

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		アレルギー性疾患に関与するヒスタミン受容体の X 線結晶構造解析			
研究テーマ (欧文) AZ		Crystal structure of histamine receptor			
研究氏 代 表 名 者	カナ CC	姓) コバヤシ	名) タクヤ	研究期間 B	2010～ 2012 年
	漢字 CB	小林	拓也	報告年度 YR	2012 年
	ローマ字 CZ	Kobayashi	Takuya	研究機関名	京都大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		京都大学 医学研究科・准教授			
概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。) 小林らは、ヒトをターゲットとした GPCR の結晶構造解析を目的として、結晶化に適したサンプルの調整を試みてきた。その結果、三つのヒト GPCR(アデノシン A2a 受容体、ヒスタミン H1 受容体、ムスカリン M2 受容体)の結晶構造を高分解能で解明することに成功した。アデノシン A2a 受容体については、立体構造認識抗体を作製し、受容体／抗体複合体の結晶構造を 3.1 Å で決定した(Nature 482, 237-240, 2012)。さらに、リゾチームを融合したヒスタミン H1 受容体を脂質キュービック相に結晶化し、高分解能(3.1 Å)で結晶構造を解いた(Nature 475, 65-70, 2011)。ムスカリン M2 受容体についても同様な方法を使い分解能 3.0 Å で結晶構造を決定した(Nature 482, 547-551, 2012)。今回、ヒスタミン H1 受容体とアデノシン A2a 受容体はメタノール資化酵母を用いて発現・精製し、ムスカリン M2 受容体は昆虫細胞を用いて調整した。良い結晶を生産するには、いずれの場合も培地 1 リッターあたり 1 ミリグラム以上の生産量が必要となる。GPCR の高発現を実現するためには、フレキシビリティーの高い GPCR を安定化させる必要がある。従来は多くの変異体を地道に作製し、リガンド結合活性を測定していたが、筆者らは相同組換え活性の高い出芽酵母を用いて、C 末端に GFP を融合させることにより、GPCR の安定性を短時間に向上させる系を確立した(Microb. Cell Fact. 11, 78, 2012)。現在、一ヶ月で 50-100 種類以上の変異体をハイスループットでスクリーニングしている。この技術により、まさに「解けるものを解く研究」から「解きたいものを解く研究」が可能になったと言える。					
キーワード FA	GPCR	X 線結晶構造解析	ヒスタミン	アセチルコリン	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）										
雑誌	論文標題 ^{GB}	Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist.								
	著者名 ^{GA}	Haga K. et al.	雑誌名 ^{GC}	Nature						
	ページ ^{GF}	547~551	発行年 ^{GE}	2	0	1	2	巻号 ^{GD}	482	
雑誌	論文標題 ^{GB}	Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .								
	著者名 ^{GA}	Shiroishi M. et al.	雑誌名 ^{GC}	Microb. Cell Fact.						
	ページ ^{GF}	78	発行年 ^{GE}	2	0	1	2	巻号 ^{GD}	11	
雑誌	論文標題 ^{GB}	G protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody.								
	著者名 ^{GA}	Hino T. et al.	雑誌名 ^{GC}	Nature						
	ページ ^{GF}	237~240	発行年 ^{GE}	2	0	1	2	巻号 ^{GD}	482	
雑誌	論文標題 ^{GB}	Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin.								
	著者名 ^{GA}	Shimamura T. et al.	雑誌名 ^{GC}	Nature						
	ページ ^{GF}	65~70	発行年 ^{HD}	2	0	1	1	巻号 ^{GD}	475	
図書	著者名 ^{HA}									
	書名 ^{HC}									
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}		

欧文概要 ^{EZ}

The biogenic amine histamine is an important pharmacological mediator involved in pathophysiological processes such as allergies and inflammations. Histamine H₁ receptor (H₁R) antagonists are very effective drugs alleviating the symptoms of allergic reactions. Here we show the crystal structure of the H₁R complex with doxepin, a first-generation H₁R antagonist. Doxepin sits deep in the ligand-binding pocket and directly interacts with Trp 428^{6,48}, a highly conserved key residue in G-protein-coupled-receptor activation. This well-conserved pocket with mostly hydrophobic nature contributes to the low selectivity of the first-generation compounds. The pocket is associated with an anion-binding region occupied by a phosphate ion. Docking of various second-generation H₁R antagonists reveals that the unique carboxyl group present in this class of compounds interacts with Lys 191^{5,39} and/or Lys 179^{ECL2}, both of which form part of the anion-binding region. This region is not conserved in other aminergic receptors, demonstrating how minor differences in receptors lead to pronounced selectivity differences with small molecules. Our study sheds light on the molecular basis of H₁R antagonist specificity against H₁R.