東北大学
TOHOKU UNIVERSITY

Press Release

2024 年 9 月 17 日

報道機関　各位

国立大学法人東北大学

# 免疫制御に関わる生理活性脂質リゾ PS 受容体の立体構造とシグナル選択性の解明

## ～Gα$_{12}$と Gα$_{13}$のシグナル識別に関わる構造基盤～

【発表のポイント】

- リゾホスファチジルセリン（以下、リゾ PS）(注 1) は、免疫応答を抑制する作用を有し、炎症性疾患のクローン病の発症への関与が知られている生理活性脂質です。
- リゾ PS が結合した P2Y10 受容体 (注 2) および Gα$_{13}$ タンパク質 (注 3) からなるシグナル複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡解析 (注 4) を用いて明らかにしました。
- リゾ PS が P2Y10 受容体に特異的に認識される構造基盤を解明したことで、シグナル伝達を選択的に引き起こす薬の開発への貢献が期待されます。

【概要】

リゾ PS は生理活性リゾリン脂質の 1 種であり、P2Y10 受容体や GPR174 受容体を含む G タンパク質共役型受容体（GPCR）(注 5) を介して様々な細胞応答を引き起こします。

今回、東北大学大学院薬学研究科の鎌倉希大学院生、井上飛鳥教授、ハルビン工業大学の Yuanzheng He 教授らの研究グループは、リゾ PS が結合した P2Y10 受容体および Gα$_{13}$ タンパク質からのなるシグナル複合体の立体構造を決定しました。この P2Y10 受容体（Gα$_{12}$ タンパク質と Gα$_{13}$ タンパク質の両方と相互作用する）の構造を、研究グループが以前に解明した GPR174 受容体（Gα$_{13}$ タンパク質に指向性を有する）の構造と比較し、さらに P2Y10 受容体の変異体実験を行うことで、P2Y10 受容体が Gα$_{12}$ タンパク質と Gα$_{13}$ タンパク質の両者を結合する構造基盤を明らかにしました。

以上の研究成果は、P2Y10 受容体を標的とした薬剤の開発に貢献するとともに、シグナル伝達の選択性の理解に役立つことが期待されます。

本研究の成果は、日本時間 2024 年 9 月 12 日にケミカルバイオロジーの専門誌 Cell Chemical Biology に掲載されました。

研究

【詳細な説明】

**研究の背景**

リゾホスファチジルセリン（以下、リゾ PS）は、グリセロール骨格に極性基（リン酸基とアミノ酸の 1 種であるセリンからなるホスホセリン）と 1 つの疎水基（脂肪酸）が結合した構造を有する生理活性脂質です（図 1A）。リゾ PS は様々な生理的な機能を有することが知られ、免疫細胞の 1 種である T 細胞の過剰な活性化を抑制することや、クローン病の発症に関与することが知られています（図 1B）。

これらのリゾ PS の機能の一部は P2Y10 や GPR174 などの G タンパク質共役型受容体（GPCR）により担われます。リゾ PS が受容体に結合すると、受容体の機能がオンとなり、Gα タンパク質を介して細胞内の情報（シグナル）伝達が誘導されます。P2Y10 と GPR174 は互いに GPCR ファミリーの中で最も相同性の高いメンバーですが、相互作用する Gα タンパク質が異なり、その結果、異なる細胞応答が誘起されます（図 1C）。しかしながら、このシグナル伝達の差異がどのような構造基盤に由来するのか明らかになっていませんでした。

**今回の取り組み**

東北大学薬学研究科の鎌倉希大学院生、井上飛鳥教授、ハルビン工業大学の Yuanzheng He 教授らの共同研究グループは、クライオ電子顕微鏡を用いて、リゾ PS 結合型 P2Y10-$G\alpha_{13}$ タンパク質複合体構造を解明し、P2Y10 変異体の機能評価をすることで Gα タンパク質の選択性に重要な P2Y10 のアミノ酸残基を明らかにしました。

初めに、研究グループは P2Y10 シグナル複合体の安定化を図りました。改変型 $G\alpha_{13}$ タンパク質、Gβ タンパク質、$G_{\gamma}$ タンパク質からなる三量体 $G_{13}$ タンパク質と、これを安定化させる一本鎖抗体 scFv16 の複合体を形成し、P2Y10 とリゾ PS を混合させることで、P2Y10 シグナル複合体を得ました。この試料を用いて、クライオ電子顕微鏡による構造解析を行い、リゾ PS 結合型 P2Y10-$G\alpha_{13}$ タンパク質複合体構造を決定しました（図 2）。得られた構造について、研究グループは P2Y10 に対するリゾ PS の結合様式と $G\alpha_{13}$ タンパク質の結合様式に着目しました。

P2Y10 のリゾ PS の結合ポケットを精査したところ、このポケット上部は親水性残基、下部には疎水性残基が配置されていることがわかりました（図 3A, B）。リゾ PS の極性基の認識に正電荷を有する極性アミノ酸や極性相互作用を担うアミノ酸が関与することが考えられました。そこで、これらのアミノ酸残基の重要性を調べるために、それぞれのアミノ酸残基をアラニン残基に置換した変異体を作製し、TGFα 切断アッセイ（注 6）を用いて、リゾ PS に対する受容体応答を評価しました。その結果、3 つの箇所の変異体でリゾ PS に対する応答が減弱することがわかりました（図 3C）。その一方で、2 つの箇所の変異体ではリゾ

PS に対する応答が減弱しませんでした。この結果から、3 つのアミノ酸残基がリゾ PS の認識に重要であり、チロシン残基側鎖はリゾ PS の認識に関与しないことが実証されました。

次に、P2Y10 と $G\alpha_{13}$ タンパク質の相互作用の解析を行いました。一般に、GPCR と Gα タンパク質の相互作用には、Gα タンパク質の C 末端ヘリックス（注 7）が重要であることが知られています。今回のシグナル複合体の構造では、C 末端ヘリックス以外にも、N 末端ヘリックスなどと相互作用することが観察されました（図 3D, E）。そこで、これらの Gα タンパク質活性化に対するこれらの相互作用の重要性を調べるために、相互作用に関わる P2Y10 のアミノ酸残基をアラニン残基に置換した変異体を作製しました。TGFα 切断アッセイと NanoBiT-G タンパク質解離アッセイ（注 8）で評価を行なったところ、リゾ PS 添加による G タンパク質のシグナル活性が大きく減弱しました（図 3F）。このことから P2Y10 と $G\alpha_{13}$ タンパク質の相互作用には C 末端ヘリックスのみならず、C 末端ヘリックス以外との相互作用も重要であることが明らかになりました。

最後に、P2Y10 と GPR174 の立体構造を比較することで、Gα タンパク質選択性が生じる構造基盤を精査しました。以前、本共同研究グループが構造解明した GPR174（参考文献 1）の構造を元に、GPR174-$G\alpha_{13}$ 複合体構造を予測し、今回の P2Y10-$G\alpha_{13}$ 複合体構造と比較しました。その結果、Gα タンパク質の選択性の決定機構として 2 つのアミノ酸残基が重要であることが示唆されました。具体的には $G\alpha_{13}$ タンパク質に対して選択性を示す GPR174 では、①フェニル基を介した立体障害により $G\alpha_{12}$ との相互作用を弱めていること、②アスパラギン残基によって $G\alpha_{13}$ タンパク質との相互作用を強めていることの 2 つのメカニズムが $G\alpha_{12}$ タンパク質に対する $G\alpha_{13}$ タンパク質の選択性を生み出していることが示唆されました（図 4A, B）。このモデルの妥当性を検証するために、GPR174 において $G\alpha_{13}$ タンパク質選択性に関与すると想定されたアミノ酸を P2Y10 に導入し、リゾ PS 添加による G タンパク質のシグナル応答を評価しました。その結果、$G\alpha_{13}$ タンパク質のシグナル活性はほとんど変わらない一方、$G\alpha_{12}$ タンパク質のシグナル活性が選択的に低下することを見出しました（図 4C）。これらの結果から、Gα タンパク質と相互作用する部位のアミノ酸側鎖の種類や配向性が Gα タンパク質の選択性を決定していることが明らかになりました（図 4D）。

**<u>今後の展開</u>**

本研究では、構造研究と機能検証実験により P2Y10 によるリゾ PS の認識機構と $G\alpha_{12}$ タンパク質と $G\alpha_{13}$ タンパク質の識別に関与するアミノ酸残基を明らかにしました。これらの知見は P2Y10 を介するリゾ PS シグナル伝達機構の理解に加えて、$G\alpha_{13}$ シグナルを選択的に活性化する P2Y10 作用薬の合理的な設計に貢献すると考えられます。

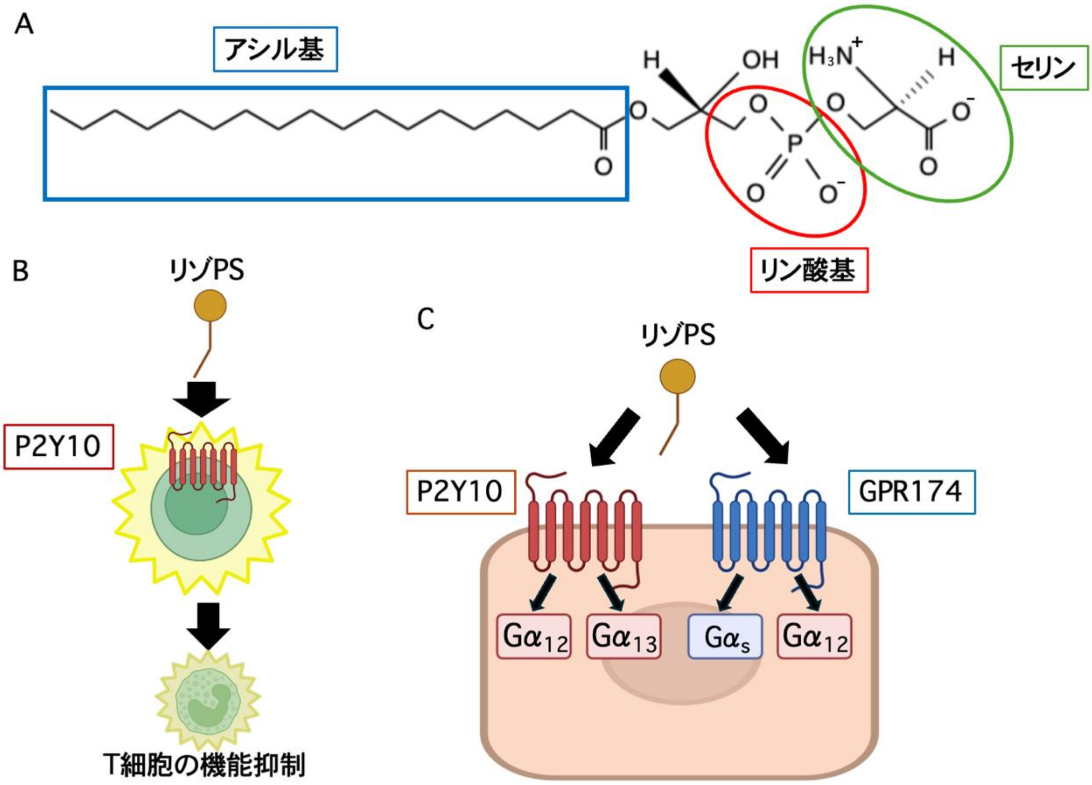


図 1.リゾ PS の機能

A. リゾ PS の構造式。リゾ PS はグリセロール骨格に極性頭部としてホスホセリンを有し、疎水性尾部として 1 本の脂肪酸鎖を有する生理活性脂質である。

B.P2Y10 受容体はリゾ PS の結合によって活性化され、細胞内シグナル伝達経路を活性化することで T 細胞の機能を制御する。

C.P2Y10 と GPR174 のシグナル伝達経路の相違点。P2Y10 と GPR174 はどちらもリゾ PS によって活性化されるが、シグナルを伝達する Gα タンパク質は異なることが知られる。

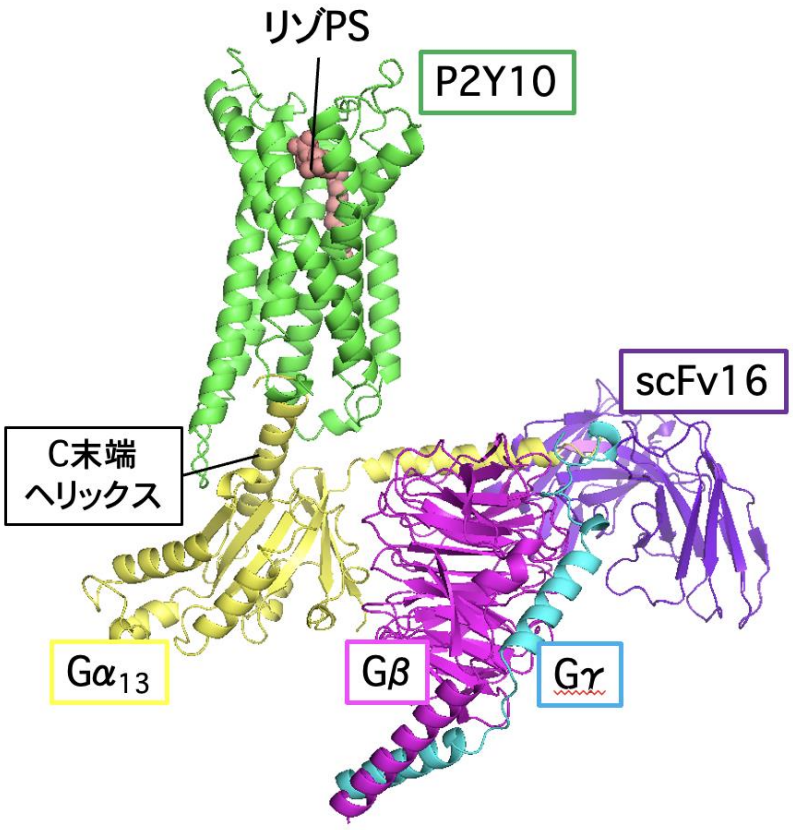


図 2.リゾ PS と $G\alpha_{13}$ タンパク質と結合した P2Y10 シグナル複合体
タンパク質の構造をリボンモデルで表示し、ポリペプチド鎖ごとに色分けした。ヘテロ三量体 $G_{13}$ タンパク質は、改変型 $G\alpha_{13}$ タンパク質、Gβ タンパク質および Gγ タンパク質からなり、scFv16 を結合させることで安定化させた。P2Y10 の誌面下側（細胞質側）に $G\alpha_{13}$ タンパク質が結合し、誌面上側（細胞外側）にリゾ PS が結合することに留意。

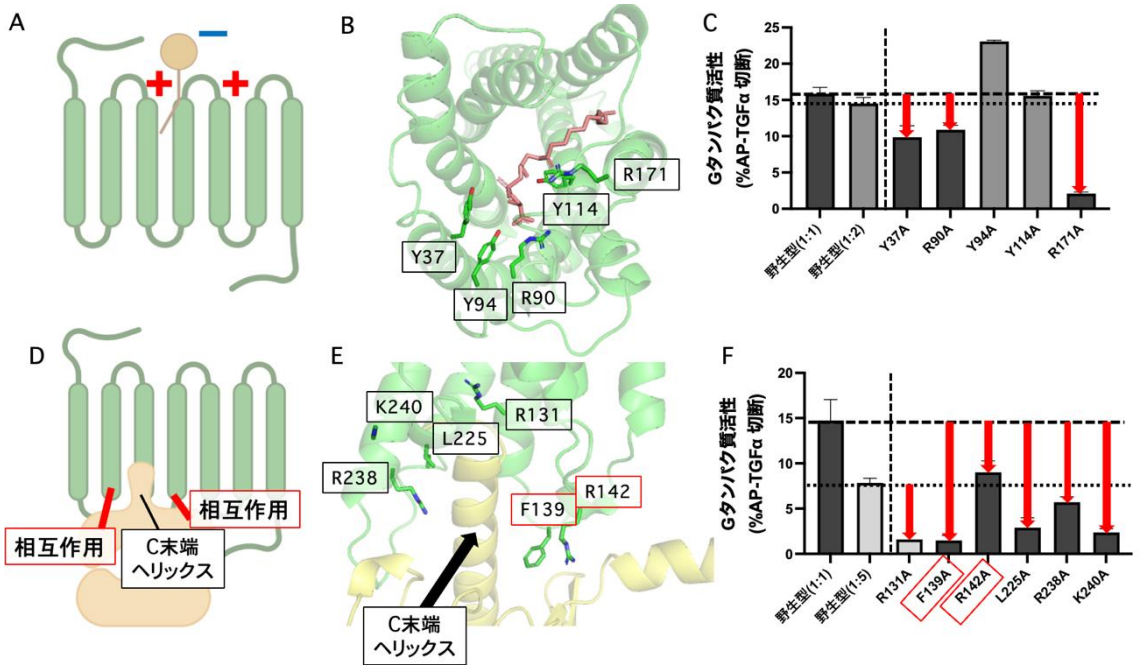


図 3. P2Y10 とリゾ PS、$G\alpha_{13}$ タンパク質の相互作用

A. P2Y10 とリゾ PS の電荷状態の模式図。リゾ PS の極性頭部は負に帯電し、P2Y10 の上部には正に帯電するアミノ酸側鎖が配置していた。

B. リゾ PS 極性頭部との相互作用に関わる P2Y10 の主たるアミノ酸残基。P2Y10 のリゾ PS 結合ポケットを細胞外側から見た構造。アミノ酸残基は、アミノ酸の 1 文字表記と N 末端からの数で表記される（例、Y37 は 37 番目のチロシン）

C. P2Y10 変異体のリゾ PS 添加による G タンパク質シグナル評価。変異体の膜発現量は野生型の色で示しており、Y94A 変異体と Y114A 変異体は野生型（1:2）（プラスミド導入量が 2 分の 1）、他の 3 つの変異体は野生型（1:1）と同等の膜発現量である。3 つの変異体で G タンパク質活性化レベルが顕著に減少した（赤矢印）。

D. P2Y10 と $G\alpha_{13}$ タンパク質の相互作用部位の模式図。P2Y10 は $G\alpha_{13}$ タンパク質の C 末端ヘリックスと相互作用するアミノ酸残基（黒枠）と C 末端ヘリックス以外と相互作用するアミノ酸残基（赤枠）を有する。

E. $G\alpha_{13}$ タンパク質の C 末端ヘリックス以外のアミノ酸残基と相互作用する P2Y10 のアミノ酸残基。F139 と R142 は C 末端ヘリックス以外の部分と相互作用するアミノ酸残基である。

F. P2Y10 変異体のリゾ PS 添加による G タンパク質シグナル評価。変異体の膜発現量は野生型の色で示しており、R131A 変異体は野生型（1:5）（プラスミド導入量が 5 分の 1）、他の 5 つの変異体は野生型（1:1）と同等の膜発現量である。シグナル評価の結果、6 つの変異体で G タンパク質活性化レベル減少した（赤矢印）。これらのアミノ酸残基は水素結合の形成

やイオン結合、疎水性相互作用に関与し、変異体実験において、これらの相互作用の重要性が示された。

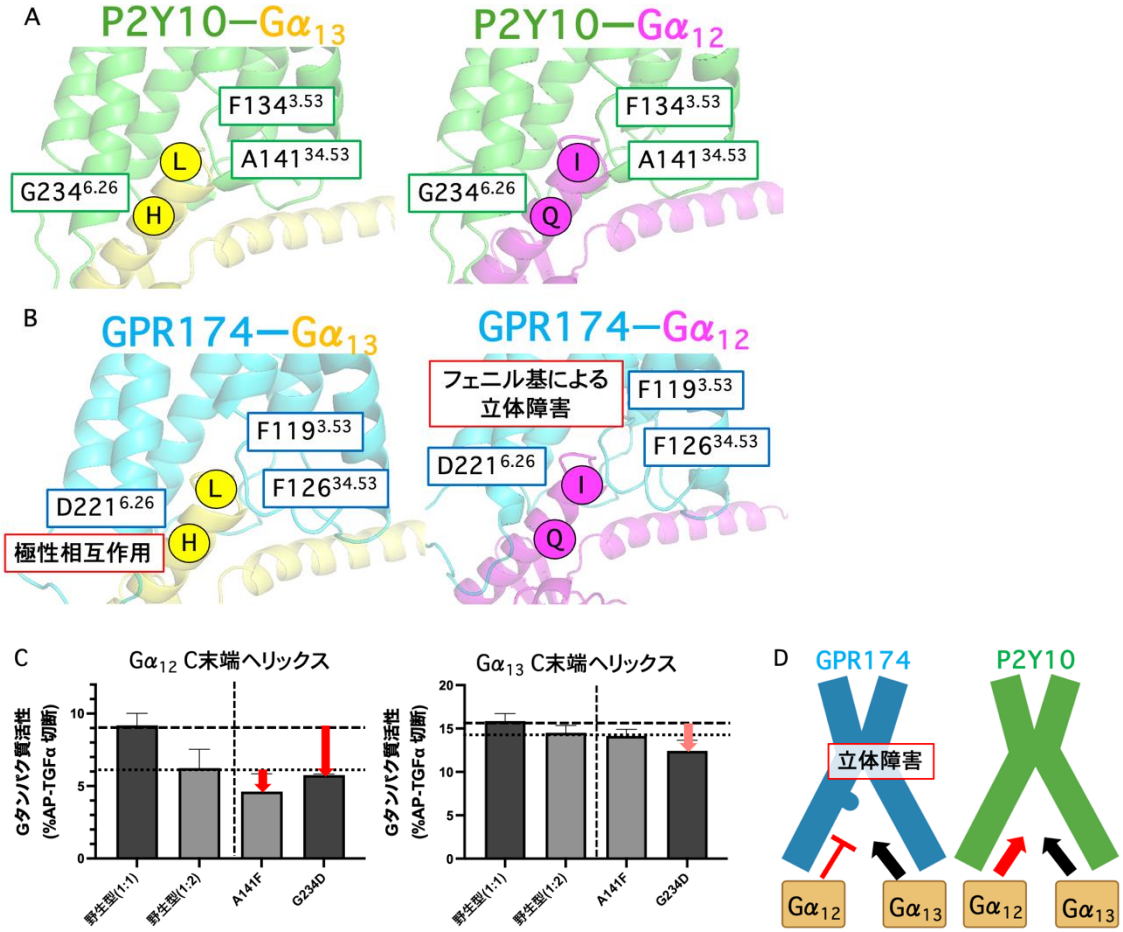


図 4.P2Y10 における $G\alpha_{12}$ タンパク質と $G\alpha_{13}$ タンパク質の選択性のメカニズム

A. P2Y10 と $G\alpha_{12}$ タンパク質/$G\alpha_{13}$ タンパク質の複合体構造。$G\alpha_{12}$ タンパク質の I はイソロイシン、Q はグルタミンを示す。$G\alpha_{13}$ タンパク質の L はロイシン、H はヒスチジンを示す。P2Y10 の上付数字は、構造ベースの相同位置を表す（例、$F141^{34.53}$ は N 末端から 141 番目のフェニルアラニンで、GPCR の構造上の位置は 34.53 番）。

B. GPR174 と $G\alpha_s$ タンパク質の複合体構造からモデリングした GPR174 と $G\alpha_{12}$ タンパク質/$G\alpha_{13}$ タンパク質複合体構造。GPR174 は $G\alpha_{13}$ タンパク質との相互作用ができるが、$G\alpha_{12}$ タンパク質との相互作用時には F126 と F119 が立体障害を生じるため、$G\alpha_{12}$ タンパク質とは結合できないことが想定された。GPR174 と $G\alpha_{12}$ タンパク質の相互作用において D221 は $G\alpha_{13}$ タンパク質で生じる極性相互作用が解消されることから、GPR174 と $G\alpha_{12}$ タンパク質の相互作用は減弱することが想定される。

C. P2Y10 変異体アッセイのリゾ PS 添加による G タンパク質シグナル評価。

変異体の膜発現量は野生型の色で示しており、A141F 変異体は野生型（1:2）（プラスミド導入量が 2 分の 1）、G234D 変異体は野生型（1:1）と同等の膜発現量である。シグナル評価の結果、両方の変異体で $G\alpha_{12}$ タンパク質のシグナル活性が選択的に減少したことから、フェニル基による立体障害と極性相互作用の解消が $G\alpha_{12}$ タンパク質との相互作用を減弱させていることが明らかになった。

D. リゾ PS 受容体の Gα タンパク質選択性を決めるメカニズム。２つのリゾ PS 受容体において、$G\alpha_{12}$ タンパク質と $G\alpha_{13}$ タンパク質の選択性に関わる構造基盤として、リゾ PS 受容体のアミノ酸残基による立体障害や極性相互作用の関与を見出した。

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会（JP21H04791, JP21H05113, JP21H05037）、日本医療研究開発機構（JP22ama121038, JP22zf0127007）、科学技術振興機構（JPMJFR215T, JPMJMS2023）をはじめとした研究費の支援を受けて実施されました。

【用語説明】

注1. リゾホスファチジルセリン（リゾ PS）

生理活性物質の一種。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。ホスファチジルセリンは細胞膜に存在するリン脂質の一種である。

注2. P2Y10 受容体

GPCR の一種であり、リゾリン脂質受容体である。リゾ PS と結合し、$G_{12/13}$ シグナルを伝達する。

注3. $G\alpha_{13}$ タンパク質

$G\alpha_s$、$G\alpha_i$、$G\alpha_q$、$G\alpha_{12}$ の 4 つのファミリーに大別される G タンパク質の一種であり、$G\alpha_{12}$ ファミリーに含まれる。$G\alpha_{12}$ ファミリーには $G\alpha_{12}$ タンパク質と $G\alpha_{13}$ タンパク質が含まれ、この 2 つのタンパク質は類似している。

注4. クライオ電子顕微鏡解析

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 次元粒子の像から 3 次元の立体構造を再構成する手法。

注5. G タンパク質共役型受容体（GPCR）

細胞表面の細胞膜に発現する受容体であり、細胞膜を 7 回貫通する特徴的な構造を有する。4 種に大別されるヘテロ三量体 G タンパク質と相互作用することで細胞内に異なるシグナルを伝達する。ヒトにおいて約 800 種類

存在し、それぞれが特異的な細胞外のホルモンや代謝物と結合する。

注6.　TGFα 切断アッセイ

膜発現タンパク質 Transforming Growth Factor α（TGFα）の膜からの切断反応を利用した、Gα タンパク質の活性化測定法。$G\alpha_q$ タンパク質の情報伝達の下流で膜型タンパク質分解酵素が活性化し、TGFα の細胞外部位を切断する。TGFα にアルカリホスファターゼ（AP）を融合したレポータータンパク質（AP-TGFα）を用いることで、TGFα の切断量を細胞培養液の AP の比色反応として簡便に定量できる。本研究では AP-TGFα、P2Y10（またはその変異体）、$G\alpha_q$ タンパク質の C 末端ヘリックスを $G\alpha_{12}$ または $G\alpha_{13}$ に置換したキメラ G タンパク質をリポフェクション法により、G タンパク質欠損 HEK293 細胞に発現させ、この細胞にリゾ PS を添加し、培養上清中に放出される AP-TGFα 量を GPCR と Gα タンパク質の相互作用の強度として評価した。

注7.　Gα タンパク質 C 末端ヘリックス

26 アミノ酸から成る GPCR との相互作用部位。

注8.　NanoBiT-G タンパク質解離アッセイ

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システム。本研究では $G\alpha_{13}$ タンパク質に LgBiT と呼ばれる大断片、Gγ タンパク質に SmBiT と呼ばれる小断片を融合し、お互いが解離する時の発光の減少によって、リゾ PS 添加時の P2Y10 変異体の応答性を測定した。

【参考文献】

参考文献 1

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 ～（Commun Biol, 2022）

https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2023/02/press20230228-01-signal.html

【論文情報】

タイトル：Structural insight into lysophosphatidylserine binding and $G\alpha_{13}$ –coupling selectivity of P2Y10.

著者：Han Yin[1,4], Nozomi Kamakura[2,4], Yu Qian[1], Manae Tatsumi[2], Tatsuya Ikuta[2], Jiale Liang[1], Zhenmei Xu[1], Ruixue Xia[1], Anqi Zhang[1], Changyou Guo[1], Asuka Inoue[2,3*], Yuanzheng He[1,5*]

[1]Laboratory of Receptor Structure and Signaling, HIT Center for Life Sciences, School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China

[2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3, Aoba,

Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8578 Japan
[3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-Shimo-Adachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501 Japan
[4]These authors contributed equally to this work
[5]Lead contact
*責任著者：東北大学　大学院薬学研究科　教授　井上飛鳥
掲載誌：Cell Chemical Biology
DOI：https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2024.08.005
URL：https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451945624003532

【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
TEL:022-795-6861
Email: 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
TEL: 022-795-6801
Email: ph-som@grp.tohoku.ac.jp