) の化学構造

グリセロール骨格にアシル基 (青) とリン酸基 (赤)、セリン (緑) が結合した構造を有する。GPR174 に結合する際は、セリンとリン酸基が細胞外側を向くことがわかった (図2 参照)。

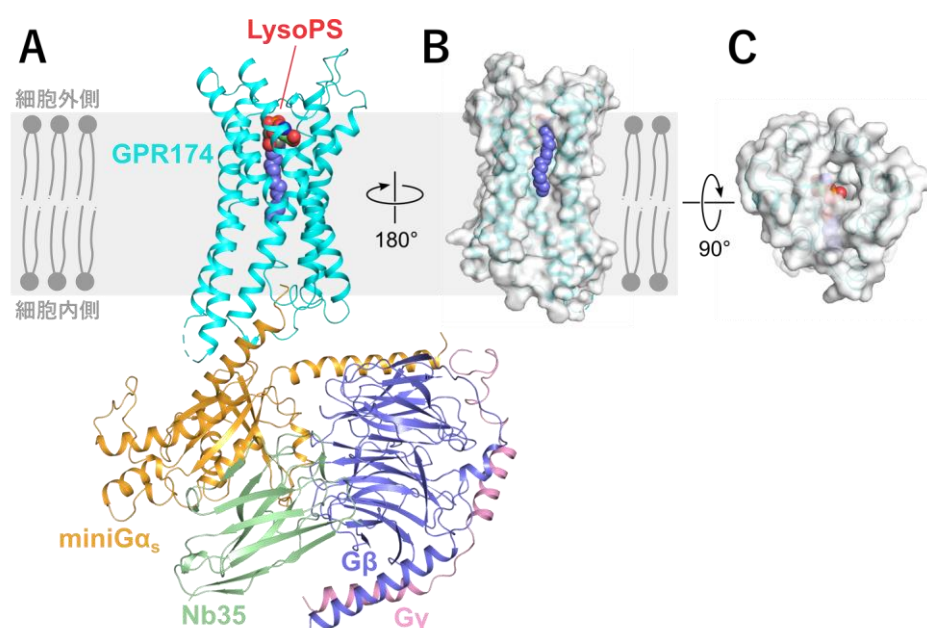


図2 リゾ PS 結合型 GPR174 の立体構造

(A) シグナル複合体中に含まれる GPR174 (水色)、三量体 Gs タンパク質 (miniGα<sub>s</sub>: 橙色、Gβ: 青色、Gγ: 桃色)、Gs 安定化抗体 Nb35 (緑色) のリボンモデル表示。構造解析において、Gα<sub>s</sub> サブユニットの活性改変型である miniGα<sub>s</sub> を用いた。GPR174 と結合したリゾ PS (図1 と同様に着色) は球体モデルとして示した。灰色部分はリン脂質 (丸と線 2 本からなる簡略表記) が会合した脂質二重膜 (細胞膜) に相当する部分を示す。(B) GPR174 のタンパク質表面表示と GPR174 に結合したリゾ PS。(C) 細胞外側からの視点の GPR174 表面構造。他の多くの GPCR では細胞外方向にリガンド結合ポケットが開いているのに対して、GPR174 では細胞外方向が閉じており細胞膜に向かってリガンド結合ポケットが開く。このことは、リゾ PS が細胞膜を側方拡散して結合することを示唆する。

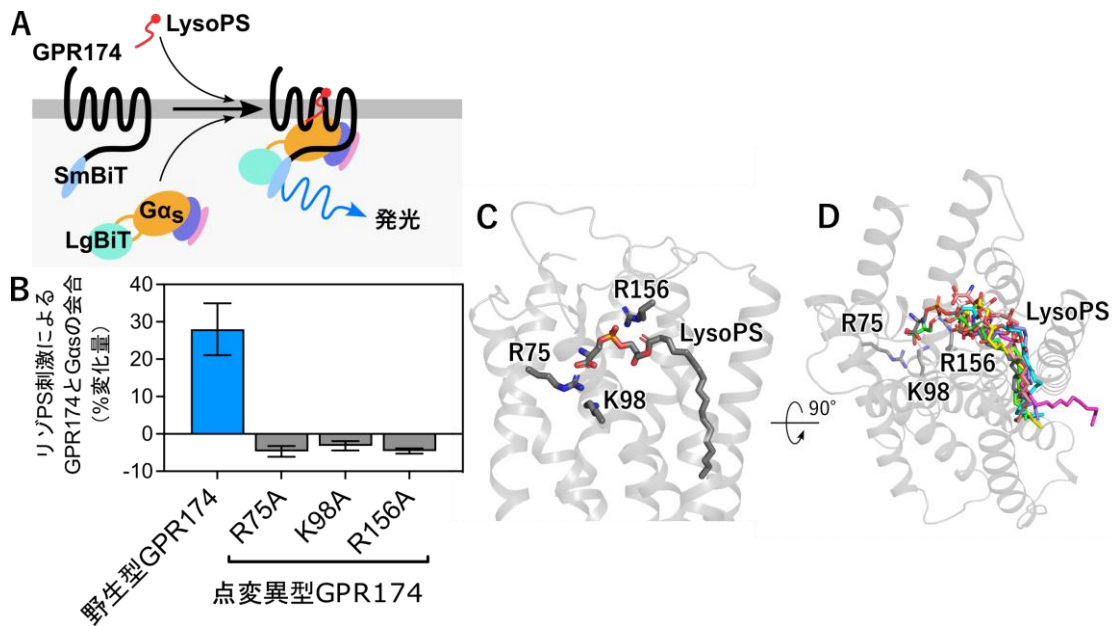


図3 GPR174のシグナル伝達活性の検出方法とリゾPSの認識機構の検証

(A) GPR174のシグナル伝達活性を検出するために開発した実験系。ルシフェラーゼ断片のSmBiTとLgBiTをそれぞれGPR174とGα<sub>s</sub>サブユニットに融合した改変タンパク質を培養細胞に発現させ、リゾPSを添加することでGPR174と三量体Gsの会合を発光シグナルとして検出した。(B) GPR174変異体におけるリゾPS応答の消失。ヒトGPR174の野生型(通常型のアミノ酸配列)はリゾPSに応答しているのに対して、3種類の変異体(75番目のアルギニン、98番目リジン、156番目のアルギニンをそれぞれアラニンに置換)ではリゾPSの応答が完全に消失した。立体構造中で近接するアミノ酸が実際にリゾPSを認識するのに重要であることが実験的に示された。(C) リゾPSのリン酸基とセリン部位近傍に位置するGPR174のアミノ酸残基。(D) 分子動力学シミュレーション中で準安定状態を示したリゾPSの位置。



図4 Gα<sub>s</sub>タンパク質の相互作用様式

GPR174（灰色）と共役した  $G\alpha_s$  サブユニット（橙色）と代表的な 2 種類の  $G\alpha_s$  サブユニット結合型受容体の相互作用様式の比較。GPR174 はいずれとも異なる様式で  $G\alpha_s$  サブユニットと結合することがわかる。

## 【用語説明】

### （注1） リゾホスファチジルセリン（リゾ PS）

生理活性脂質の1種。化学構造は図1を参照。両親媒性を示し、脂質膜中にも水溶液中にも分布する。「リゾ」は細胞膜を溶解する物性から名付けられているが、受容体に対する作用は膜溶解活性よりもはるかに低い濃度で発揮する。

### （注2） シグナル伝達複合体

GPR174 などの GPCR は細胞外の化学刺激（リガンド結合）によって立体構造を変化させ、細胞内に存在する G タンパク質に作用してシグナルを伝達する。この際に GPCR と G タンパク質が一過的に形成する複合体をシグナル伝達複合体と呼ぶ。

### （注3） バセドウ病

甲状腺を刺激する自己抗体が産生されてしまい、甲状腺ホルモンが過剰に分泌されることで生じる自己免疫疾患。心拍数の増加などの症状を引き起こし、甲状腺クリーゼと呼ばれる生命に危険な状態になることもある。

### （注4） マクロファージ

白血球の 1 種で、生体内を動きまわりながら様々な異物を取り込む。抗原を取り込んだ場合、サイトカインと呼ばれる物質を放出することである種のリンパ球を活性化させる。

### （注5） ミスセンス変異

アミノ酸がつながってできた GPR174 などのタンパク質は、4 種類の塩基（A/C/G/T）からなる遺伝子によってコードされているが、ある塩基が別の塩基に変異したためにコードされたアミノ酸が変化（ミスセンス）することがある。GPR174 のアミノ酸をコードする領域に存在する一塩基多型（rs3827440）は GPR174 の 162 番目のセリン残基をプロリン残基に変異させる（S162P）。日本人の約半数の GPR174 遺伝子はこのミスセンス変異をもつことが知られている。

### （注6） クライオ電子顕微鏡による単粒子解析

サンプルを極低温下で電子顕微鏡によって撮像し、像に含まれる 2 次元の粒子像から 3 次元の立体構造を再構成する手法。

### （注7） NanoBiT システム

生体発光に関わるルシフェラーゼと呼ばれる酵素を分割し、近接によって酵素が再構成されたときに発光反応を起こすようにしたシステム。本研究では、GPR174 に SmBiT と呼ばれる小断片、G $\alpha_s$  サブユニットに LgBiT と呼ばれる大断片を融合し、お互いが近接した時の発光によって GPR174 変異体の活性を測定した。

(注8) 分子動力学シミュレーション

計算機を用いて分子を構成する原子ひとつひとつに対して運動方程式を解くことで分子動態を観察する手法。



【関連する以前の研究のプレスリリース・成果発表】

多発性硬化症治療薬が作用する受容体の構造基盤を解明 ～副作用の少ない安全性の高い薬剤の開発に貢献～（2021年12月24日）

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/12/press20211224-03-s1p.html>

【論文情報】

掲載誌名： Nature Communications

論文タイトル： Structural basis of lysophosphatidylserine receptor GPR174 ligand recognition and activation

（日本語訳： リゾホスファチジルセリン受容体 GPR174 のリガンド認識と活性化の構造基盤）

著者： Jiale Liang\*, Asuka Inoue\*<sup>†</sup>, Tatsuya Ikuta, Ruixue Xia, Na Wang, Kouki Kawakami, Zhenmei Xu, Yu Qian, Xinyan Zhu, Anqi Zhang, Changyou Guo, Zhiwei Huang, Yuanzheng He<sup>†</sup>（\*共同筆頭著者、<sup>†</sup>共同責任著者）

DOI 番号： <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36575-0>

URL： <https://www.nature.com/articles/s41467-023-36575-0>

【問い合わせ先】

<研究に関すること>

東北大学大学院薬学研究科

教授 井上 飛鳥（いのうえ あすか）

電話：022-795-6861

E-mail： [iaska@tohoku.ac.jp](mailto:iaska@tohoku.ac.jp)

<報道に関すること>

東北大学大学院薬学研究科・薬学部 総務係

電話：022-795-6801

E-mail： [ph-som@grp.tohoku.ac.jp](mailto:ph-som@grp.tohoku.ac.jp)