

トロンビン受容体 PAR1 の立体構造

千々岩崇仁*, 武谷浩之*

Three dimensional structure of thrombin receptor PAR1

Takahito CHIJIWA*, Hiroyuki TAKEYA*

Key words: three dimensional structure, crystal structure, PAR1, thrombin receptor, vorapaxar

◆ Points ◆

- ① PAR1 (protease activated receptor 1) とそのアンタゴニストであるボラパクサル (vorapaxar) の複合体の結晶構造が決定された。
- ② PAR1 のリガンド結合ポケットは、他の G 蛋白共役型受容体とは異なり、閉じている。
- ③ ボラパクサルは PAR1 分子の表面近傍において、洞窟の中にはまり込むようにして結合しており、ほとんど溶媒に曝されていない。
- ④ この特徴的な結合様式は、ボラパクサルの PAR1 への強固な結合を説明する。
- ⑤ トロンビン受容体を標的とする新しい抗血小板薬開発に向けてのヒントを提供する。

1. はじめに

トロンビン受容体として見いだされた PAR1 (protease activated receptor 1) は、G 蛋白共役型受容体 (G-protein-coupled receptor : GPCR) ファミリーに属する 7 回膜貫通型タンパク質である (図 1)。トロンビンは PAR1 のアミノ末端領域の Arg41-Ser42 間のペプチド結合を切断するが、この際、新たにアミノ末端となったペプチド領域 (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-) が tethered リガンドとなり、受容体分子自身に結合して活性化する。ヒトでは 4 種の PAR (PAR1~PAR4) が見いだされており、トロンビンによる血小板活性化には PAR1 とは別に PAR4 も関わる。PAR1 はアミノ末端ドメイン領域 (Lys51~Glu63) にヒルジン (ヒルの抗凝固因子) のトロンビン結合サイトと相同な領域を有しており (図

1)、ヒルジン領域を有さない PAR4 に比べてトロンビンとの親和性が高い。そのため、PAR1 は低濃度 (EC_{50} =約 50pM) のトロンビンで活性化されるが、PAR4 は高濃度 (EC_{50} =約 5nM) のトロンビンが生成した際に活性化されると考えられている。

PAR1 は新規抗血小板薬の標的として注目されており、多数のアンタゴニストが開発され、臨床試験へと進んでいる薬剤もある¹⁾。その一つがボラパクサル (vorapaxar) であり (図 2)、PAR1 に非常に特異的で、かつ、強固 (ほぼ不可逆的) に結合する。PAR1 は“tethered”リガンドで活性化されるため、PAR1 活性化時のリガンドの局所的な濃度は 0.4mM と計算される。こうした高濃度のアゴニストに対抗して、ボラパクサル (IC_{50} =47nM) がなぜどのようにして PAR1 のアゴニストとして機能できるのかは謎で

*崇城大学生物生命学部応用生命科学科 [〒 860-0082 熊本市西区池田 4-22-1]

Department of Applied Life Science, Sojo University [4-22-1 Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan]

Tel: 096-326-3829 Fax: 096-323-1331 e-mail: takeya@life.sojo-u.ac.jp

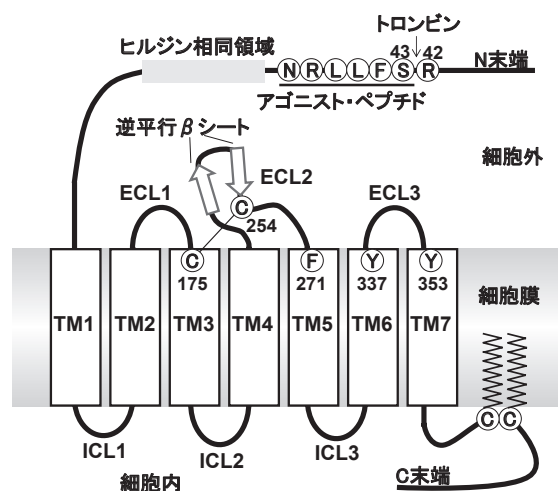


図1 トロンビン受容体 PAR1 の各部位

Lys51~Glu63 にヒルジンの C 末端領域と相同な酸性アミノ酸に富んだ配列が存在し、トロンビンの陰イオン結合部位 (フィブリノゲン結合エキソサイト I) と結合する。トロンビンによる Arg41-Ser42 間の切断後、アミノ末端となった領域がアゴニストとして作用する。7 本の膜貫通 α ヘリックス (TM1~TM7) は 24~35 アミノ酸残基からなり、これらは細胞外ループ (ECL1~ECL3) と細胞内ループ (ICL1~ICL3) によって連結されている。TM3 の上部 (本稿では細胞外側を上部と表現する) に存在する Cys175 は ECL2 の Cys254 とジスルフィド結合を形成する²⁾。このジスルフィド結合は、スフィンゴシン 1-リン酸受容体 S1P₁ 以外のクラス A の GPCR に保存されており、受容体の安定化と活性に重要という⁴⁾。ECL2 の N 端側から Cys254 までの領域には β シートが形成されているが²⁾、この構造はペプチド性リガンド GPCR (表 1) に共通する。TM5 上部の Phe271, TM7 上部の Tyr353, TM6 上部の Tyr337 はボラパクサル結合に重要である²⁾。

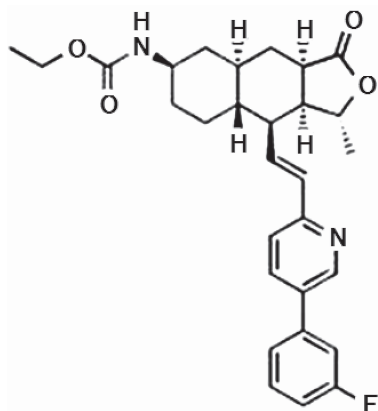


図2 ボラパクサールの構造

あった。最近、ボラパクサルが結合した PAR1 の 2.2 Å の高解像度結晶構造が解かれ、その興味深い結合ポケットの構造が明らかにされた²⁾。

2. PAR1 と他の GPCR との比較

昨年のノーベル賞と言えば医学生理学賞の山中伸弥教授であり、日本ではその他の分野について

の注目度は比較的に低かったが、ノーベル化学賞は Robert Lefkowitz と Brian Kobilka の「GPCR の研究」に対して贈られた。GPCR は全タンパク質のなかで最大のスーパーファミリーを形成しており、ヒトゲノムには全遺伝子のおよそ 5% にあたる約 1400 種の GPCR 遺伝子が存在する。医学薬学的に重要な受容体が多く、現在市販されている低分子薬の約 30% が GPCR を標的とする。GPCR はアミノ酸配列の相同性からいくつかのクラスに分けられており、PAR1 はクラス A (ロドプシンファミリーとも呼ばれる) に分類される。その他、創薬の標的として重要な GPCR としてクラス B (セクレチン受容体ファミリー) やクラス C (代謝型グルタミン酸受容体ファミリー) があり、Wnt シグナルに関わる Frizzled などは別のクラスに分類されている³⁾。近年、Kobilka や他のグループによって、GPCR の良質な結晶を得るための方法論・技術が開発された結果、この数年で急速に GPCR の結晶構造解析が進んだ (表 1)。PAR1 の結晶化は、ボラパクサルを結合させて均一なコンフォメーション (不活性状態) を固定化させることに加え、Kobilka らの方法に

表1 クラスA GPCRの立体構造解析について報告した論文

GPCR	論文
ロドプシン	Science 289 : 739-745, 2000 Nature 453 : 363-367, 2008
アミン作動性 GPCR	
β アドレナリン受容体	Science 318 : 1258-1265, 2007 Science 318 : 1266-1273, 2007 Nature 450 : 383-387, 2007 Nature 454 : 486-491, 2008 Nature 469 : 175-180, 2011 Nature 477 : 549-555, 2011
ドーパミン D3 受容体	Science 330 : 1091-1095, 2010
ヒスタミン H1 受容体	Nature 475 : 65-70, 2011
ムスカリン性アセチルコリン受容体	Nature 482 : 547-551, 2012 Nature 482 : 552-556, 2012
セロトニン受容体	Science 340 : 610-614, 2013 Science 340 : 615-619, 2013
アデノシン A _{2A} 受容体	Science 322 : 1211-1217, 2008
ペプチド性リガンド GPCR	
ケモカイン受容体 CXCR4	Science 330 : 1066-1071, 2010
オピオイド受容体	Nature 485 : 321-326, 2012 Nature 485 : 327-332, 2012 Nature 485 : 395-399, 2012 Nature 485 : 400-404, 2012
ニューロテンシン受容体	Nature 490 : 508-513, 2012
トロンビン受容体 PAR1	文献2)
スフィンゴシン 1-リン酸 受容体 S1P ₁	Science 335 : 851-855, 2012

従って、運動性の高い第3細胞内ループ (ICL3) に T4 リゾチームを挿入し、また、脂質キュービックフェーズ法を用いて PAR1 分子の規則的な整列を促すことなどにより成功した²⁾。

PAR1 とこれまでに立体構造が解かれたクラス A の GPCR との全体像を見比べると⁴⁾、7回膜貫通の α ヘリックス部分 (TM1~TM7) の大まかな配置に顕著な違いは見られなかった (図3)。しかし、PAR1 では、他の GPCR で保存されたアミノ酸が変異していることから予想された通り、膜貫通ヘリックスの相対的な位置や角度は異なっていた。通常、膜貫通ヘリックスで形成された受容体分子上部のくぼみはリガンド結合により構造が変化し、膜貫通ヘリックスの位置や角度を変化させて細胞内ループの大きな構造変化を誘導し、細胞内に活性化のシグナルを伝える。PAR1

のペプチド・アゴニスト結合部位は他の GPCR と全く違うと考えられており (後述)、結合部位の小さな構造変化を細胞質側に伝える分子機構が他の GPCR で提唱されているものとは異なることが示唆される。

PAR1 の最も顕著な特徴は細胞外ループ構造にある。そのなかで、逆平行 β シートで構成された第2細胞外ループ (ECL2) は、PAR1 と同じくペプチドをリガンドとする GPCR (表1のペプチド性リガンド GPCR) に共通する構造である。ところが、PAR1 の ECL2 の空間配置を含めたりガンド結合部位の構造は、図4の μ オピオイド受容体で示すように、PAR1 以外のペプチド性リガンド GPCR とは大きく異なる。GPCR には通常、膜貫通ヘリックスと細胞外ループで形成されるリガンド結合ポケットが存在する。リガ

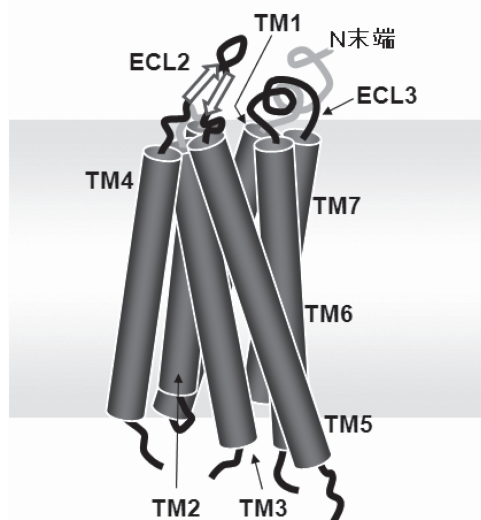


図3 PAR1の立体構造の大まかな模式図

文献2)の情報を基に膜貫通ヘリックスの大まかな配置を描いた模式図。アミノ末端ループの一部とTM3-TM4をつなぐECL2の一部は電子密度が弱く、決定できていない²⁾。TM5とTM6をつなぐECL3部分に挿入したT4リゾチームの構造は省いている。ボラパクサールは描いていない。

ンド結合部位には違いがあり、 β 1 アドレナリン受容体やアデノシン A2A 受容体ではポケットの深部にあり、ペプチド性リガンドのニューロテンシン受容体では(表1参照)これらよりも約5Åも表面に近いポケットの浅い部分にある。こうしたリガンド結合部位の深さに違いはあるが、結合ポケットは μ オピオイド受容体のように深く広く開いている(図4)。他方, PAR1のボラパクサール結合部位は浅く、また、ECL2とECL3がくぼみを覆っている。このリガンド結合部位の構造はロドプシンやスフィンゴシン1-リン酸受容体S1P₁と類似している(図4)。

3. ボラパクサールの結合様式

ボラパクサールはTM3~TM7で形成された中央部のくぼみに結合しており、上部をECL2とECL3が覆っている。TM4とTM5の間、および、その反対側のTM6とTM7の間に隙間があり、これらを開口部として受容体表面の浅い部分にトンネル様の構造が形成されているため、ボラパクサールはこの‘トンネル’の中に閉じ込められているように見える(図4)。トンネル開口部は

脂質膜に埋まっている部分であり、上部のECL2とECL3の間が少し空いているが、この隙間以外にはボラパクサールは溶媒にほとんど曝されていない。したがって、疎水性の強いボラパクサールは、PAR1分子の表面近傍ではあるが、疎水性環境の洞窟の中にはまり込むようにして結合しており、この特徴的な結合様式がボラパクサールのPAR1への強固な結合を説明すると考えられた²⁾。

ボラパクサールはヒトPAR1に極めて特異的であり、ヒトPAR2やヒトPAR4、マウスPAR1にはアンタゴニストとして作用しない。驚いたことに、ボラパクサールと結合しているPAR1のアミノ酸残基のほとんどは、こうした特異性の低いPARsでも保存されていることが明らかとなった。例えば、ボラパクサールの結合ポケットを形成するTM5末端のPhe271やTM7末端のTyr353、ならびに、ボラパクサールと強い水素結合を形成するTM6末端のTyr337などは(図1参照)、特異性の低いPARsにおいても保存されたアミノ酸残基である。しかし、これらのアミノ酸の空間配置を適切に保つ役割を担うアミノ酸が特異性の低いPARsでは保存されていなかった。PAR1において、Phe271と相互作用することでこのアミノ酸残基の適切な空間配置を支持するLeu263やPhe274、さらに、Phe274の適切な配置のためのPhe278は、特異性の低いPARsでは別のアミノ酸に置換されており、Phe271の空間配置はPAR1とは異なることが推定される。同様に、特異性の低いPARsではTM6とTM7をつなぐECL3がPAR1とは異なるため、TM7末端のTyr353とTM6末端のTyr337の空間配置はボラパクサール結合に適さないと推測される。

4. ボラパクサールの受容体へのアクセス様式

ボラパクサールはどのようにして結合部‘トンネル’の中に収まったのか? リガンドが結合していないPAR1の結合ポケットはオピオイド受容体のように開いていて、リガンド結合後に閉じるのか? この疑問に答えるため、分子動力学シミュレーション法を用いてボラパクサールが結合していない状態が計算された²⁾。その結果、オピオイド受容体のように開いた結合ポケットの構造

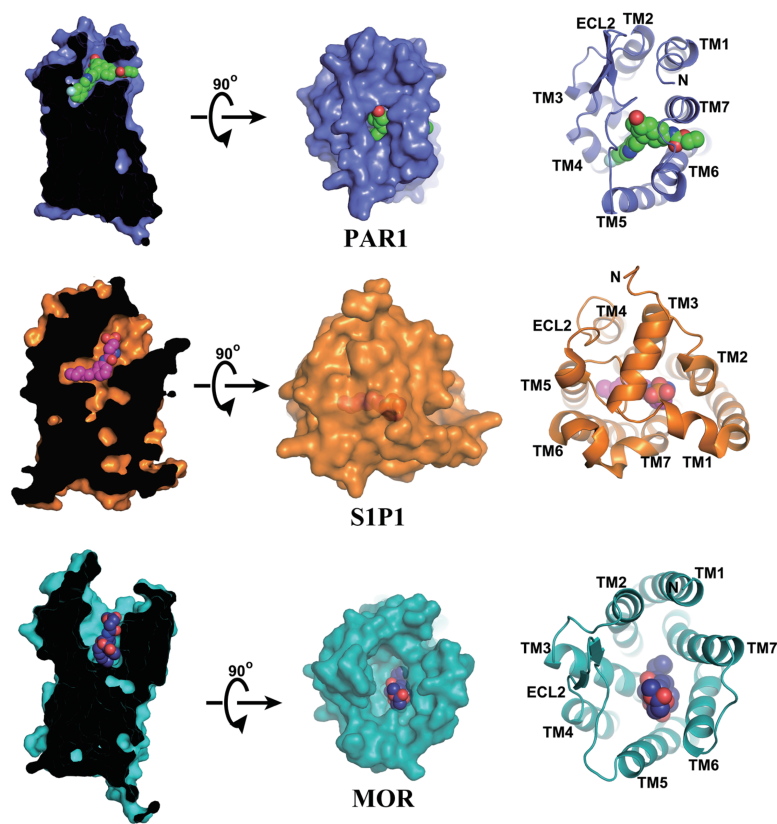


図4 ポラパクサルを結合した PAR1 のリガンド結合部位の構造

スフィンゴシン 1-リン酸受容体 S1P₁ (S1P1), および, μ オピオイド受容体 (MOR) のリガンド結合部位との比較. PAR1 と μ オピオイド受容体 (MOR) の ECL2 にはペプチド性リガンド GPCR に特徴的な β シートが存在する. S1P₁ の ECL2 には α ヘリックスが存在する. μ オピオイド受容体 (MOR) ではリガンド結合部位が広く深く開いているのに対し, PAR1 では, 脂溶性リガンド GPCR である S1P₁ と同様に, リガンド結合部位は溶媒に曝されていない. 文献2) の Supplementary Figure 5 (オンライン版) より引用.

は予測されず,むしろ, TM6 の上部末端が TM4 に向かって約 4Å 内側に動き, また, ECL3 は ECL2 にさらに接近して完全に結合ポケットを覆ってしまい, より閉じた構造が推定された. 脂溶性のポラパクサルは先ず脂質二重膜に侵入し, 次に TM6 と TM7 の間隙から結合部 'トンネル' に潜り込んだものと思われる. このアクセス様式は, 脂溶性のリガンドであるスフィンゴシン 1-リン酸の S1P₁ リガンド結合部位への結合, および, レチナールのロドプシンへの結合の場合に提唱されている様式である.

5. アゴニストペプチドによる PAR1 活性化

上述の様に, PAR1 のリガンド結合ポケット

は閉じており溶媒に曝されていないので, ペプチド・アゴニスト (SFLLRN) は受容体分子の上部表面に結合するものと考えられる. 実際, 以前の部位特異的変異体を用いた解析から^{5) 6)}, ECL2 領域に存在している Glu260 は SFLLRN の Arg 残基と相互作用し, リガンド結合に必須であることが示されていたが, この Glu260 は分子表面で溶媒に曝されていることが明らかとなった. また, ヒト PAR1 の ECL2 をアフリカツメガエルの ECL2 と置換した変異受容体は, リガンドが結合しなくても活性化状態であることが示されている⁷⁾. したがって, リガンドが PAR1 の ECL2 で形成された分子上部表面へ結合すると, 同ループの構造変化が惹起され, これが受容体の活性化につながる膜貫通ヘリックスの位置や角度

の変化を誘導すると示唆される。これとは別のモデルとして、分子上部表面へ結合したリガンドが、受容体の構造変化を通してリガンド結合ポケットに侵入し、受容体活性化を誘発することも考えられる。他の GPCR とは異なるリガンド結合部位を有する PAR1 が、どのような分子機構で活性化のシグナルを細胞内ループに伝えるのかに興味を持たれ、今後の活性型 PAR1 の立体構造解析が待たれる。

6. おわりに

ボラパクサルが結合した PAR1 の立体構造が明らかとなり、その強固（ほぼ不可逆的）で特異的な結合様式を説明する構造要素が示された。ボラパクサルについては出血事象の有意な増加を指摘する臨床試験の結果もある。したがって、新規の PAR1 阻害薬には、十分な阻害活性を発揮しつつ、出血の際の投薬停止後には速やかに受容体から解離するような性質が求められる。こうした新規の薬剤開発に、PAR1 の立体構造を活用した理論的なアプローチが有効と思われる。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) 坂田飛鳥: トロンビン受容体 PAR-1 阻害薬. 血栓止血誌 **11**: 47-50, 2012.
- 2) Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y, Green HF, Pandey A, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Coughlin SR, Kobilka BK: High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* **492**: 387-392, 2012.
- 3) Wang C, Wu H, Katritch V, Han GW, Huang XP, Liu W, Siu FY, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC: Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature* **497**: 338-343, 2013.
- 4) Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM: Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **494**: 185-194, 2013.
- 5) Gerszten RE, Chen J, Ishii M, Ishii K, Wang L, Nanevicz T, Turck CW, Vu TK, Coughlin SR: Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature* **368**: 648-651, 1994.
- 6) Nanevicz T, Ishii M, Wang L, Chen M, Chen J, Turck CW, Cohen FE, Coughlin SR: Mechanisms of thrombin receptor agonist specificity. Chimeric receptors and complementary mutations identify an agonist recognition site. *J Biol Chem* **270**: 21619-21625, 1995.
- 7) Nanevicz T, Wang L, Chen M, Ishii M, Coughlin SR: Thrombin receptor activating mutations. Alteration of an extracellular agonist recognition domain causes constitutive signaling. *J Biol Chem* **271**: 702-706, 1996.