

スフィンゴシン1-リン酸受容体の構造解析から明らかとなりつつある 受容体活性化機構とシグナル伝達

前田 信太郎¹, 浅田 秀基²

1. はじめに

Gタンパク質共役受容体（GPCR）は7回膜貫通型の膜タンパク質で細胞外からの刺激に応答してその構造を変化させ、細胞内の三量体Gタンパク質を活性化する。ヒトでは約800の遺伝子がGPCRをコードしており、最大のファミリーを構成するタンパク質の一種である¹⁾。各GPCRは目的に応じてペプチド、脂質、タンパク質、アミンなどさまざまなリガンドを特異的に認識できるように進化してきた。その中で脂質を認識するGPCRは約40種類あるといわれている。

細胞膜を構成するグリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールなどの脂質は、細胞膜の構成成分として働くだけでなく、生理活性を示す脂質の原料ともなる。そのような生理活性脂質の一つとしてスフィンゴシン1-リン酸（S1P）があげられる。S1Pはスフィンゴ脂質からセラミドを経て、スフィンゴシン、S1Pへと種々の酵素によって代謝されて産生される。ヒトの体内では炭素数が18のd18:1 S1Pが大多数を占める。このS1PはGPCRである五つのS1P受容体（S1PR1～S1PR5）に対してアゴニストとして作用し、免疫・血管系を中心にさまざまな生理機能を制御している²⁾。2012年にS1Pを模倣したアンタゴニストが結合したS1PR1の構造が報告³⁾されて以来、その他のS1P受容体の構造は2020年まで報告がなかった。そのため、

活性化メカニズムや受容体間でのリガンド選択性の構造基盤は不明であった。しかしながら、2021年を皮切りにアゴニストの結合したS1PR1, 2, 3, 5の構造が結晶構造解析や超低温電子顕微鏡（cryo-EM）による単粒子解析によって飛躍的に報告された⁴⁻¹⁰⁾。本稿ではこれらの構造を比較しながら、S1P受容体の機能の構造基盤について論じたい（図1）。

2. 活性化機構

アゴニストと結合したGPCRは活性型の構造へと遷移しやすくなる。この活性型の構造は一般的に、不活性型と比較して、細胞内側において第6膜貫通ドメイン（TM6）の外側への開きとTM7の内側へのシフトを示す。この構造変化によって生じた細胞内側の空間に三量体Gタンパク質を構成するGαのα5ヘリックスが結合できるようになる。その後、三量体Gタンパク質はGuanosine diphosphate（GDP）結合型からGuanosine triphosphate（GTP）結合型となり、GPCRから離れ細胞内にシグナルを伝達する。各種GPCRはそれぞれのファミリーごとに独自の活性化機構を有し、S1P受容体もその例外ではない。ここでは我々のグループが決定したd18:1 S1P結合型S1PR3の結晶構造⁴⁾からS1P受容体の活性化機構をひも解きたい。

d18:1 S1Pの結合したS1PR3の構造と2012年に報告されたアンタゴニスト結合型のS1PR1の構造を比較することで、S1P受容体の活性化機構は提唱された。d18:1 S1Pはリン酸やアミノ基からなる親水性領域と1本のアルキル鎖からなるリゾリン脂質であるが、その脂質鎖が受容体中ではまっすぐ伸展した構造を示す（図2A, B）。S1Pを模倣したアンタゴニストは逆にL字に折れ曲がった構造を示していたことから、この違いが活性化機構に強く寄与していることがわかる。脂質鎖がまっすぐ伸展することで受容体の四つの疎水性アミノ酸残基（Leu122^{3,36}, Phe204^{5,47}, Trp256^{6,48}, Phe260^{6,52}）が協調的に構造変化し、先に述べたTM6の開きが引き起こされることが示唆された（図2C。上付き文字はBallesteros-Weinstein番号）。我々はこれらのアミノ酸残基をカルテット・コアと名づけた。d18:1 S1Pが結合したS1PR3の結晶構造以降にも続々と他のS1P受容体（S1PR1, 2, 5）の構造がアゴニスト結合型で報告されて

¹ 京都大学大学院医学研究科形態形成機構学（〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町京都大学大学院医学研究科）

² 京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学（〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町京都大学大学院医学研究科）

Structural insights into activation and signal transduction of sphingosine-1-phosphate receptors

Shintaro Maeda¹ and Hidetsugu Asada² (¹Department of Anatomy and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Bldg. C, Level 3, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, ²Department of Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Bldg. A, Level 3, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan) 本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940743

© 2022 公益社団法人日本生化学会

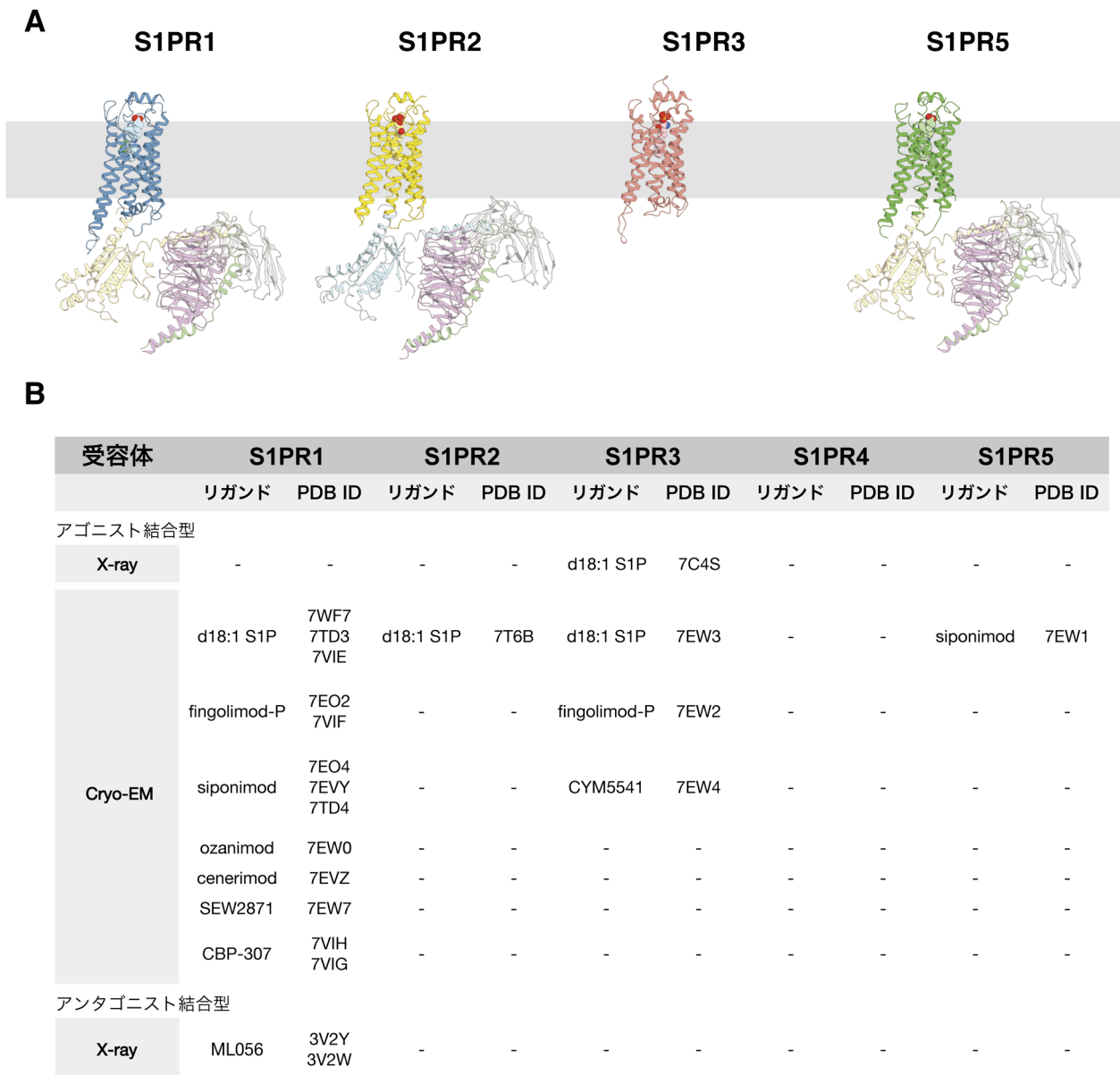


図1 S1P受容体の構造情報
(A) これまでに報告されたS1P受容体の構造例. 左からシボニモド結合型S1PR1-G α i複合体 (PDB ID: 7EVY), d18:1 S1P結合型S1PR2-G13複合体 (PDB ID: 7T6B), d18:1 S1P結合型S1PR3 (PDB ID: 7C4S), シボニモド結合型S1PR5-G α i複合体 (PDB ID: 7EW1). (B) これまでに構造決定されたS1P受容体のリスト.

きたが、例外なくアゴニストは受容体中でまっすぐ伸展した構造とそれに付随するカルテット・コアの構造変化を示した。このことから、この活性化機構はS1P受容体で共通しており、まだ報告はされていないが、S1PR4でも同様の機構を有していることが示唆される。

3. その他のリゾリン脂質受容体との比較

リゾリン脂質を認識する受容体はS1P受容体の他に、カンナビノイド受容体やリゾホスファチジン酸 (LPA) 受容

体 (LPA1~LPA6)、リゾホスファチジルセリン受容体などがある。これらの受容体のうち、LPA受容体の活性化様式に関してS1Pとの違いを考察する。LPAを認識する受容体は六つ同定されているが、進化系統樹的にS1P受容体に近いLPAR1~LPAR3 (EDGファミリー) とそれ以外のLPAR4~LPAR6 (非EDGファミリー) に分けられる。前者と後者では配列相同性も低く、異なるLPA認識機構があると想定されている。これらLPA受容体のうち、活性型の構造が決定されているのはEDGファミリーのLPAR1のみである⁹⁾。cryo-EMを用いた単粒子解析によって決

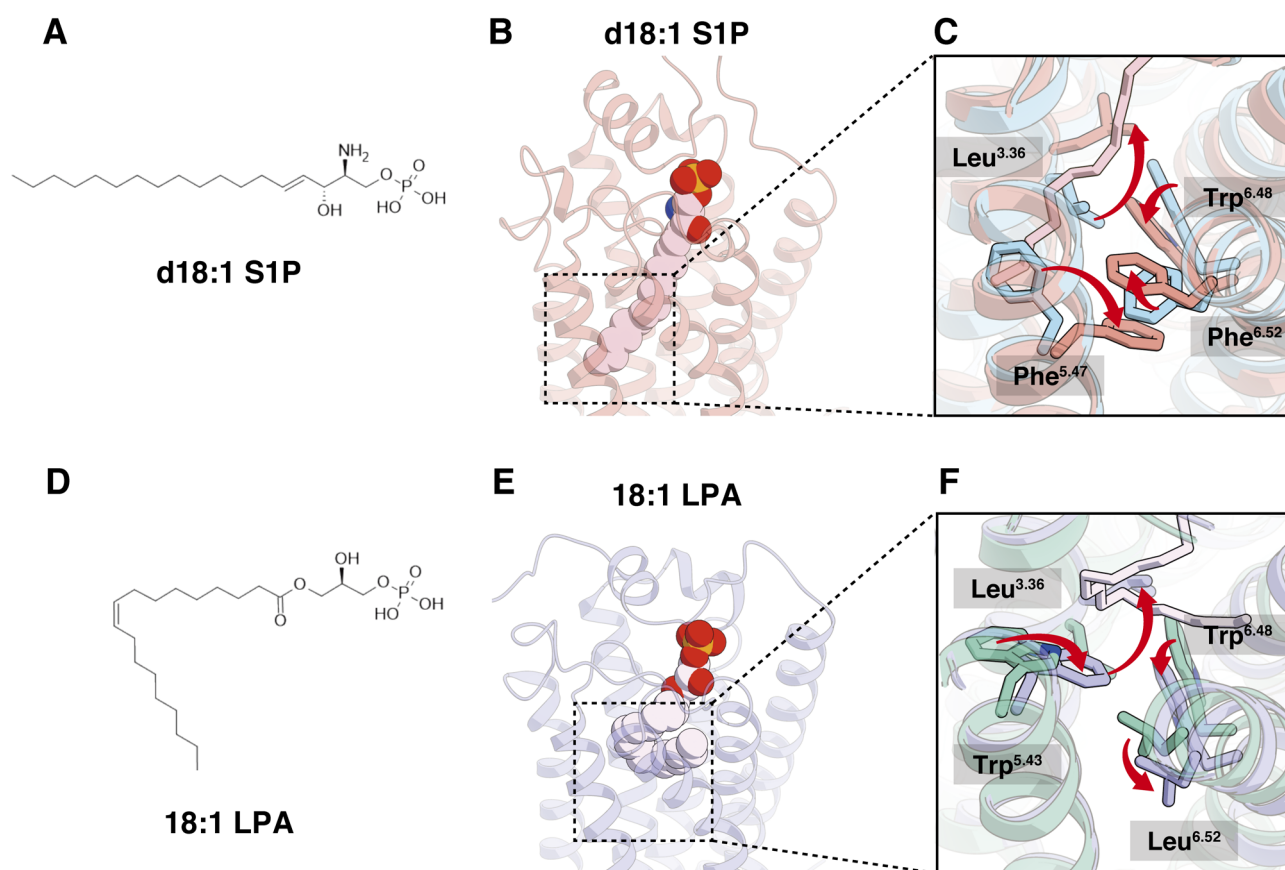


図2 リゾリン脂質受容体の活性化様式

(A) d18:1 S1Pの構造式, (B) d18:1 S1P結合型S1PR3の構造 (PDB ID: 7C4S), (C) “カルテット・コア (Quartet core)”の構造変化 (d18:1 S1P結合型S1PR3: ピンク, アンタゴニスト結合型S1PR1: 水色), (D) 18:1 LPAの構造式, (E) 18:1 LPA結合型LPAR1の構造 (PDB ID: 7TD0), (F) 18:1 LPA結合時に起きる構造変化 (18:1 LPA結合型LPAR1: 紫色, アンタゴニスト結合型LPAR1: 緑色).

定されたLPAR1は、内在性アゴニストの18:1 LPAとGタンパク質との複合体で解かれている。S1P受容体とEDGファミリーのLPA受容体は進化系統樹的に近いが、そのリガンドの認識機構は対照的である。S1Pがまっすぐ伸ばした構造を受容体中で示すのに対し、LPAは受容体中の袋状のリガンド結合ポケットにアシル基からなる脂質鎖をU字形に曲げた状態で存在する (図2D, E)。そのため、S1P受容体とは異なるアミノ酸残基の構造変化によって活性化されている (図2C, F)。これらのリガンドの結合様式の違いとそれらの脂質鎖の不飽和度との間の相関が示唆されているが、構造比較から、LPAはS1Pと異なり脂質鎖の中央部に二重結合があるためより曲がった状態で安定化しやすいことが示された。実際、これらのリゾリン脂質は不飽和度によって活性が異なることが報告されている¹¹⁾。そのような脂質の不飽和度や長さの異なるリガンドの結合したリゾリン脂質受容体の構造が今後明らかにされることに期待したい。

4. バイアスド・アゴニズム

GPCRは活性化すると三量体Gタンパク質を活性化させる。その後、GPCR キナーゼ (GRK) によるC末端領域のリン酸化を受け、アレスチンと結合し、脱感作や内在化による膜表面からの除去を受ける。その他にも、さまざまな因子と結合し、細胞内のシグナル伝達を制御する。GPCRがどの細胞内因子と結合するかは受容体ごとに異なる上に、同一のGPCRでも結合するリガンドによっても変化する。この現象はバイアスド・アゴニズムと呼ばれ、GPCRを標的とする創薬研究の可能性を拡げることが期待されている¹²⁾。S1P受容体でもいくつかバイアスド・アゴニズムが報告されている。多発性硬化症の治療薬として知られているフィンゴリモドはS1PR1に作用してアレスチンを強く誘導し、内在化によりS1PR1を膜表面から取り除くことで薬効を示すとされている。また、フィンゴリモドはS1PR3に対してもバイアスド・アゴニストとして作用することが知られている¹³⁾。しかしながら、こちらはアレスチ

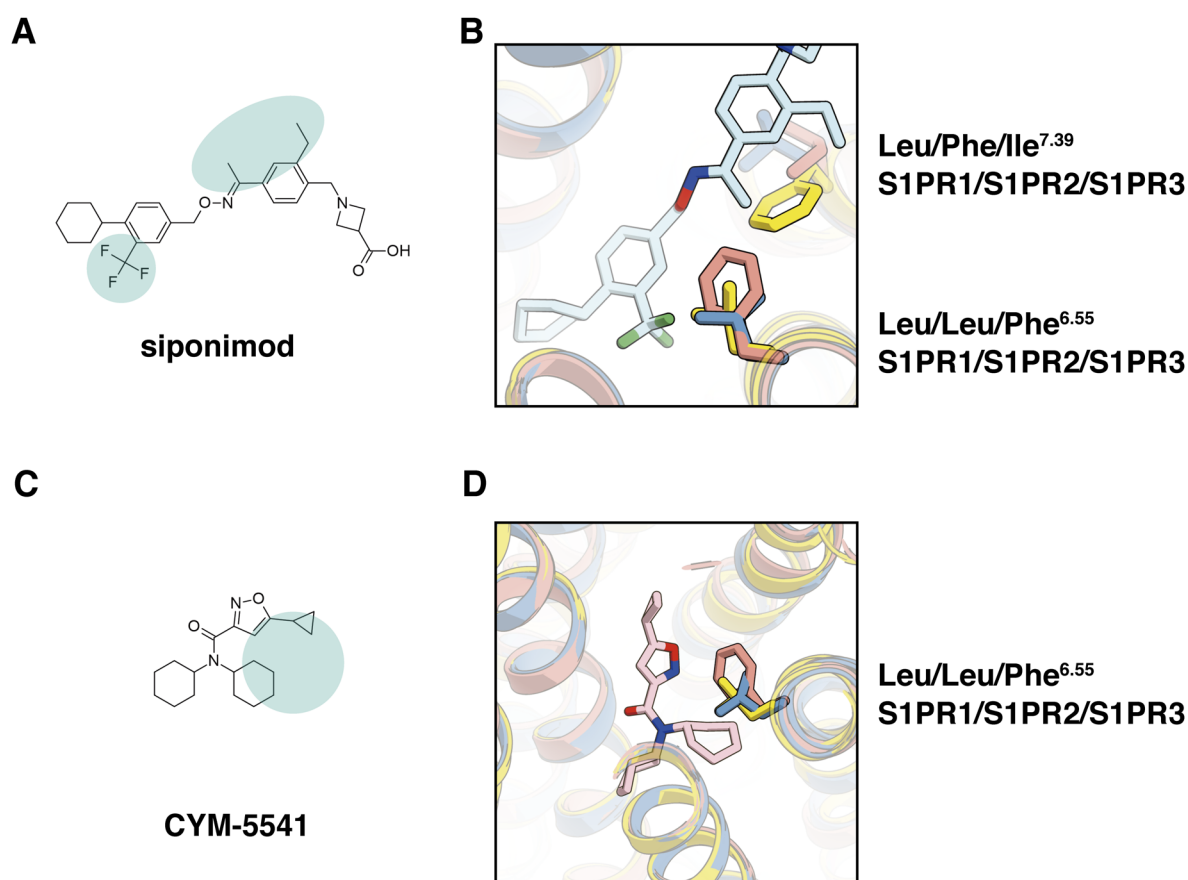


図3 サブタイプ選択的アゴニストの構造基盤

(A) S1PR1, S1PR5 選択的シポニモドの構造式. 選択性に寄与していると示唆される官能基周辺を水色で表示している. (B) シポニモド結合型の S1PR1 と d18:1 S1P 結合型の S1PR2/S1PR3 の比較. S1PR1, S1PR2, S1PR3 はそれぞれ青, 黄色, ピンク色で表示されている. (C) S1PR3 選択的アゴニストである CYM-5541 の構造式. 選択性に寄与していると示唆される官能基周辺を緑色で表示している. (D) CYM-5541 結合型の S1PR3 とアゴニスト結合型 S1PR1/S1PR2 の比較. S1PR1, S1PR2, S1PR3 はそれぞれ青, 黄色, ピンク色で表示されている.

ンではなく、Gタンパク質内でのバイアスである。内在性リガンドのd18:1 S1PはS1PR3を介して G_{ai} , $G_{aq/11}$, $G_{a12/13}$ を活性化するのに対し、フィンゴリモドは G_{ai} , $G_{a12/13}$ のみを活性化し、 $G_{aq/11}$ はほとんど活性化しない。これらの現象の構造生物学的メカニズムは長らく不明であったが、近年報告されたさまざまなリガンドが結合した状態でのS1PR1, S1PR3の構造から徐々に明らかとなりつつある。

2021年から2022年にかけてさまざまなアゴニストの結合したS1PR1の G_{ai} 複合体構造が複数のグループから報告された⁷⁻¹⁰⁾。これらの構造の単純な比較では内在性アゴニストのd18:1 S1Pの結合した状態とその他のバイアスド・アゴニストが結合した状態では大きな構造変化はなかった。Heらのグループは構造的な揺らぎがバイアスに関与しているのではないかと考察し、それぞれの構造を基に分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、Trp^{6.48}を含むリガンド周りのアミノ酸残基の相互作用ネットワークの微細な変化がd18:1 S1Pとバイアスド・アゴニストでは異なる

ことを明らかにした⁷⁾。今後は合理的なバイアスド・アゴニストのデザインができるように、リガンド側のどのような性質が受容体の相互作用ネットワークに影響を与えるのか明らかにされることが期待される。一つ特筆すべき点として、同じd18:1 S1Pの結合した状態でも、それを決定したグループによってS1PR1中でのリガンドの構造が異なることである。あるグループでは折れ曲がった状態であったが、他のグループではまっすぐ伸び切った状態であった。後述するが、S1PR3ではまっすぐ伸び切った構造しか確認できていないため、このd18:1 S1Pの揺らぎはS1PR1に限られている可能性がある。しかしながら、この揺らぎがバイアスに与える影響はまだ明らかにされていない。

S1PR3では前述したd18:1 S1Pの結合した状態の結晶構造とさまざまなアゴニストの結合した状態での G_{ai} 複合体のcryo-EM構造がそれぞれ別のグループから報告された^{4,5)}。前者のグループはd18:1 S1Pの結合したS1PR3の結

晶構造からアルキル鎖の長さがGタンパク質間のバイアスに影響を与えることを明らかにした。実際に単純にアルキル鎖を炭素2個分短くしたd16:1 SIPはS1PR3に対して G_{ai} , $G_{\alpha_{12/13}}$ に偏るバイアスド・アゴニストであった。このリガンド（アルキル鎖）の短さがどのようなS1PR3の構造変化を促してバイアスを生じさせるのかはまだ明らかとなっていない。d18:1 SIPおよびフィンゴリモドの結合した状態のS1PR3のcryo-EM構造を比較したが、大きな違いはみられていない。考えられる可能性は三つある。一つめはS1PR1で明らかにされた微妙なアミノ酸側鎖の相互作用ネットワークの違いである。二つめは特定のGタンパク質との複合体の形成効率の違いである。S1PR3の場合、 $G_{\alpha_{q/11}}$ との複合体における安定性がリガンドによって異なる可能性がある。三つめはS1PR3の示すスクレオチド置換効率の違いである。これらの可能性を検証するためにMDシミュレーションや G_{ai} 以外のGタンパク質との複合体構造や精密な生化学的プロファイルがバイアスド・アゴニズム機構解明のキーとなると考えられる。

5. 受容体の選択性のメカニズム

前述したフィンゴリモドは、主にS1PR1に作用して多発性硬化症に対する治療効果を与える²⁾。しかしながら、S1PR3にもアゴニストとして作用してしまうことが徐脈性不整脈など副作用の一因と考えられている¹⁴⁾。そのため、S1PR1に対する選択性を高めたリガンドが開発されてきた。そのようなリガンドの一つにシボニモドがあげられる（図3A）。この化合物はS1PR1, S1PR5に選択性が高く、S1PR3にはアゴニストとして作用しない。このシボニモドの結合したS1PR1の構造から、なぜシボニモドがS1PR3に作用しないのか明らかとなった⁷⁾。S1PR3のオルソステリックサイトにあるPhe263^{6,55}とIle284^{7,39}はS1PR1, S1PR5ではいずれもLeuであり、S1PR3よりも比較的小さい側鎖を持つアミノ酸残基になっているため、シボニモドの中央部にあるトリフルオロメチル基を有するフェニル環と立体障害を示さないことが選択性に寄与すると考えられる（図3B）。実際にそれぞれのアミノ酸残基を対応する残基に置換した変異体では選択性が転換された。

また、S1PR3選択的なアゴニストであるCYM-5541が結合したS1PR3のcryo-EM構造からS1PR3選択性を持たせるメカニズムが明らかとなりつつある⁵⁾。先ほどのシボニモドによるS1PR1, 5選択性に寄与していたアミノ酸残基がS1PR3選択性にも寄与していた。S1PR1, 5のLeu^{6,55}がS1PR3ではPhe^{6,55}となるが、CYM-5541はシクロヘキサン基とこのPhe^{6,55}が相互作用するために、他のSIP受容体よりもS1PR3に強く結合することが示唆された（図3C, D）。実際に6.55位のアミノ酸残基をスワップさせたS1PR3と

S1PR1ではCYM-5541によるアゴニスト活性が転換された。

このように、SIP受容体ごとの選択性に関する知見が構造から明らかとなってきた。一方、選択的なアゴニストの結合したS1PR2の構造は未知であるため、S1PR2に対する選択性の構造基盤は不明である。また、アンタゴニストの選択性に関してはアンタゴニスト結合型の構造情報が不足しているため、アゴニスト以上に明らかとなっていないことが多い。これからはアンタゴニスト結合型の構造も報告されることに期待したい。SIP受容体をはじめ、脂質受容体は非常に柔軟なリガンドポケットを有していることから、アンタゴニスト結合型ではユニークな構造を示すのではないだろうか。

6. おわりに

SIP受容体の構造が決定されたことで、SIPによるシグナル制御機構が明らかになった一方、リガンド依存的にSIP受容体を介して流れるシグナルに偏りが生じる現象など、明らかにされていないことも多く残っている。このような複雑な現象を明らかにするためにも、今後は静的な構造情報だけでなく、揺らぎなどの動的な構造情報を含む複合的なアプローチが必要とされるだろう。

文 献

- 1) Weis, W.I. & Kobilka, B.K. (2018) The molecular basis of G protein-coupled receptor activation. *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 897-919.
- 2) Cartier, A. & Hla, T. (2019) Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science*, **366**, eaar5551.
- 3) Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., et al. (2012) Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science*, **335**, 851-855.
- 4) Maeda, S., Shiimura, Y., Asada, H., Hirata, K., Luo, F., Nango, E., Tanaka, N., Toyomoto, M., Inoue, A., Aoki, J., et al. (2021) Endogenous agonist-bound S1PR3 structure reveals determinants of G protein-subtype bias. *Sci. Adv.*, **7**, eabf5325.
- 5) Zhao, C., Cheng, L., Wang, W., Wang, H., Luo, Y., Feng, Y., Wang, X., Fu, H., Cai, Y., Yang, S., et al. (2022) Structural insights into sphingosine-1-phosphate recognition and ligand selectivity of S1PR3-Gi signaling complexes. *Cell Res.*, **32**, 218-221.
- 6) Chen, H., et al. (2022). *Sci. Adv.*, **8**, 67.
- 7) Xu, Z., Ikuta, T., Kawakami, K., Kise, R., Qian, Y., Xia, R., Sun, M.X., Zhang, A., Guo, C., Cai, X.H., et al. (2022) Structural basis of sphingosine-1-phosphate receptor 1 activation and biased agonism. *Nat. Chem. Biol.*, **18**, 281-288.
- 8) Yu, L., He, L., Gan, B., Ti, R., Xiao, Q., Hu, H., Zhu, L., Wang, S., & Ren, R. (2022) Structural insights into sphingosine-1-phosphate receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2117716119.

- 9) Liu, S., et al. (2022). *Nat. Commun.*, **13**, 1–11.
- 10) Yuan, Y., Jia, G., Wu, C., Wang, W., Cheng, L., Li, Q., Li, Z., Luo, K., Yang, S., Yan, W., et al. (2021) Structures of signaling complexes of lipid receptors S1PR1 and S1PR5 reveal mechanisms of activation and drug recognition. *Cell Res.*, **31**, 1263–1274.
- 11) Bandoh, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H., & Inoue, K. (2000) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett.*, **478**, 159–165.
- 12) Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M.M., & Sexton, P.M. (2018) Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 638–653.
- 13) Sensken, S.C., Stäubert, C., Keul, P., Levkau, B., Schöneberg, T., & Gräter, M.H. (2008) Selective activation of G alpha i mediated signalling of S1P3 by FTY720-phosphate. *Cell. Signal.*, **20**, 1125–1133.
- 14) Murakami, A., Takasugi, H., Ohnuma, S., Koide, Y., Sakurai, A., Takeda, S., Hasegawa, T., Sasamori, J., Konno, T., Hayashi, K., et al. (2010) Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.*, **77**, 704–713.

著者寸描

●前田 信太郎 (まえだ しんたろう)

協和キリン株式会社. 博士 (医学).

■略歴 1993年長崎県に生る. 2016年京都大学医学部人間健康科学科卒業. 18年同大学院医学研究科人間健康科学系専攻修士課程修了. 22年同大学院医学研究科医学専攻博士課程修了. 22年協和キリン株式会社入社.

■研究テーマと抱負 GPCRを中心に創薬標的となる膜タンパク質を構造解析することでタンパク質機能の理解を進め, タンパク質に作用して内在性リガンドとは異なる生理機能を発揮する化合物の創成に貢献します.

■趣味 登山, キャンプ.

●浅田 秀基 (あさだ ひでつぐ)

京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学特定准教授. 博士 (医学).

■略歴 2004年に京都府立医科大学にて博士課程 (医学) を修了. 08年から京都大学大学院医学研究科・分子細胞情報学で構造の研究を始める. 21年から同特定准教授となり現在に至る.

■研究テーマと抱負 膜タンパク質, 特にGPCRの構造から生理機能を理解することを目的に研究を行っている. 自分が楽しめる研究をコツコツやっていきたいと考えているが, 変化の早い研究の流れに翻弄される日々.

■ウェブサイト <http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

■趣味 バイクに乗って風になる.