

血小板 ADP 受容体 P2Y12 の立体構造

Three dimensional structure of platelet ADP receptor P2Y12

大野耕作^{1*}, 武谷浩之²
Kousaku OHNO¹, Hiroyuki TAKEYA²

Key words: P2Y12, ADP, PCI, antiplatelet, three dimensional structure

Points

- ①ヌクレオチド系アゴニスト(2-MeS-ADP)または非ヌクレオチド系アンタゴニスト(AZD1283)が結合したヒト P2Y12 の結晶構造が決定された。
- ② P2Y12 のリガンド結合ポケットは2つに分かれており, 2-MeS-ADP はポケット1と2にまたがって結合しており, AZD1283 はポケット1のみに分子の長軸の方向を変えて結合していた。
- ③ P2Y12 の細胞外領域は可動性が高く, かさ高い内因性リガンドである ADP の結合ポケットへのアクセスを可能とする。
- ④ポケット入口や細胞外領域は正電荷を帯びており, リン酸基などで負電荷を帯びた 2-MeS-ADP が結合すると, リガンドを包み込むような構造変化を起こす。
- ⑤立体構造からのシミュレーションにより, チェノピリジン系抗血小板剤であるプラスグレルの活性代謝物はポケット2に結合していることが推定された。

1. はじめに

P2Y12 は主に血小板に発現する adenosine 5'-diphosphate(ADP)受容体であり, プリン作動性 G 蛋白質共役受容体(G protein-coupled receptor; GPCR)である P2Y ファミリーの一つである。ヒトでは8種の P2Y 受容体サブタイプ(P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14)が存在し, ADP による血小板活性化には P2Y12 の他, P2Y1 も関わっ

ていることが知られている¹⁾。P2Y12 は临床上重要な薬剤標的であり, その阻害剤であるチェノピリジン系抗血小板剤(クロピドグレル, プラスグレル)は, 経皮的冠動脈形成術(percutaneous coronary intervention; PCI)後の心血管イベントの二次予防に広く使用されている^{2,3)}。P2Y12 は2001年にクローニングされ⁴⁾, これまで P2Y12 への変異導入などによりリガンド結合に重要なアミノ酸等の知見は得られているが, その立体構造については報告されていなかった。しかし, 近年の結晶化技術の急激な進展によって, ついに P2Y12 の立体構造がアゴニスト(2-MeS-ADP, 図1)結合およびアンタゴニスト(AZD1283, 図1)結合の双方の状態から明らかとなった^{5,6)}。なお, GPCR のクラス分類等については筆者の一人(武谷)が本誌に概説している⁷⁾ので, 参照いただきたい。

¹ 第一三共株式会社 研究開発本部 生物医学研究所

² 崇城大学 生物生命学部 応用生命科学科

*責任者連絡先:

第一三共株式会社 研究開発本部 生物医学研究所
〒140-8710 東京都品川区広町1-2-58

Tel: 03-3492-3131 Ext. 3465

E-mail: ohno.kosaku.p2@daiichisankyo.co.jp

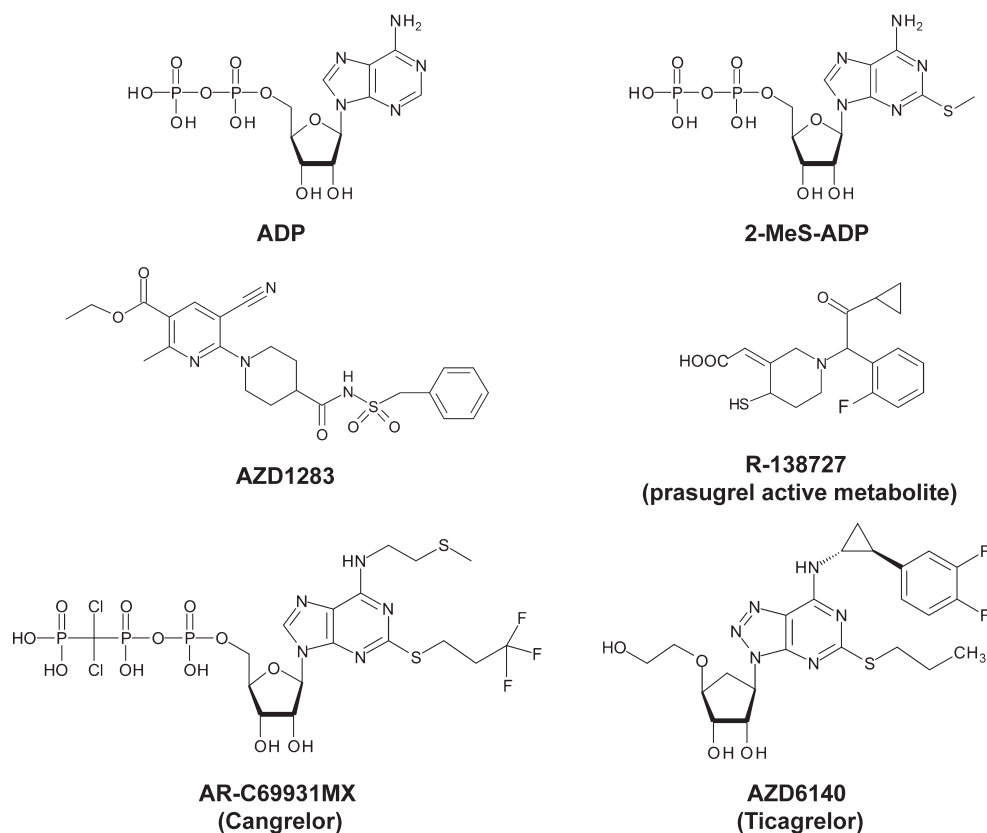


図1 P2Y12 アゴニストおよびアンタゴニストの化学構造

2. P2Y12 と他の GPCR との比較

GPCR はアミノ酸配列の相同性からクラス分けされるが、P2Y12 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。また、クラス A はさらに 4 つのグループ (α , β , γ , δ) に分けられており、P2Y12 は、トロンビン受容体の PAR1 (protease activated receptor 1) と同じ δ グループに属する (P2Y12 と PAR1 は約 25% の相同性を示す)。これまでに、いくつかのクラス A の GPCR (ロドプシン, β_1 および β_2 アドレナリン受容体, アデノシン A2A 受容体, ムスカリン性アセチルコリン受容体 M2) について、アゴニストあるいはアンタゴニストを結合させた双方の状態での立体構造が明らかにされてきたが、これらはすべて α グループに属しており、 δ グループでのアゴニスト・アンタゴニスト結合型の立体構造解析は初めての例である。

7 回膜貫通 α ヘリックス (TM1~TM7) で構成された P2Y12 の全体像をこれまでに立体構造が解かれ

たクラス A の GPCR と比べると、長く真っ直ぐに伸びた TM5 に特徴がある。クラス A GPCR のほとんどは TM5 に保存されたプロリンを有しており、この部分で折れ曲がったコンフォメーションを取っているのに対し、P2Y12 ではプロリンがアスパラギンに置換しているため、ほぼ真っ直ぐの TM5 を有する (図 2a 参照)。クラス A の GPCR の中では、例外的に、スフィンゴシン 1-リン酸受容体 S1P₁ の TM5 は相同部位にプロリンを有さず直鎖状の構造を示すが、この S1P₁ の TM5 に比べても、P2Y12 の TM5 はヘリックス・ターンが 2 回転分付け加わっており、顕著に長く伸びた特徴的な構造となっている。このため、他のクラス A GPCR に比較して、P2Y12 の TM5 は TM6 側に 6 Å も近接しており、全体の膜貫通 α ヘリックスの配置に大きく影響しているようだ。なお、PAR1 の TM5 の相同部位はプロリンを有し折れ曲がっており、同じ δ グループではあるが、立体構造 (とくに受容体の細胞外側半分) は異なり、P2Y12 で明らかにされたアゴニスト結合による構造

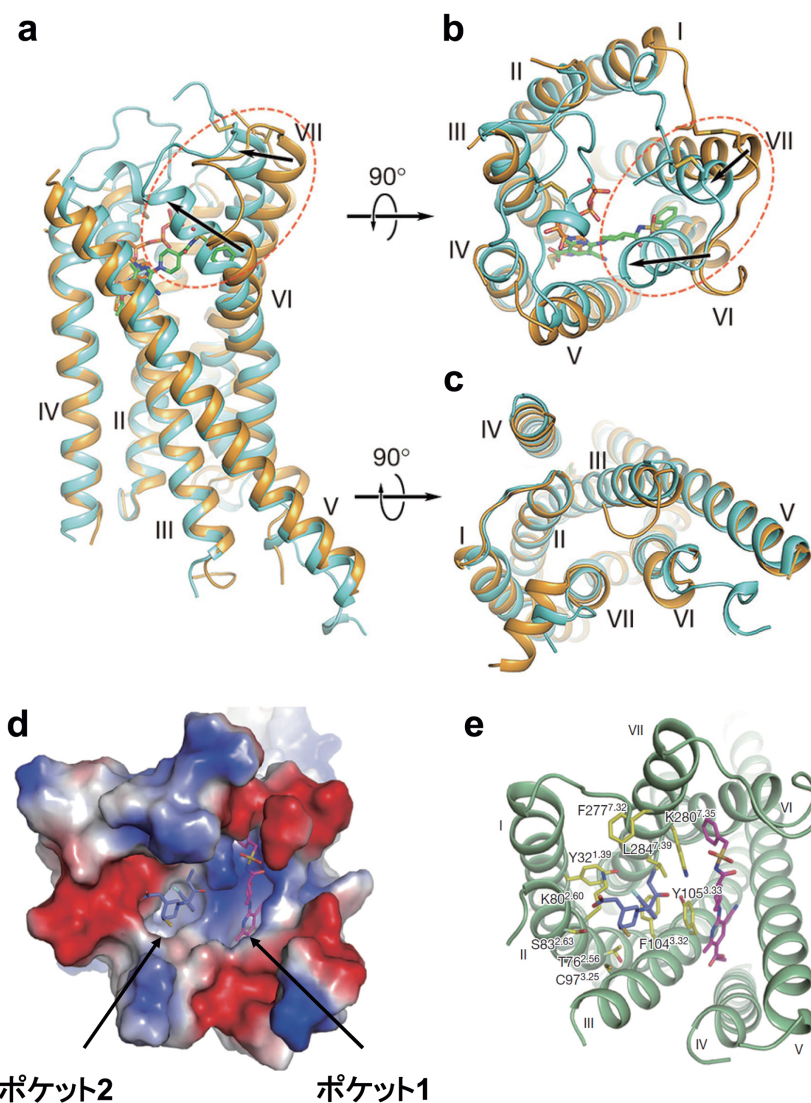


図2 P2Y12と2-MeS-ADP(アゴニスト)およびAZD1283(アンタゴニスト)結合複合体の比較およびドッキングシミュレーションによるプラスグレル活性代謝物とP2Y12の仮想結合様式

P2Y12-2-MeS-ADP 複合体(P2Y12 リボンモデル: シアン, 2-MeS-ADP スティックモデル: オレンジ)およびP2Y12-AZD1283 複合体(P2Y12 リボンモデル: オレンジ, AZD1283 スティックモデル: 緑)の側面(a)および細胞外方向(b), 細胞内方向(c)から眺めた立体構造モデル. 矢印で示すように, 2-MeS-ADP 結合時にはTM6とTM7の細胞外側領域が7つのTMの中心方向に大きく移動している(aおよびb). 他方, 受容体の細胞内側半分の構造変化は小さい(aおよびc). しかし一般的に, GPCR活性化に伴う細胞内側領域の構造変化はGタンパク質結合により安定化されるので, この立体構造モデルの細胞内側領域に関しては活性化状態を反映していない(すなわち, アゴニスト結合型不活性化状態)と推測される.

P2Y12の表面静電ポテンシャルモデル(d)とリボンモデル(e)におけるプラスグレル活性代謝物およびAZD1283の結合様式. 表面静電ポテンシャルモデルでは負電荷を赤, 正電荷を青で色付けられている. リボンモデルではP2Y12は緑で描画されている. プラスグレル活性代謝物の炭素骨格は青, AZD1283の炭素骨格はマゼンタで示されている.

文献5)のFigure 2および文献6)のFigure 3より一部改変して引用.

変化(後述)もPAR1には当てはまらないのかもしれない⁵⁾.

クラスA GPCRの7割には, TM3の細胞内側に保存されたAsp(またはGlu)-Arg-Tyr(またはPhe)配

列(DRYモチーフ)が存在しており, TM6の側鎖とイオン結合あるいは水素結合を形成して構造を安定化させ, 不活性化状態を保持する. アンタゴニストを結合した不活性型のP2Y12のTM6は, 他のクラ

ス A GPCR に比較してヘリックス・ターンが半回転分ずれており、DRY モチーフが相互作用する部位にはバリンが存在して静電的結合が形成されていない。したがって、P2Y₁₂ は構造が不安定で、活性化されやすい受容体であることが示唆された。実際、P2Y₁₂ は定常的に活性が高いことが知られている。

3. アゴニスト結合に伴う P2Y₁₂ の構造変化

P2Y₁₂ の最も顕著な特徴は、アゴニスト結合時には、アンタゴニスト結合時の不活性状態に比べて、細胞外側領域のコンフォメーションに非常に大きな変化が生じることであった(図 2)。これまでにアゴニスト・アンタゴニスト結合の双方の立体構造が解かれた α グループの GPCR においては、このような細胞外側領域の大きな変化は観察されていない。こうした GPCR は 7 つの TM によって形成される 1 つのリガンド結合ポケットを有するが、P2Y₁₂ の結合ポケットは、TM₃~7 で形成されるポケット 1 と TM₁~3 および TM₇ で形成されるポケット 2 の 2 つに分かれており、ヌクレオチド系アゴニストである 2-MeS-ADP と非ヌクレオチド系アンタゴニストである AZD1283⁸⁾ ではポケットへの結合様式が全く異なる。2-MeS-ADP は、アデノシン骨格部分がポケット 1 に、2 つのリン酸基はポケット 2 の上部に結合しており、分子全体としては両ポケットの間をまたがって位置するが、AZD1283 は、分子全体がポケット 1 のみに分子の長軸方向を変えて結合することが示された(両ポケットの位置関係は図 2d を参照)。2-MeS-ADP 結合時と AZD1283 結合時の P2Y₁₂ の立体構造を比較すると、TM₆ および TM₇ の細胞外側領域に大きな構造的変化が起きていた(図 2a, b)。2-MeS-ADP 結合時の P2Y₁₂ は AZD1283 結合時よりも TM₆ で 10 Å、TM₇ で 5 Å 内側に移動しており、ポケット 1 が顕著に狭くなっていた。また、クラス A GPCR の機能において非常に重要な TM₃ と細胞外ループ 2 (ECL₂) のジスルフィド結合について(文献 7 参照、後述)、2-MeS-ADP 結合時には明確に確認されたが、AZD1283 結合時には電子密度が低下しており、このジスルフィド結合を含めた細胞外領域の高い可動性が示唆された。すなわち、2-MeS-ADP が結合すると、細胞外領域が結合ポケ

ットを覆って安定化するようだ。

以上の知見と変異導入リコンビナント受容体の解析結果から、P2Y₁₂ の構造変化について以下の様なモデルが提唱された⁵⁾。P2Y₁₂ のリガンド結合ポケットの入り口領域、および、ECL₂ を含む細胞外ループとアミノ末端領域で構成されるポケットの“蓋”にあたる細胞外領域には、アルギニンやリシンなどの正電荷のアミノ酸側鎖が豊富に存在している。したがって、リガンドが結合していない状態では、それぞれの領域は静電的に反発しており、また、可動性も大きく、比較的高いヌクレオチドリガンドの結合ポケットへのアクセスを可能にする。AZD1283 は、ポケット 1 を押し広げるような状態で結合するので、ポケットの側面を形成する TM₆ および TM₇ がやや外側に開く。他方、2-MeS-ADP はアデノシン骨格部分のみがポケット 1 に結合し、また、2-MeS-ADP のリン酸基や水酸基は、上記の正電荷アミノ酸側鎖などと静電的に相互作用するので、TM₆ および TM₇ は内側に移動してポケットの入り口は狭くなり、かつ、細胞外領域がポケットを覆って閉じた状態で安定化するという。

TM₃ と ECL₂ のジスルフィド結合は S1P₁ 以外のクラス A の GPCR に保存されており、受容体の安定化と機能に重要であることが知られている⁹⁾。他方、P2Y₁₂ のこのジスルフィド結合は、他の GPCR と異なり、不安定と考えられ⁶⁾、チエノピリジン系抗血小板剤の標的部位と示唆された(後述)。

4. プラスグレル活性代謝物と P2Y₁₂ の結合様式

プラスグレル(商品名：エフィエント[®])は 2009 年に欧米で承認され、本年 3 月に本邦でも承認されたチエノピリジン系抗血小板剤である。チエノピリジン系抗血小板剤はプロドラッグであり、生体内で活性代謝物となって薬効を発揮する。活性代謝物と P2Y₁₂ の結合は非可逆的であり¹⁰⁾、血小板の寿命に依存した安定した抗血小板作用を示す^{10, 11)}。Zhang らは AZD1283 結合型の P2Y₁₂ の立体構造を基にシミュレーションし、プラスグレル活性代謝物(図 1)と P2Y₁₂ のドッキングモデルを検討した。その結果、プラスグレル活性代謝物はポケット 2 に入ることが示唆された⁶⁾(図 2e)。

P2Y12の細胞外システイン残基はC17(アミノ末端領域), C97(TM3), C175(ECL2), C270(ECL3)であり, 活性代謝物はこのどれかのシステインとジスルフィド結合を形成することが想定されていた。Algaierらはアミノ酸置換したリコンビナントP2Y12を用いてプラスグレル活性代謝物の作用を評価することで, C97とC175がプラスグレル活性代謝物の標的であることを示した¹²⁾。Zhangらは, プラスグレル活性代謝物とリコンビナントP2Y12の結合をサイズ排除クロマトグラフィーで検出し, プラスグレル活性代謝物の結合にはC97が関与していることを示した⁶⁾。ドッキングシミュレーションの結果から, プラスグレル活性代謝物はTM3近傍に結合しており, TM3のC97とジスルフィド結合を形成する可能性が高い。プラスグレル活性代謝物は, ポケット2のリガンド結合部位を不可逆的にふさぐとともに, C97(TM3)とC175(ECL2)の間のジスルフィド結合形成を阻害することでP2Y12阻害作用を発揮するのであろう。また, 前述したように, P2Y12のTM3とECL2間のジスルフィド結合は他のGPCRと異なり不安定だが, この特徴的な性質により, チェノピリジン系抗血小板剤がP2Y12に非常に選択性が高いことを説明できる可能性がある。

5. 非チェノピリジン系P2Y12アンタゴニストとP2Y12の結合様式

2-MeS-ADP結合型のP2Y12の立体構造を基に, 非チェノピリジン系P2Y12アンタゴニストのAR-C69931MX(cangrelor, 図1)のドッキングモデルも示されている⁵⁾。CangrelorはPCI施行時の急性期心血管イベント予防で欧米での開発が進められているATP安定化アナログである。ドッキングモデルにおいて, cangrelorは2-MeS-ADPと同様の配置でP2Y12と結合していた。

チカグレロルは欧米で既に承認されている抗血小板剤であり, cyclopentyltriazolo-pyrimidine骨格を有する非チェノピリジン系P2Y12アンタゴニストである(図1)¹³⁾。今回, チカグレロルとP2Y12との結合については検討されていないが, チカグレロルの作用メカニズムには興味深い点があるので, 触れておきたい。Van Giezenらの報告によると, チカグレロ

ルは可逆的アンタゴニストだが, P2Y12阻害様式は, 内因性リガンドであるADPに対しては非競合的であり, 2-MeS-ADPに対しては競合的である¹⁴⁾。ADPと2-MeS-ADPの構造的な違いは僅かで, 2-MeS-ADP結合型のP2Y12の立体構造を基にシミュレーションされたADPのドッキングモデルの結果もほとんど変わらないので⁵⁾, チカグレロルの両アゴニストに対する阻害様式の違いは全くの謎である。チカグレロルはポケットにどのように入っているのか, あるいは未知のアロステリックサイトがあるのか等について, 今後の報告が期待される。

6. おわりに

アゴニストおよびアンタゴニストが結合したP2Y12の立体構造が明らかとなり, P2Y12の細胞外領域は非常に可塑性が高く, リガンド結合時には特徴的な構造変化が生じることが示された。これらの結果は今後P2Y12を標的とした薬剤開発を行う上で, また, まだ立体構造が不明な他のGPCRの構造を推定する上で非常に重要な知見となることが期待される。

謝辞

構造に関する記述を査読いただいた秋山正志博士(国立循環器病研究センター分子病態部)に深謝いたします。

著者の利益相反(COI)の開示:

大野耕作: 第一三共株式会社社員

武谷浩之: 本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Gachet C: P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* **99**: 466-472, 2008.
- 2) Yousuf O, Bhatt DL: The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* **8**: 547-559, 2011.
- 3) Saito S, Isshiki T, Kimura T, Ogawa H, Yokoi H, Nanto S, Takayama M, Kitagawa K, Nishikawa M, Miyazaki S, Nakamura M: Efficacy and safety of adjusted-dose prasugrel compared with clopidogrel in Japanese patients with acute coronary syndrome: the PRASFIT-ACS study. *Circ J* **78**:

- 1684–1692, 2014.
- 4) Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB: Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**: 202–207, 2001.
 - 5) Zhang J, Zhang K, Gao ZG, Paoletta S, Zhang D, Han GW, Li T, Ma L, Zhang W, Müller CE, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Katritch V, Jacobson KA, Stevens RC, Wu B, Zhao Q: Agonist-bound structure of the human P2Y₁₂ receptor. *Nature* **509**: 119–122, 2014.
 - 6) Zhang K, Zhang J, Gao ZG, Zhang D, Zhu L, Han GW, Moss SM, Paoletta S, Kiselev E, Lu W, Fenalti G, Zhang W, Müller CE, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Katritch V, Jacobson KA, Stevens RC, Wu B, Zhao Q: Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* **509**: 115–118, 2014.
 - 7) 千々岩崇仁, 武谷浩之: 凝固・線溶・血小板タンパク質の機能発現機構 トロンビン受容体 PAR1 の立体構造. *血栓止血誌* **24**: 454–459, 2013.
 - 8) Bach P, Antonsson T, Bylund R, Björkman JA, Österlund K, Giordanetto F, van Giezen JJ, Andersen SM, Zachrisson H, Zetterberg F: Lead optimization of ethyl 6-aminonicotinate acyl sulfonamides as antagonists of the P2Y₁₂ receptor. separation of the antithrombotic effect and bleeding for candidate drug AZD1283. *J Med Chem* **56**: 7015–7024, 2013.
 - 9) Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM: Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **494**: 185–194, 2013.
 - 10) Sugidachi A, Asai F, Yoneda K, Iwamura R, Ogawa T, Otsuguro K, Koike H: Antiplatelet action of R-99224, an active metabolite of a novel thienopyridine-type G(i)-linked P2T antagonist, CS-747. *Br J Pharmacol* **132**: 47–54, 2001.
 - 11) Niitsu Y, Sugidachi A, Ogawa T, Jakubowski JA, Hashimoto M, Isobe T, Otsuguro K, Asai F: Repeat oral dosing of prasugrel, a novel P2Y₁₂ receptor inhibitor, results in cumulative and potent antiplatelet and antithrombotic activity in several animal species. *Eur J Pharmacol* **579**: 276–282, 2008.
 - 12) Algaier I, Jakubowski JA, Asai F, von Kügelgen I: Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y₁₂ receptor. *J Thromb Haemost* **6**: 1908–1914, 2008.
 - 13) Husted S, van Giezen JJ: Ticagrelor: the first reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist. *Cardiovasc Ther* **27**: 259–274, 2009.
 - 14) van Giezen JJ, Nilsson L, Berntsson P, Wissing BM, Giordanetto F, Tomlinson W, Greasley PJ: Ticagrelor binds to human P2Y₁₂ independently from ADP but antagonizes ADP-induced receptor signaling and platelet aggregation. *J Thromb Haemost* **7**: 1556–1565, 2009.