

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18H02388
研究課題名（和文）GPCRのバイアス型シグナル機構の構造基盤

研究課題名（英文）Biased GPCR signaling mechanism

研究代表者

島村 達郎（Shimamura, Tatsuro）

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：90391979

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：Gタンパク質共役型受容体（GPCR）に作用する薬は、活性化経路や受容体の選択性が低いことなどから副作用があるものが多い。このような副作用の構造基盤の理解を目指し、薬剤とGPCRの構造解析を行った。インバースアゴニストが結合したGPCRの構造解析に成功し、受容体の選択性に関する知見が得られた。活性化経路の選択性に関わる数種のアゴニストとの複合体について、GPCRの安定化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受容体や活性化経路の選択性に特徴のある薬剤とGPCRとの複合体の構造解析と構造比較により、薬剤の選択性に関する理解が深化する。本研究では主に、統合失調症などに関わるドパミンD2受容体（D2R）の構造解析を行った。D2Rにインバースアゴニストが結合した構造からは、受容体選択性の改善に利用可能と考えられる結合部位が見出された。各種アゴニストが結合した構造からは、活性化経路選択性に関する知見が取得できる。

研究成果の概要（英文）：Drugs that act on G protein-coupled receptors (GPCRs) often have side effects due to their poor selectivities of the receptor and the signaling pathway, etc. Aiming to understand the structural basis of these side effects, we performed structural analysis of GPCRs in complex with several kinds of drugs. We succeeded to determine a structure of a GPCR bound with an inverse agonist, which was useful to understand the mechanism of the receptor selectivity of the drug. The structural studies for a GPCR in complex with several kinds of agonists are underway.

研究分野：構造生物学

キーワード：GPCR 構造解析 バイアス型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重要な創薬標的である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に作用する薬は、活性化経路や受容体の選択性が低いことなどから副作用があるものが多い。GPCR は情報伝達に関わり、多様なコンフォメーションの平衡状態で存在する。GPCR にインバースアゴニストが結合すると平衡は不活性化状態に偏り、GPCR は不活性型構造となる。一方、GPCR にアゴニストが結合すると平衡は活性化状態に偏り、G タンパク質もしくは アレスチンと結合する 2 つ以上の活性型構造をとる。これまでアゴニストは、G タンパク質結合型、アレスチン結合型のどちらにもなりうる構造を安定化するバランス型アゴニストと考えられてきた。しかし最近、片方の構造だけを安定化するバイアス型アゴニストの存在が明らかになった。このような現象はバイアス型シグナルと呼ばれる。また、バイアス型シグナルにより薬の副作用と副作用を分離できるため、バイアス型アゴニストは副作用の少ない新薬になると期待されている。このようにバイアス型シグナルは注目されているが、この機構の分子レベルでの理解に不可欠な構造情報は不足していた。その原因として、バイアス型アゴニストが少ないことや、GPCR の構造解析が難しいことなどが挙げられた。また、アゴニスト、インバースアゴニストに関わらず、GPCR の薬剤結合部位の類似性により、目的の GPCR 以外の GPCR に作用することで生じる副作用も多く知られていた。

我々は、統合失調症やパーキンソン病に関わるドパミン D₂ 受容体 (D₂R) について、大量発現系の構築に成功していた。また D₂R に関しては、入手可能なインバースアゴニストが多く、また、バランス型アゴニストおよび G タンパク質、アレスチン各経路のバイアス型アゴニストが論文で発表されており、D₂R は薬剤の副作用に関する構造生物学的研究を遂行可能な受容体の一つであった。

2. 研究の目的

D₂R のインバースアゴニストは統合失調症の治療薬として、アゴニストはパーキンソン病の治療薬として使われてきた。また、D₂R の アレスチン経路バイアス型アゴニストの一種は、マウスの実験から統合失調症の治療薬としての可能性が示唆されている。さらに、統合失調症の新しいタイプの治療薬 (パーシャルアゴニスト) は、D₂R のバイアス型アゴニスト性が関係しているとの報告もある。本研究の目的は、インバースアゴニスト、バランス型アゴニスト、G タンパク質、アレスチン各経路のバイアス型アゴニストが結合した D₂R 複合体の立体構造を決定して各種リガンドの結合様式を精査し、バイアス型シグナル機構や、受容体の選択性を分子レベルで解明するために役立つ構造情報を取得することである。これらの成果は、D₂R の情報伝達機構の解明や、副作用の少ない統合失調症治療薬やパーキンソン病の治療薬の開発にも役立つと考えられる。

3. 研究の方法

GPCR は柔軟な構造を持つ膜タンパク質であるため不安定であり、大量発現や構造解析のためには安定化させる必要がある。安定化のためには 2 通りの手法を試みた。第一は、受容体の改変により安定性を改善する方法である。研究開始時点で、5 本目と 6 本目の膜貫通ヘリックスの間に構造の安定な水溶性タンパク質を挿入することで GPCR は安定化できること、また、GPCR の不活性型構造は 3 本目の膜貫通ヘリックスのアミノ酸を塩基性アミノ酸に置換することで安定化できることが知られており、本研究でもそれらの知見を参考にして、水溶性タンパク質の適切な挿入位置やアミノ酸置換の検討を行った。さらには、挿入する水溶性タンパク質の安定性を高める改良も行った。安定化のための第 2 の方法は、構造認識抗体を結合させるものである。精製した GPCR をマウスに免疫し、数段のスクリーニングを行い、立体構造を認識し、親和性の高い抗体を選択した。さらに、インバースアゴニストやアゴニストを結合させることで平衡が偏り、不活性型構造、活性型構造を安定化できる。不活性型構造は結晶構造解析の手法を利用した。活性型構造は、アゴニストを結合させて結晶化を試みたが成功せず、電子顕微鏡を利用する方法に切り替えた。この場合、作製した構造認識抗体を結合させることで、画像解析の際に分子の位置合わせの目印に利用できるという利点がある。

4. 研究成果

D₂R にインバースアゴニストであるスピペロンが結合した不活性型構造の解明に成功した。スピペロンは統合失調症の治療薬である抗精神病薬の一種である。スピペロンは、D₂R 以外にはセロトニン 2A 受容体とセロトニン 1A 受容体にだけ親和性が高く、構造面から薬剤の受容体選択性を考察するのに適した薬である。また不活性型構造は、バランス型アゴニストや各経路のバ

イアス型アゴニストが結合した活性型構造からバイアス型シグナル機構を考察する際にも比較対象として役立つ。D₂R の安定化のため、S121K/L123W の変異を導入し、第 5、第 6 ヘルックスの間に新たに開発した mbIIG を挿入した。これらに加え、構造認識抗体の Fab 断片を結合させることで結晶化に成功した。挿入する水溶性タンパク質については、他の GPCR の構造解析研究で利用されていた T4 リゾチーム、アポ型シトクロム b562RIL(BRIL)、PGS などについて挿入位置をずらしながら検討したが、いずれも結晶化には成功しなかった。そこで変異導入やループ領域の削除などの改変により BRIL の安定性をさらに改良した (mbIIG)。この mbIIG を挿入させると D₂R の熱安定性は向上し、結晶化に成功した。今回作製した mbIIG は、セロトニン 2A 受容体や、プロスタノイド受容体 EP4 などの結晶化にも利用され、GPCR の構造解析研究に役立っている。

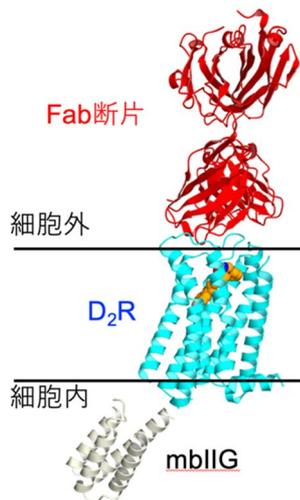


図 1. D₂R の不活性型構造

D₂R の不活性型構造を図 1 に示す。膜タンパク質である D₂R (水色) は細胞膜内に埋もれ、スピペロン (オレンジ色) を結合していた。また、挿入した mbIIG (灰色) は細胞内領域に存在し、抗体 Fab 断片 (赤色) は D₂R の細胞外領域に結合していた。スピペロンが結合した薬剤結合部位は図 2 A のようになる。D₂R の薬剤結合部位の構造は、類似のアミン受容体の薬剤結合部位の構造と概ね同等で、D₂R に結合する薬剤の多くが低い受容体選択性を持つ理由を説明した。一方で、スピペロンが結合した D₂R の薬剤結合部位には他のアミン受容体では見られない空洞が存在した (図 2 B、赤丸部分)。図 2 A の断面図が図 2 B であるが、この空洞はスピペロンのベンゼン環の結合に適した位置に存在した。既述のようにスピペロンは D₂R、セロトニン 1A 受容体、セロトニン 2A 受容体への選択性が高い。この空洞は、このような高い受容体選択性に寄与していると考えられた。

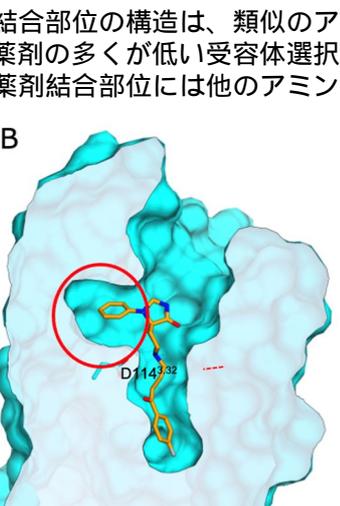


図 2. (A) D₂R のスピペロン結合部位。 (B) A の断面図。

D₂R の不活性型構造としては、抗精神病薬リスペリドンが結合した不活性型構造が同時期に発表されていた。驚いたことに、スピペロン結合型とリスペリドン結合型の D₂R の不活性型構造は、薬剤結合部位の構造が大きく異なっていた。第一に、細胞外第 2 ループの構造が大きく異なっていた (図 3 A、赤丸で囲んだ部分)。スピペロン結合型 D₂R (図 3 緑色) の細胞外第 2 ループは薬剤結合部位の上方 (細胞外側) に位置し、結合した薬剤が細胞外に出ていくのを防ぐ蓋のような構造であった。リスペリドン結合型 D₂R (図 3 黄色) では、細胞外第 2 ループは分子の外側に向かって大きく反転しており、その結果、薬剤結合部位は細胞外に露出していた。なお、スピペロン結合型 D₂R の細胞外第 2 ループの構造は、他のアミン受容体の細胞外第 2 ループの構造と類似しており、さらに、D₂R の活性型構造 (図 3 B 水色) の細胞外第 2 ループの構造とも類似していた。

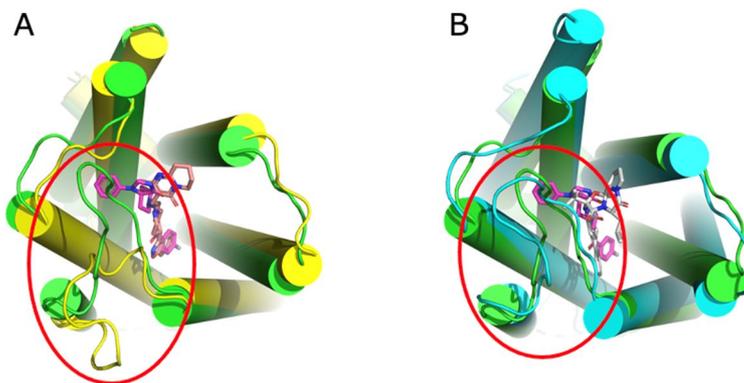


図 3. 細胞外第 2 ループの構造比較。細胞外側から見た図。

第二の違いは、薬剤結合部位の空洞の有無である。リスペリドン結合型ではスピペロン結合型で見られた空洞は存在しなかった (図 4)。これは薬剤結合部位に存在する Phe110 の向きの違いに起因していた。リスペリドン結合型では、Phe110 の側鎖は薬剤結合部位の中の方に向いていたが、スピペロン結合型では Phe110 の側鎖は逆方向を向いており、スピペロンのベンゼン環が結合可能な空洞を形成していた。リスペリドンはスピペロンに比べ受容体選択性が低い。これは D₂R に固有の部位との結合が存在しないことに起因すると考えられた。また、スピペロン結合型で Phe110 の側鎖を反転させ、薬剤結合部位の方向に向ける場合に立体障害は存在しないと考えられたが、リス

ペリドン結合型で Phe110 を反転させる場合には付近のアミノ酸との立体障害が存在した。このことから、リスペリドン結合型の構造でリスペリドンを結合させることは困難であると考えられた。

不活性型構造の構造解析の結果、D₂R に固有の薬剤結合部位が見出され、受容体選択性の高い薬剤の開発に役立つ情報が取得できた。また、不活性型構造は、現在も研究中の活性型構造を解明後、バイアス型シグナル機構を構造比較から解明する際にも必要になると考えている。

本研究の結果、D₂R の不活性型構造に、大きく異なる複数の構造が存在することが明らかになったことは新たな発見であった。このような例は、他の GPCR の構造解析研究でも知られていない。このような違いにより不活性化機構や活性化機構がどのような影響を受けるのか、大変興味深い新たな課題が見つかった。また、タンパク質の立体構造情報は合理的な創薬に重要であるが、今回の結果から、少なくとも GPCR においては、1 種の薬剤との複合体構造の情報だけでは不十分で、複数の薬剤との複合体の構造解析が必要であることを示唆した。以上を考慮すると本研究の成果は、GPCR の機能の理解や創薬にとって、重要な研究になったと考えられる。

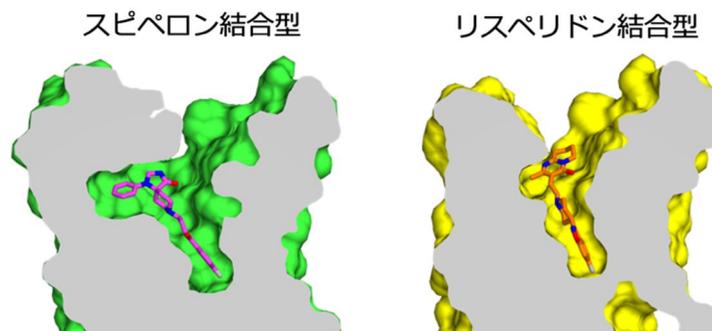


図 4. スピペロン結合型、リスペリドン結合型の比較。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Jaunet-Lahary Titouan, Shimamura Tatsuuro, Hayashi Masahiro, Nomura Norimichi, Hirasawa Kouta, Shimizu Tetsuya, Yamashita Masao, Tsutsumi Naotaka, Suehiro Yuta, Kojima Keiichi, Sudo Yuki, Tamura Takashi, Iwanari Hiroko, Hamakubo Takao, Iwata So, Okazaki Kei-ichi, Hirai Teruhisa, Yamashita Atsuko	4. 巻 14
2. 論文標題 Structure and mechanism of oxalate transporter OxIT in an oxalate-degrading bacterium in the gut microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-36883-5	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 Oda K, Nomura T, Nakane T, Yamashita K, Inoue K, Ito S, Shimamura T, , Nureki O., et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife	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 Toyomoto M, Inoue A, Iida K, Denawa M, Kii I, Ngako Kadji FM, Kishi T, Im D, Shimamura T, Onogi H, Yoshida S, Iwata S, Aoki J, Hosoya T, Hagiwara M.	4. 巻 28
2. 論文標題 S1PR3?G12-biased agonist ALESIA targets cancer metabolism and promotes glucose starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1132 ~ 1144. e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.01.004	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 島村達郎	4. 巻 278
2. 論文標題 GPCRの構造解析研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 573-579
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 Im Dohyun, Inoue Asuka, Fujiwara Takaaki, Nakane Takanori, Yamanaka Yasuaki, Uemura Tomoko, Mori Chihiro, Shiimura Yuki, Kimura Kanako Terakado, Asada Hidetsugu, Nomura Norimichi, Tanaka Tomoyuki, Yamashita Ayumi, Nango Eriko, Tono Kensuke, Kadji Francois Marie Ngako, Aoki Junken, Iwata So, Shimamura Tatsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20221-0	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 Asada Hidetsugu, Inoue Asuka, Ngako Kadji Francois Marie, Hirata Kunio, Shiimura Yuki, Im Dohyun, Shimamura Tatsuro, Nomura Norimichi, Iwanari Hiroko, Hamakubo Takao, Kusano-Arai Osamu, Hisano Hiromi, Uemura Tomoko, Suno Chiyo, Aoki Junken, Iwata So	4. 巻 28
2. 論文標題 The Crystal Structure of Angiotensin II Type 2 Receptor with Endogenous Peptide Hormone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 418 ~ 425.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.12.003	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 Shimazu Yoshiaki, Tono Kensuke, Tanaka Tomoyuki, Yamanaka Yasuaki, Nakane Takanori, Mori Chihiro, Terakado Kimura Kanako, Fujiwara Takaaki, Sugahara Michihiro, Tanaka Rie, Doak R. Bruce, Shimamura Tatsuro, Iwata So, Nango Eriko, Yabashi Makina	4. 巻 52
2. 論文標題 High-viscosity sample-injection device for serial femtosecond crystallography at atmospheric pressure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Crystallography	6. 最初と最後の頁 1280 ~ 1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600576719012846	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

1. 著者名 Takenoya Mihoko, Shimamura Tatsuro, Yamanaka Ryuji, Adachi Yuya, Ito Shinsaku, Sasaki Yasuyuki, Nakamura Akira, Yajima Shunsuke	4. 巻 75
2. 論文標題 Structural basis for the substrate recognition of aminoglycoside 7-phosphotransferase-Ia from Streptomyces hygroscopicus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 599 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X19011105	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 Kimura Kanako Terakado, Asada Hidetsugu, Inoue Asuka, Kadji Francois Marie Ngako, Im Dohyun, Mori Chihiro, Arakawa Takatoshi, Hirata Kunio, Nomura Yayoi, Nomura Norimichi, Aoki Junken, Iwata So, Shimamura Tatsuro	4. 巻 26
2. 論文標題 Structures of the 5-HT _{2A} receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 121 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-018-0180-z	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 Asada Hidetsugu, Horita Shoichiro, Hirata Kunio, Shiroishi Mitsunori, Shiimura Yuki, Iwanari Hiroko, Hamakubo Takao, Shimamura Tatsuro, Nomura Norimichi, Kusano-Arai Osamu, Uemura Tomoko, Suno Chiyo, Kobayashi Takuya, Iwata So	4. 巻 25
2. 論文標題 Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 570 ~ 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-018-0079-8	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 Jackson Scott M., Ivanova Ekaterina, Calabrese Antonio N., Polyakova Anna, Sharples David J., Shimamura Tatsuro, Brueckner Florian, Cameron Alexander D., Henderson Peter J. F., et al.	4. 巻 1
2. 論文標題 Structure, Substrate Recognition, and Mechanism of the Na ⁺ -Hydantoin Membrane Transport Protein, Mhp1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Biophysics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-642-35943-9_10091-1	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

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shimamura T.
2. 発表標題 Structure of orexin receptor determined using X-ray free electron laser.
3. 学会等名 AsCA 2018/Crystal32 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 津本浩平・前仲勝実（編）、島村達郎ら	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 368
3. 書名 創薬研究のための相互作用解析パーフェクト	

1. 著者名 岩崎憲治（編）、島村達郎ら	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 146
3. 書名 構造生命科学による創薬への挑戦	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	野村 紀通 (Nomura Norimichi) (10314246)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究協力者	林 到ヒョン (Im Dohyun) (50721883)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究協力者	堀田 彰一郎 (Horita Shoichiro) (50770640)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	

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
---------	---------