

# GPCR型受容体の立体構造予測に基づく内在性リガンドの発見

平本 豪志

受容体タンパク質は中枢神経や末梢神経の細胞間情報伝達において重要な役割を担っており、特にG-protein coupled receptor (GPCR)は多くの創薬のターゲットとしても重要視されている。しかしながら、GPCRは膜タンパク質であるためにX線結晶解析が困難であり、ほとんどのものはその立体構造が解明されていない。従来は薬物構造活性相関は生理活性物質の作用を合理的に説明しようとする作業であり、そこから新規なリード化合物の探索を期待することは困難である。今後、効率的に新薬開発を進めていくためには、生命情報学的な解析結果を踏まえ、合理的かつ効率的に薬物分子を設計する手法が重要と認識されている。そこで、本研究では計算科学と遺伝子工学的アプローチにより、GPCR型受容体の立体構造と、受容体-リガンド間の相互作用機序を解明し、それらをもとに効率的に新規作用リガンドの探索を行うことを目的とした。

第1章では、既に3D構造が解明されているウシロドプシン (GPCR型受容体の一つ) について、Fourier変換法とホモロジーモデリングを併用して立体構造モデルの作製を行い、リガンドであるレチノール結合を検討した。その結果、得られた3D構造は、これまでに報告されているレチノール結合の情報を満足していた。そこで、同様の手法を用いて、ヒトP2Y<sub>1</sub>受容体について3Dモデルを作製した。

第2章では作製したP2Y<sub>1</sub>受容体の3Dモデルの精度が十分に実用的であることを、*in silico* スクリーニングによって、既知のリガンドが検出できることにより実証した。すなわち、ドッキングシミュレーションソフト-AutoDock3.0を用い、*in silico* スクリーニングを行なったところ、化合物データベースに予め加えた既知のP2Y<sub>1</sub>リガンドが上位6%内に抽出された。また、AutoDockを用いて作製した、内在性リガンドであるADPとP2Y<sub>1</sub>受容体の複合体モデルは、ADPが受容体のヘリックス束の内側に結合していることを示しており、リガンドの結合様式としては、ADPのリン酸基と受容体の塩基性アミノ酸 (Lys280、Arg310) 間で形成される水素結合がリガンド結合に重要であることを示唆していた。これらのアミノ酸残基はADP以外の既知のアゴニスト、アンタゴニストでも共通して重要であると考えられた。

第3章では*in silico* スクリーニングで得た化合物の活性を検証するための*in vitro* での実験系の開発を行なった。P2Y<sub>1</sub>-Gqα融合タンパク質をCHO細胞に大量発現させ、ADP刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>応答を測定したところ、P2Y<sub>1</sub>アンタゴニストで拮抗される、きわめて感度の高い反応を得た。これをP2Y<sub>1</sub>受容体のアッセイ系とした。

第4章では第2章での*in silico* スクリーニングの結果を第3章で開発したCa<sup>2+</sup>アッセイを用いて検証した。第2章で上位6%以内に含まれる既知リガンド以外の化合物について、Ca<sup>2+</sup>応答を指標に活性を測定したところ、3個の新しいP2Y<sub>1</sub>受容体アゴニストが発見できた。そのうち5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate(PRPP)は最も高い親和性を示した。また、*in silico* スクリーニングの結果であるAutoDock結合エネルギーとCa<sup>2+</sup>応答のED<sub>50</sub>との統計解析では、相関係数0.63という高い相関が得られた。

本研究を通して、より天然に近いGPCRの3D構造予測を達成し、P2Y<sub>1</sub>受容体に対して内在性の新規アゴニスト、PRPPを発見することができた。これらのことから、*in silico* と*in vitro* の統合的な研

究が、新しい創薬に十分に結びつきうると考えられる。さらに、このような研究が、ゲノム解析により見つけられているオーファン受容体のリガンド発見にも、効果的に寄与することを期待している。