

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04999

研究課題名(和文)多様なGPCRのシグナル伝達機構の構造生物学的解明

研究課題名(英文)Structural basis of signal transduction mediated by various GPCRs

研究代表者

幸福 裕 (Kofuku, Yutaka)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：80737940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、様々な細胞外からの刺激に応答する膜タンパク質であり、感覚受容・神経伝達など、様々な生理機能に関与している。本研究では、タンパク質の動的な性質を原子レベルで観測可能な核磁気共鳴(NMR)法を用いて、GPCRの一種である β 2アドレナリン受容体およびアデノシンA2A受容体の解析をおこなった。これにより、 β 2アドレナリン受容体が化合物依存的に、多様なシグナルを細胞内に伝える機構、および脂質二重膜の組成依存的にアデノシンA2A受容体の活性が変化する機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品の30%以上は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に作用して、シグナル伝達活性を変化させることで、治療効果を発揮する。本研究で得られたGPCRの構造を参考にして、下流のシグナルを伝達する分子との相互作用に、選択的に作用する化合物を作ることができれば、副作用を抑制する薬剤を、合理的に設計できる可能性が示された。また、脂質の作用を模倣することで、生体内に存在する化合物や他の薬剤がすでに結合したGPCRに対しても作用する薬剤設計の道が開け、新たな作用点および薬理作用を持つ医薬品の開発が加速することが期待される。

研究成果の概要(英文)：G-protein-coupled receptors (GPCRs) are seven-transmembrane proteins mediating cellular signals in response to extracellular stimuli. Although three-dimensional structures showcase snapshots that can be sampled in the process, the mechanism by which agonist-activated GPCRs interact with various effectors remains elusive. Here, we used nuclear magnetic resonance to visualize the structures of β 2-adrenergic receptor and adenosine A2A receptor. Analyses of efficacy-dependent chemical shifts of β 2-adrenergic receptor identified an equilibrium among three conformations, including one responsible for the varied signal level in each ligand-bound state. The docosahexanoic acid chains in lipid membranes redistribute the multiple conformations of adenosine A2A receptor toward those preferable for G protein binding. These results provide a structural basis for the dynamic activation of GPCRs and shed light on GPCR-mediated signal transduction.

研究分野：構造生物学

キーワード：核磁気共鳴法 シグナル伝達 膜タンパク質 Gタンパク質共役型受容体 脂質二重膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、真核生物最大の膜タンパク質ファミリーであり、感覚受容、神経伝達など、様々な生理機能に参与している。また、市販医薬品の標的の約30%を占めており、創薬の観点からも重要である。GPCRにリガンドが結合すると、様々な強度でシグナル伝達が活性化、あるいは不活性化されることが知られている。また、GPCRの細胞内シグナル伝達経路には、Gタンパク質を介したGタンパク質経路と、GPCRキナーゼ(GRK)によるGPCRのリン酸化を経て、アレスチンが結合することで誘起されるアレスチン経路があり、それぞれが異なる生理活性に対応している。さらに、GPCRは生理的環境では、脂質二重膜中で機能しているが、その脂質組成によりGPCRの活性が変化することが報告されている。GPCRについては、X線結晶構造解析および極低温電子顕微鏡解析により、多数の静的な構造が明らかになっている一方で、上述のような複雑なGPCRのシグナル制御機構は明らかになっていない。我々は、これまでにタンパク質の動的性質を溶液中で解析可能な核磁気共鳴(NMR)法を用いて、GPCRが複数の構造間をゆれ動く動的平衡にあることを示してきた。このことをふまえ、我々は、NMR法を用いてGPCRの動的構造を解析することで、そのシグナル制御機構を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

(1) GPCRのシグナル伝達経路にはGタンパク質経路とアレスチン経路が存在するが、このうち、GRKによるGPCRのリン酸化を経て、アレスチンが結合することにより活性化されるアレスチン経路については、その制御機構は不明である。そこで、NMR法を用いてアレスチン経路の活性化に関わる動的構造を解析し、その制御機構を明らかにすることを目的とした。

(2) GPCRに作動薬およびGタンパク質が結合した状態の構造は、X線結晶構造解析および極低温電子顕微鏡解析により明らかにされている一方、作動薬のみが結合した状態の構造については、その不安定性から、熱安定変異などが導入された状態に構造情報が限られている。そこで、NMR法を用いて、作動薬のみが結合した状態の動的構造を解析し、作動薬依存的なGPCRのシグナル伝達制御機構を明らかにすることを目的とした。

(3) 生理的条件下では、GPCRは脂質二重膜中で機能するが、これまでの構造生物学的解析は、主に界面活性剤中でおこなわれてきた。一部のGPCRでは、脂質二重膜中のドコサヘキサエン酸(DHA)含有量により、シグナル伝達活性が変化することが知られている。そこで、NMR法を用いて、様々な脂質組成におけるGPCRの動的構造を解析し、DHA依存的なGPCRの活性制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GPCRの一種である β_2 -アドレナリン受容体(β_2 AR)について、以下の方法により膜貫通領域とC末端領域をそれぞれ異なるパターンで安定同位体標識した(図1)。 β_2 ARの膜貫通領域のC末端側にsplit inteinのN末端領域(Int_N)を融合し、昆虫細胞発現系により発現した。 β_2 ARのC末端領域のN末端側にsplit inteinのC末端領域(Int_C)を融合し、大腸菌発現系により発現した。両者をそれぞれ精製した後、混合することでタンパク質ライゲーション反応を誘導し、 β_2 AR膜貫通領域とC末端領域が融合した、全長 β_2 ARを調製した。調製した全長 β_2 ARは、ナノディスクの脂質二重膜に再構成した後、NMR解析をおこなった。リン酸化状態については、作動薬存在下においてGRK2でリン酸化をおこなった後に、NMR解析をおこなった。アレスチン結合状態については、リン酸化状態の試料にさらに β -arrestin 1を添加した上で、NMR解析をおこなった。

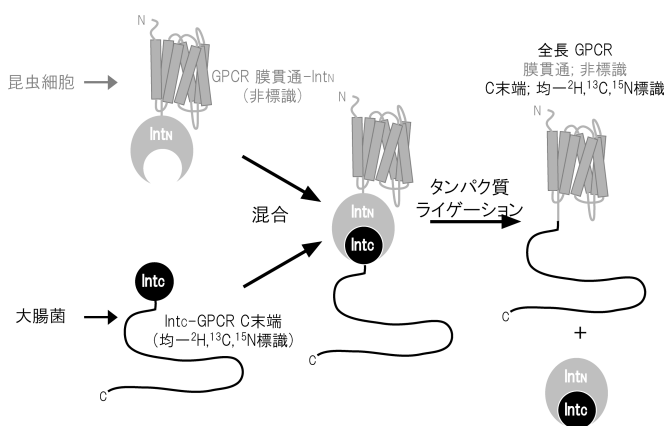


図 1. β_2 AR の区分選択標識

(2) GPCRの一種である β_2 ARについて解析をおこなった。昆虫細胞発現系を用いて、 β_2 ARのロイシン残基アミド基を選択的に¹⁵N標識した試料を調製する方法を確立した。 β_2 ARの細胞内領域の様々な位置に、システインを変異導入し、遊離のSH基を介してスピンラベルを導入した。スピンラベルからの各ロイシン残基アミド基までの距離に依存した常磁性緩和促進(PRE)効果を解析することにより、 β_2 ARの構造を可視化した。

(3) GPCR の一種であるアデノシン A_{2A} 受容体 (A_{2A}R) を酵母 *Pichia pastoris* により発現し、様々な脂質組成の脂質二重膜に再構成した上で、シグナル伝達アッセイおよび NMR 解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) β₂AR の C 末端領域を選択的に安定同位体標識した試料を用いて、NMR 解析をおこなった。その結果、GRK2 によるリン酸化にともない、膜貫通領域に近い S355、S356、T360、S364 が高度にリン酸化されること、さらにリン酸化にともない、S355 ~ T360 を含む領域の動的構造が大きく変化することを見出した。この構造変化の要因を調べるため、β₂AR 膜貫通領域と C 末端細胞内領域との相互作用を、分子内交差飽和実験により解析した。その結果、リン酸化されていない状態では、膜貫通領域と C 末端領域には相互作用がない一方、リン酸化された状態では、膜貫通領域と T360 近傍領域に分子内相互作用が生じることがわかった。また、膜貫通領域の動的構造をリン酸化前後で解析した結果、リン酸化にともなって膜貫通領域の動的構造が変化することもわかった。この構造変化は、アレスチンが結合した状態の構造変化に近いことから、アレスチンとの結合に有利にはたらくものと考えた。以上の結果をもとに、GRK による β₂AR のリン酸化と、それともなうアレスチン経路の活性化機構について、新たなモデルを提唱した (図 2、文献)。

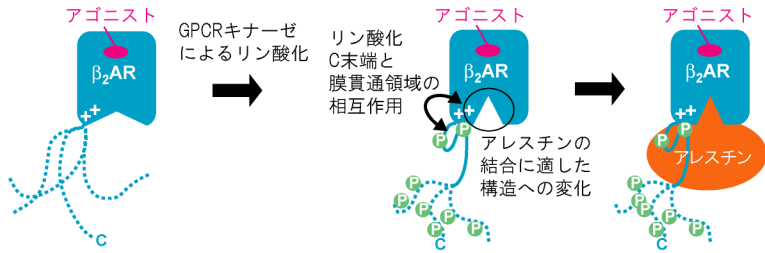


図 2. β₂AR のリン酸化依存的なアレスチン経路の活性化

(2) PRE 効果を用いて、作動薬のみが結合した状態の β₂AR の NMR 構造を決定した。その結果、作動薬と G タンパク質が結合した状態の構造とは異なり、β₂AR の第 6 膜貫通ヘリックス (TM6) は外側には開いていないことがわかった。一方で、逆作動薬が結合した不活性型の構造と比較すると、作動薬結合状態では、TM6 は細胞内側からみて時計回りに約 90 度回転していることがわかった。この構造変化により、細胞内側に疎水性残基のクラスターが形成され、これを G タンパク質が認識して結合するという新たな活性化モデルを提唱した。また、様々な化合物が結合した β₂AR の NMR スペクトルを解析した結果、β₂AR の活性型構造には、G タンパク質を活性化する程度の異なる、複数の構造が存在することがわかった。β₂AR が G タンパク質を活性化するシグナル伝達強度は、結合するリガンドにより、様々に異なるが、上記の複数の構造間の平衡を考慮することで、シグナル伝達強度の違いをより定量的に説明することができるようになった (図 3、文献)。

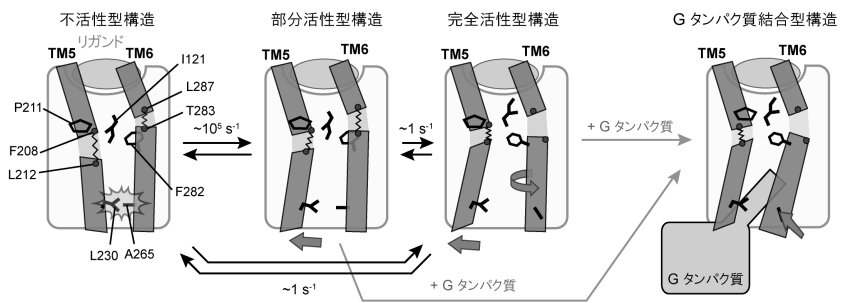


図 3. β₂AR のリガンド依存的な活性化機構

(3) A_{2A}R を、多価不飽和脂肪酸を含まない脂質二重膜、アラキドン酸 (ARA) を含む脂質二重膜、DHA を含む脂質二重膜に再構成し、G タンパク質を活性化するシグナル伝達活性を測定した。その結果、DHA を含む脂質でのみ、シグナル伝達活性が顕著に増大していた。同じ脂質二重膜に再構成した A_{2A}R の膜貫通領域の動的構造を NMR により解析した。その結果、A_{2A}R は不活性型と複数の活性型の構造の平衡にあること、脂質組成により、複数の活性型構造の割合が変化することが明らかになった。脂質二重膜中の DHA は A_{2A}R と相互作用することで、その動的平衡に変調を与え、その結果、シグナル伝達活性が上昇するという新たな機構を提唱した

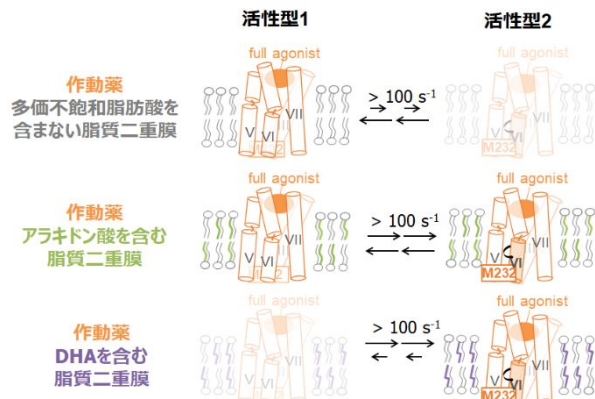


図 4. A_{2A}R の脂質組成依存的な活性制御機構

(図 4、文献)

< 引用文献 >

Shiraishi Y, Natsume M, Kofuku Y, Imai S, Nakata K, Mizukoshi T, Ueda T, Iwai H, Shimada I. *Nature Communications* (2018) **9**, 194

Imai S, Yokomizo T, Kofuku Y, Shiraishi Y, Ueda T, Shimada I. *Nature Chemical Biology* (2020) **16**, 430-439

Mizumura T, Kondo K, Kurita M, Kofuku Y, Natsume M, Imai S, Shiraishi Y, Ueda T, Shimada I. *Science Advances* (2020) **6**, eaay8544

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 幸福 裕、今井 駿輔、上田 卓見、嶋田 一夫	4. 巻 53
2. 論文標題 GPCRのNMR・ESR解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 280-284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizumura Takuya, Kondo Keita, Kurita Masatoshi, Kofuku Yutaka, Natsume Mei, Imai Shunsuke, Shiraishi Yutaro, Ueda Takumi, Shimada Ichio	4. 巻 6
2. 論文標題 Activation of adenosine A2A receptor by lipids from docosahexaenoic acid revealed by NMR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaay8544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aay8544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Imai Shunsuke, Yokomizo Tomoki, Kofuku Yutaka, Shiraishi Yutaro, Ueda Takumi, Shimada Ichio	4. 巻 16
2. 論文標題 Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of β_2 -adrenoreceptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 430 ~ 439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-019-0457-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimada Ichio, Ueda Takumi, Kofuku Yutaka, Eddy Matthew T., Wuthrich Kurt	4. 巻 18
2. 論文標題 GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Reviews Drug Discovery	6. 最初と最後の頁 59 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/nrd.2018.180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kofuku Yutaka, Yokomizo Tomoki, Imai Shunsuke, Shiraishi Yutaro, Natsume Mei, Itoh Hiroaki, Inoue Masayuki, Nakata Kunio, Igarashi Shunsuke, Yamaguchi Hideyuki, Mizukoshi Toshimi, Suzuki Ei-ichiro, Ueda Takumi, Shimada Ichio	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Deuteriation and selective labeling of alanine methyl groups of 2-adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomolecular NMR	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10858-018-0174-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiraishi Yutaro, Natsume Mei, Kofuku Yutaka, Imai Shunsuke, Nakata Kunio, Mizukoshi Toshimi, Ueda Takumi, Iwai Hideo, Shimada Ichio	4. 巻 9
2. 論文標題 Phosphorylation-induced conformation of 2-adrenoceptor related to arrestin recruitment revealed by NMR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-02632-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kofuku Y, Shiraishi Y, Natsume M, Okude J, Sato M, Imai S, Kondo K, Mizumura T, Maeda M, Tsujishita H, Kuranaga T, Inoue M, Nakata K, Mizukoshi T, Ueda T, Iwai H, Shimada I
2. 発表標題 Dynamics of G protein-coupled receptor related to various signaling revealed by NMR
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaro Shiraishi, Mei Natsume, Yutaka Kofuku, Shunsuke Imai, Kunio Nakata, Toshimi Mizukoshi, Takumi Ueda, Hideo Iwai and Ichio Shimada
2. 発表標題 Phosphorylation-induced conformation of 2-adrenoceptor related to arrestin recruitment revealed by NMR
3. 学会等名 XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yutaka Kofuku, Tomoki Yokomizo, Shunsuke Imai, Yutaro Shiraishi, Mei Natsume, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Kunio Nakata, Shunsuke Igarashi, Hideyuki Yamaguchi, Toshimi Mizukoshi, Ei-Ichiro Suzuki, Takumi Ueda and Ichio Shimada
2. 発表標題 Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of α 2-adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system
3. 学会等名 XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 幸福裕、上田卓見、嶋田一夫
2. 発表標題 動的構造に着目したGタンパク質共役型受容体の機能解明
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室ホームページ http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/index_j.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フィンランド	ヘルシンキ大学生物工学研			