

高親和性型ヒスタミン受容体の安定化と構造解析

九州大学大学院 薬学研究院 蛋白質創薬学分野
白石 充典

1. はじめに

ヒスタミン H_3 受容体(H_3R)は中枢ヒスタミン神経のシナプス前細胞に高く発現し、シナプスからの生理活性物質の放出を制御するGタンパク質共役型受容体(GPCR)である¹⁾。 H_3R の阻害薬は肥満症、注意欠陥多動性障害、統合失調症やアルツハイマー病などの治療薬として注目されている²⁾。 H_3R は申請者らが立体構造を解明したヒスタミン H_1 受容体(H_1R)とは異なる高親和性型ヒスタミン受容体であり、 H_1R との相同性は約20%程度と低く、 H_1R の立体構造を基にした特異性の高い化合物設計は困難と考えられる。またヒスタミン H_4 受容体(H_4R)と相同性が高く、 H_3R の阻害剤の多くが H_4R にも結合する。このようなことから、特異性の高い薬剤の効率的な開発には、 H_3R の立体構造が必須である。本研究では H_3R の高発現かつ安定な改変体を創製し、阻害薬(アンタゴニストまたはインバースアゴニスト)との複合体構造を高分解能で明らかにすることで、特異的な薬剤の設計に重要なファクターを明らかにすることを目標とする。

2. 方法

本研究ではまずタンパク質工学的手法を駆使し、高発現かつ安定な H_3R 改変体の創製を試みた。具体的には、(i)N末端、C末端の削除。(ii)第3ヘリックス3.41部位へのTrp変異導入。(iii)Alaスキヤニングによる高発現・安定化改変体作製。(iv)結晶化促進のための細胞内第3ループへのT4リゾチーム(T4L)や安定化チトクロム b_{562} 変異体(BRIL)の融合、の改変を試みた。そして良好な性状を示した改変を組み合わせ、さらに高発現で安定な改変体の作製を行った。

H_3R 改変体の作製、評価には申請者らが確立した、出芽酵母*S. cerevisiae*を用いた発現・評価システムを用いた³⁾。このシステムを用いることで、作製したい改変体を、PCR断片と直鎖化した発現ベクターを同時に形質転換するだけで、ワンステップで構築しそのまま少量培養することで発現確認が可能である。発現確認後、酵母菌体をガラスビーズで破碎し、膜画分を抽出後、改変受容体の安定性を評価するためにゲル濾過による性状評価を行った。結晶構造解析に適したサンプルは、溶液中で凝集せず単分散の状態にあることが望ましい。 H_3R のC末端には緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合しており、膜画分を可溶化後、高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた蛍光ゲルろ過(FSEC)による改変体の単分散性の評価を行った。

大量発現には、*S. cerevisiae*とメタノール資化性酵母*Pichia pastoris*を用いた。*S. cerevisiae*の場合ウラシル欠損合成培地を用い、終濃度2%ガラクトースにて発現誘導を行った。また*P. pastoris*の場合はBMGY培地で前培養を行った後、メタノールを含むBMMY培地に変え発現誘導を行った。破碎、膜画分調製および精製は H_1R と同様の方法で行った⁴⁾。簡単に述べると、酵母菌体をガラスビーズで破碎後、遠心分離(100,000 g, 1時間)で膜画分を分離した。分離した膜画分を洗浄後、ドデシルマルトシド(DDM)を用いて可溶化した。精製はインバースアゴニスト存在下で、金属キレートアフィニティークロマト

グラフィー (IMAC) により行った。IMAC精製後TEVプロテアーゼを用いてC末端に融合したGFPを切断し、リバースIMACによりGFPとTEVプロテアーゼを除き、最終精製とした。

3. 結果

(1) H₃R改変体の作製と評価

H₃R野生型の場合、*S. cerevisiae*における発現が低くFSECの結果もボイドピークがメインとなることから、きちんとフォールドしていない、もしくは不安定で可溶化により変性し凝集しているものが多く存在していると考えられた。細胞内第3ループへT4リゾチームを融合したところ、全体の発現量が増加し、可溶化効率も向上した。FSECの結果、ボイドピークよりも低分子側に受容体由来の新たなピークが見られたことから、野生型よりも安定化していることが伺えた。構造解析に成功したヒスタミンH1受容体におけるT4Lの融合位置⁵⁾を基準とし、前後2アミノ酸ずつ長くまたは短くした5×5=25通りの組み合わせを試したが、FSECにおいて単分散性の良好となる改変体を得ることができなかった。また、第3ヘリックスの3.41部位をTrpに置換したが、野生型およびT4L融合改変体において変化が見られなかった。

次にチトクロムb₅₆₂変異体 (BRIL) の融合を試みた。ここではH₃RでT4Lを融合した位置を基準に、N末端側を11通り、C末端側を9通り、合わせて11×9=99通りの組み合わせを試みたところ、FSECにおいて単分散性の良好な改変体が2つの組み合わせに関して得られた。

前述のBRIL融合改変体2種類に関して、さらに安定性を向上させるためAlaスキニングを行った。その結果膜貫通領域3箇所において、FSECの単分散性をさらに向上させるAla変異が見つかった。またこれらの組み合わせによってさらに向上した。C末端の削除に関しては発現量に寄与しなかったが、N末端の削除により1.2倍程発現が向上した。

(2) H₃R改変体の大量調製

細胞内第3ループにBRILを融合し、Ala変異を導入、さらにN末端の削除を組み合わせた改変体について、まず*S. cerevisiae*を用いて大量調製を試みた。IMAC精製により、培地3Lあたり0.1mg程度の精製蛋白質を得ることができることが分かったが、さらに発現量を上げるために発現宿主を*P. pastoris*に変えることにした。*P. pastoris*を用いて発現させたところ、GFPの蛍光強度による菌体あたりの発現量は*S. cerevisiae*と同程度であったが、単位培地あたりの菌体量は*S. cerevisiae*の3倍程度であり、目的受容体の界面活性剤による可溶化効率も50%→90%と、大幅に向上することがわかった。

IMACによる精製の結果、菌体80gあたり約5mgのタンパク質を精製されたが、SDS-PAGEの結果より、ダイマーと思われる位置にメインのバンドが、その下にモノマーと思われるバンドが確認された。TEVプロテアーゼで処理したところ、ダイマーと思われるバンドに変化が無く、その後のリバースIMACにより約0.5mgの最終精製タンパク質を得た。しかしIMAC精製後と比べると約10分の1程度に減少していた。

(3) 精製したH₃Rタンパク質の解析

精製したH₃R改変体タンパク質は、SDS-PAGEおよびゲル濾過 (蛍光ではなくUV検出器による検出) の結果、モノマーであることが確認された。また放射性同位体ラベルしたヒスタミンを用いた結合実験では、結合活性がほとんど確認されなかったが、これは改変による親和性低下であると考えられた。そこで等温滴定型カロリメーターを用いて相互作用を測定したところ、相互作用が確認され、親和性はK_d=5×10⁻⁶ M程度であった。また蛍光色素を用いたサーマルシフトアッセイによる熱安定性解析を行ったところ、T_m値が約55℃であり、結晶化を行うにあたり十分な安定性を有することが確認できた。

4. まとめと今後の方針

本研究ではヒスタミンH₃受容体に関して、精製および結晶化可能なレベルまで安定化した改変体を作製することができた。IMAC精製後では5mgの精製タンパク質が確認されたが、TEVプロテアーゼ処理およびリバースIMAC後の最終精製タンパク質の収量は0.5mgと、大幅に減少していた。現在のところ原因ははっきりとはしていないが、発現した受容体タンパク質が何らかの原因で二量体を形成し、TEVプロテアーゼの切断サイトを隠している可能性が考えられる。今後受容体タンパク質のコンストラクトを改良し、TEVプロテアーゼの切断効率を上げることを考えている。

今後、精製したH₃R 改変体タンパク質を用いて、キュービック相結晶化法により、アンタゴニストやインバーサゴニストとの複合体の結晶化を行う。共結晶化を試みるリガンドは親和性が高いもの(K_dで数nM 以上)を数種類試みる。その際にリガンド-受容体複合体の熱安定性を評価し、熱安定性の高い複合体から順次結晶化を行う。得られた結晶からの回折データ収集は、Spring-8のマイクロフォーカスビームを用いて行う。

5. 参考文献

- 1) Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM “High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain” *Nature* 408, 860-864 (2000)
- 2) Leurs R, Vischer HF, Wijtmans M, de Esch IJP “En route to new blockbuster anti-histamines: surveying the offspring of the expanding histamine receptor family” *Trends in Pharmacol. Sci.* 32, 250-257 (2011)
- 3) Shiroishi M, Tsujimoto H, Makyio H, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shimamura T, Murata T, Nomura N, Haga T, Iwata S Kobayashi T “Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in *Saccharomyces cerevisiae*” *Microb Cell Fact.* 11:78 (2012)
- 4) Shiroishi M, Kobayashi T, Ogasawara S, Tsujimoto H, Ikeda-Suno C, Iwata S, Shimamura T. “Production of the stable human histamine H1 receptor in *Pichia pastoris* for structural determination.” *Methods*, 55, 281-286 (2011)
- 5) Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC, Iwata S. “Structure of the human histamine H(1) receptor complex with doxepin.” *Nature*, 475, 65-70. (2011)