

アドレナリン受容体のシグナル選択性の構造基盤

Structural basis of adrenergic receptor signaling

所属機関：清華大学 代表研究者氏名：豊田 洋輔

研究期間：2021年5月1日～2022年4月30日

滞在研究機関： School of Medicine, Tsinghua University
Beijing, 100084, China

共同研究者等： Prof. Brian K. Kobilka

10-point Times New Roman and about 200 words in length.

The α_{1A} -adrenergic receptor (α_{1A} AR) belongs to the family of G protein-coupled receptors that respond to adrenaline and noradrenaline. α_{1A} AR is involved in smooth muscle contraction and cognitive function. Here, we present three cryo-electron microscopy structures of human α_{1A} AR bound to the endogenous agonist noradrenaline, its selective agonist oxymetazoline, and the antagonist tamsulosin, with resolutions range from 2.9 Å to 3.5 Å. Our active and inactive α_{1A} AR structures reveal the activation mechanism and distinct ligand binding modes for noradrenaline compared with other adrenergic receptor subtypes. In addition, we identified a nanobody that preferentially binds to the extracellular vestibule of α_{1A} AR when bound to the selective agonist oxymetazoline. These results should facilitate the design of more selective therapeutic drugs targeting both orthosteric and allosteric sites in this receptor family.

研究目的

アドレナリン受容体は7回膜貫通型のGタンパク質共役受容体(GPCR)の一種であり、ホルモンであるアドレナリンや神経伝達物質であるノルアドレナリンが結合することにより、細胞内の三量体Gタンパク質と共役し交感神経を調節する。アドレナリン受容体(AR)には α_1 ARs(α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} ; 主に血管平滑筋に存在、 $G_{q/11}$ 共役)、 α_2 ARs(α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} ; 主に中枢神経に存在、 $G_{i/o}$ 共役)、 β ARs(β_1 , β_2 , β_3 ; 主に心臓や肺に存在、 G_s 共役)の計9分子種(サブタイプ)あり、それぞれ異なるGタンパク質と共役し異なるシグナル経路を活性化する。これらのうち、 β_2 ARが最も良く研究されており、申請者の留学先指導教官であるKobilka博士らにより2007年に拮抗剤が結合した不活性型 β_2 ARの構造[1]、2011年に作動薬が結合した活性型 β_2 AR-Gs複合体の構造[2]が報告されている。これらの成果によりKobilka博士は2012年のノーベル化学賞を受賞している。スタンフォード大学の教授に加え、2012年より清華大学の客員教授も併任している。

β ARsに比べ α ARsの立体構造に関しては報告例が少なく、2019年以降、活性型 α_{2A} AR-Go[3]、不活性型 α_{2A} AR[4]、活性型 α_{2B} AR-Gi/o[5]、不活性型 α_{2C} AR[6]が報告されたものの、 α_1 ARに関しては、2022年の不活性型 α_{1B} ARの構造[7]のみである。

そこで我々は今回、クライオ電子顕微鏡を利用することにより、活性型および不活性型 α_{1A} ARの3種類の新規構造を決定した(Toyoda et al. *Nature Commun.*, 2023)。選択的作動薬であり鼻粘膜充血除去剤として市販されているオキシメタゾリン、あるいは内因性リガンドであるノルアドレナリンが結合した2種類の活性型構造、および低血圧や前立腺肥大症の治療薬として利用されている拮抗剤タムロシンが結合した不活性型の構造である。これらの構造情報により、 α_{1A} ARを標的としたより選択的な医薬品の開発が期待される。

研究経過

昆虫細胞 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) に α_{1A} ARを発現させ、界面活性剤による可溶化やFLAGタグなど

を用いて精製した。さらに $\alpha_{1A}AR$ を安定化させるため、近年 Kruse 研究室らにより確立された合成ナノボディ（単ドメイン抗体、Nb）ライブラリー [8] を基に、Nb が細胞表面に発現した出芽酵母を磁気ビーズによる Magnetic-activated cell sorting (MACS) や蛍光標識による Fluorescence-activated cell sorting (FACS) によりスクリーニングした。作動薬（オキシメタゾリン）または拮抗薬（タムスロシン）が結合した異なる状態の $\alpha_{1A}AR$ 精製標品を用い、立体構造選択的なナノボディの選別を行った結果、Nb29 がオキシメタゾリン結合型の $\alpha_{1A}AR$ を選択的に認識し、オキシメタゾリンの結合を強めることが推測された。その分子メカニズムを調べるため、 $\alpha_{1A}AR$ と Nb29 の複合体を形成させ、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行ったところ、Nb29 が $\alpha_{1A}AR$ の細胞外領域を認識していることが判明した。しかしながら、分解能が不十分であり、特に細胞内側の $\alpha_{1A}AR$ の構造が不安定であった。 $\alpha_{1A}AR$ は Gq タンパク質と共役するが、GPCR-Gq 複合体は GPCR-Gs 複合体や GPCR-Gi/o 複合体に比べ不安定であることが多く、代替として、改変体である miniGsq を用いた構造決定が近年報告されている [9]。miniGsq は mini-Gs（Gs タンパク質の動的領域を削除した縮小変異体）の C 末端 $\alpha 5$ helix を Gq タンパク質の C 末端 $\alpha 5$ helix と置換した改変体である。我々は検討の結果、Nb29- $\alpha_{1A}AR$ -miniGsq 複合体として、オキシメタゾリンあるいはノルアドレナリンが結合した二つの活性型 $\alpha_{1A}AR$ のクライオ電子顕微鏡構造を、それぞれ 2.9 Å と 3.5 Å の分解能で得た (Figure 1a-d)。

それと並行し、不活性型の $\alpha_{1A}AR$ の構造決定にも取り組んだ。不活性型 GPCR は、活性型 GPCR-G タンパク質複合体に比べて分子量が小さいため、クライオ電子顕微鏡に比べ X 線回折による結晶構造解析が主流である。細胞膜外ループ領域への融合タンパク質の挿入や立体構造認識抗体を用いた結晶化が汎用されており、我々も融合タンパク質を挿入した $\alpha_{1A}AR$ 変異体や、合成 Nb ライブラリーから選別した別のナノボディを用い、結晶化およびクライオ電子顕微鏡による不活性型 $\alpha_{1A}AR$ の解析を試みたものの、構造決定には至らなかった。最終的に、2021 年末に bioRxiv に投稿された κ -オピオイド受容体 (kOR) のキメラ変異体による手法を用いた [10]。この手法では、kOR を不活性型に固定するナノボディ Nb6 のエピトープ（抗原認識部位）である kOR の細胞内側

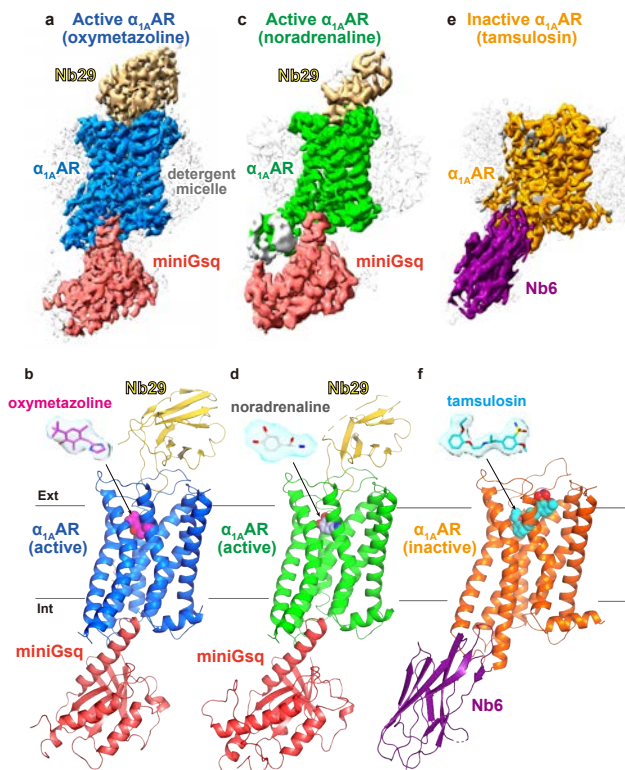


Figure 1: The cryo-EM density maps and structure models of the Nb29- $\alpha_{1A}AR$ -miniGsq complexes bound to the agonists oxymetazoline (a and b) and noradrenaline (c and d), and $\alpha_{1A}AR$ -Nb6 complex bound to the antagonist tamsulosin (e and f).

の膜貫通領域 (transmembrane; TM) 5 と 6、および細胞内第 3 ループを別の GPCR に移植し、Nb6 と複合体を形成させることにより、ニューロテンシン受容体 NTSR1 やソマトスタチン受容体 SSTR1 の不活性型構造をクライオ電子顕微鏡により決定している。我々はこれを応用し、 $\alpha_{1A}AR$ へ Nb6 のエピトープを導入した $\alpha_{1A}AR$ -kOR キメラ変異体を作製し、 $\alpha_{1A}AR$ -Nb6 複合体として、タムスロシンが結合した不活性型 $\alpha_{1A}AR$ のクライオ電子顕微鏡構造を 3.3 Å の分解能で得た (Figure 1e, f)。

活性型および不活性型 $\alpha_{1A}AR$ の構造を比較した結果、活性型では TM 6 が外側に 14.5 Å 移動していた (Figure 2a)。その他、膜貫通 helix 3、5、7 が内側に微移動しており、これらの構造変化により、 $\alpha_{1A}AR$ と miniGsq の C 末端 $\alpha 5$ helix との結合が促進された。一方、不活性型 $\alpha_{1A}AR$ では Nb6 による膜貫通 helix 6 の固定が認められた。

続いて 3 種類のリガンド結合状態を比較した (Figures 1b, d, f and 2b)。内在性リガンドであるノルアドレナリンに対し、オキシメタゾリンではアミノ基がイミダゾール環に置換しており、 $\alpha_{1A}AR$ のフェ

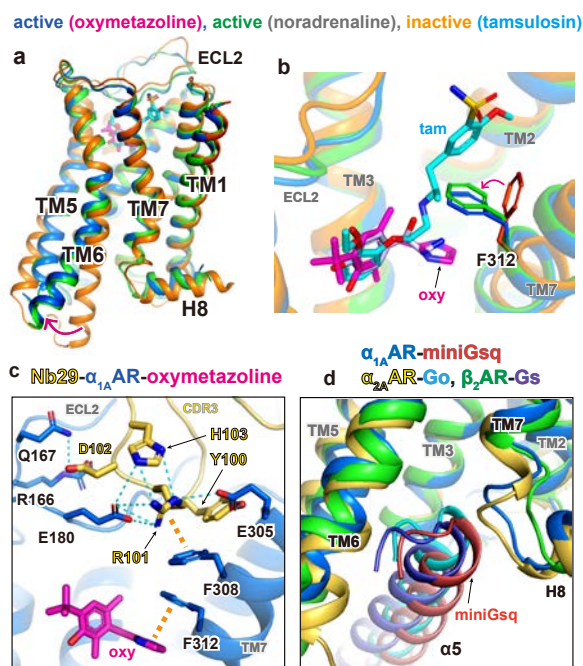


Figure 2: **a**, Comparison of $\alpha_{1A}AR$ between active and inactive states. **b**, Comparison of ligand-binding pockets of $\alpha_{1A}AR$. **c**, Nb29 binding sites. **d**, Superimposition of the binding interfaces of $\alpha_{1A}AR$ -miniGsq complex with $\alpha_{2A}AR$ -Go (PDB ID: 7EJ0) and β_2AR -Gs (PDB ID: 3SN6) complexes. The receptors are used for alignment.

ニルアラニン 312 の側鎖とより強く π - π 相互作用していることが分かった。このフェニルアラニン残基は α_1ARs および α_2ARs 間で保存されている一方、 βARs ではアスパラギンである。この他、 $\alpha_{1A}AR$ に特徴的なアミノ酸であるメチオニン 292 やバリン 185 が作動薬の選択性に寄与していることが分かった。一方、タムスロシンが結合した不活性型の構造では、フェニルアラニン 312 の側鎖による蓋が開いており、作動薬が結合しているオルソステリック部位から細胞外前庭部 (extracellular vestibule) に亘りタムスロシンが結合し、TM 7 を僅かに外向きへ広げていた。

次に、Nb29 が作用機構について調べた。Nb29 は $\alpha_{1A}AR$ の細胞外第二ループ (ECL2) や TM7 を主に認識し、相補性決定領域 (complementary-determined region; CDR) 1-3 の内、最も長い CDR 3 が細胞外前庭部に結合することにより、TM7 を内向きに安定化していることが分かった (Figure 2c)。このような TM7 の内向きへの安定化によるポジティブアロステリック調節機構は、ムスカリン性アセチルコリン M2 受容体のポジティブアロステリック調節薬である LY2119620 が結合した構造においても報告されており、 $\alpha_{1A}AR$ でも同様の作用機序が示唆された。

最後に我々は $\alpha_{1A}AR$ -miniGsq、 $\alpha_{2A}AR$ -Go、 β_2AR -Gs の複合体の構造を比較することにより、G タンパク質共役の選択性を調べた (Figure 2d)。 $\alpha_{1A}AR$ -miniGsq では miniGsq の C 末端 $\alpha 5$ helix が $\alpha_{1A}AR$ の TM7 に近く、これに対し、 β_2AR -Gs では Gs の C 末端 $\alpha 5$ helix が β_2AR の TM5 の方向へ向いており、 $\alpha_{2A}AR$ -Go では Go の C 末端 $\alpha 5$ helix がその中間に位置していた。これらの相互作用の違いには、各々の受容体および G タンパク質のアミノ酸配列の違いが関係していることが分かった。

考察

本研究により、内在性リガンドであるノルアドレナリン、または選択的作動薬オキシメタゾリンが結合した活性型の構造、および拮抗薬タムスロシンが結合した不活性型の構造を決定し、 $\alpha_{1A}AR$ に特徴的なリガンド認識機構が明らかとなった。また、本研究では細胞外領域を認識するナノボディ Nb29 を見出し、 $\alpha_{1A}AR$ の活性を特異的にアロステリック調節する構造基盤を示した。また、 $\alpha_{1A}AR$ -miniGsq 複合体と、 $\alpha_{2A}AR$ -Go 複合体、 β_2AR -Gs 複合体の構造を比較することにより、G タンパク質共役のサブタイプ選択性を示唆する結果を得た。以上により、アドレナリン受容体の主要なサブタイプ (α_1 、 α_2 、 β) の活性型および不活性型の構造が揃ったことになり、これらの知見は、低分子薬のみならず、アロステリック調節薬や抗体医薬の効果的な設計に寄与することが期待される。

参考文献

- Cherezov, V., et al., High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 2007. **318**.
- Rasmussen, S.G., et al., Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 2011. **477**(7366): p. 549-55.
- Xu, J., et al., Structural insights into ligand recognition, activation, and signaling of the α_{2A} adrenergic receptor. *Sci Adv*, 2022. **8**(9): p. eabj5347.

4. Qu, L., et al., Structural Basis of the Diversity of Adrenergic Receptors. *Cell Rep*, 2019. **29**(10): p. 2929-2935.e4.
5. Yuan, D., et al., Activation of the α_{2B} adrenoceptor by the sedative sympatholytic dexmedetomidine. *Nat Chem Biol*, 2020.
6. Chen, X., et al., Molecular Mechanism for Ligand Recognition and Subtype Selectivity of α_{2C} Adrenergic Receptor. *Cell Rep*, 2019. **29**(10): p. 2936-2943.e4.
7. Deluigi, M., et al., Crystal structure of the α_{1B} -adrenergic receptor reveals molecular determinants of selective ligand recognition. *Nat Commun*, 2022. **13**(1): p. 382.
8. McMahon, C., et al., Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nat Struct Mol Biol*, 2018. **25**(3): p. 289-296.
9. Nehmé, R., et al., Mini-G proteins: Novel tools for studying GPCRs in their active conformation. *PLoS One*, 2017. **12**(4): p. e0175642.
10. Robertson, M.J., et al., Structure Determination of Inactive-State GPCRs with a Universal Nanobody. *bioRxiv*, 2021.
11. Kruse, A.C., et al., Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 2013. 504(7478): p. 101-6.

研究の発表

口頭発表

なし

誌上発表

1. Yosuke Toyoda^{*,#}, Angqi Zhu^{*}, Fang Kong, Sisi Shan, Jiawei Zhao, Nan Wang, Xiaoou Sun, Linqi Zhang, Chuangye Yan[#], Brian K. Kobilka[#], Xiangyu Liu[#], Structural basis of α_{1A} -adrenergic receptor activation and recognition by extracellular nanobody, *Nature Communications* **14**, 3655 (2023). (*These authors contributed equally to the work, [#]Correspondence) <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39310-x>