

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21392

研究課題名（和文）Gタンパク質共役型受容体の動的構造解析への挑戦

研究課題名（英文）Challenges to the structural change analysis of G Protein-Coupled Receptors

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：X線とレーザーの性質を併せ持つX線自由電子レーザー（XFEL）は、タンパク質の構造変化を高分解能で観測するための時分割測定に利用できる。本研究では、リガンドの結合により活性型・不活性型に構造変化するGタンパク質共役型受容体（GPCR）の時分割測定を目指し、様々な条件検討を行った。現在までに、不安定で結晶化が難しいドパミンD2受容体のアポ構造の構造解析に成功した。アポ状態の結晶の分解能が改善できれば、時分割測定により、薬剤結合後のドパミンD2受容体の構造変化の観測が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の多くは、動作することで機能を果たしているため、生命現象を理解するには、タンパク質の動きの過程を解明することが必須である。X線自由電子レーザー（XFEL）は、X線とレーザーの性質を併せ持つ新しいX線で、XFELを利用した時分割測定によりタンパク質の構造変化を高分解能で観測することが可能となった。本研究ではドパミンD2受容体について、時分割測定に必須であるアポ状態の構造解析に成功した。分解能の改善により時分割測定が可能となれば、ドパミンD2受容体の機能上、創薬上の重要な知見が取得できると期待される。

研究成果の概要（英文）：X-ray free electron laser can be used for the time-resolved serial femtosecond crystallography to observe conformational changes of proteins at high resolution. In this study, we challenged to obtain crystals in the apo state for the time-resolved serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors (GPCRs) that undergo conformational changes to active or inactive form upon ligand binding. The crystals of GPCRs in the apo state are essential to observe the dynamic conformational changes by the ligand binding. In this study, the crystals of the apo state of the dopamine D2 receptor was successfully obtained that diffracted to 2.8 angstrom.

研究分野：構造生物学

キーワード：GPCR XFEL

1. 研究開始当初の背景

生命現象で主要な働きを担っているタンパク質の多くは、動作することで機能を果たしている。そのため、生命現象を理解するには、タンパク質の構造変化の過程を解明することが必須である。従来の結晶構造解析では、平衡に達した構造しか解明できず、過渡的な構造を高分解能で解明することは不可能であった。そのため、変異体や基質類似体などを使用することでタンパク質が動く過程の中間体を安定化し、それらの構造から構造変化を考察してきた。

X線自由電子レーザー(XFEL)は、X線とレーザーの性質を併せ持つ新しいX線で、2009年に初めて米国で使用され、日本では2011年にXFEL施設SACLAで最初のXFELが発振された。XFELを利用することで、以下に述べる時分割測定や、結晶を構成する分子のX線損傷の影響を無視できる結晶構造解析が可能となるなど、従来とは異なる新たな構造解析研究が可能となった。

XFELを利用した時分割測定は、タンパク質の触媒反応や構造変化などの動きを連続的なスナップショットとして、高分解能かつフェムト秒に達する時間分解能で解析できる全く新しい解析技術として期待されていた。実際に、光感受性タンパク質や光に反応するケージド化合物が利用できるタンパク質では、光の照射により結晶内のタンパク質の反応を一斉に開始することで時分割測定が可能となった(図1)。一方で、光で動きを同期できないタンパク質では、時分割測定の成功例は発表されていなかった。2012年以降我々は、SACLAにおいてXFELを利用したタンパク質の結晶構造解析を行うための装置や技術を開発してきた。そして、光照射で反応を同期させるタイプの測定については装置が完成し、光感受性タンパク質の時分割測定に応用してきた。また、リガンドと結晶を混合する2液混合系のインジェクターの開発も進み、結晶の取り扱いやすい酵素などでは、時分割測定が行われつつあった。

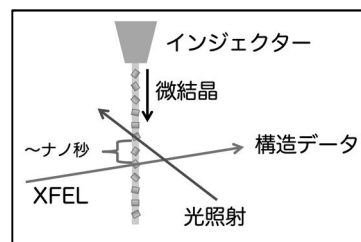


図1. 時分割測定の概要

細胞膜上に存在するGタンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞内のGタンパク質やアレスチンと共役して細胞外からのシグナルを細胞内に伝達し、生命維持に必要な役割を果たす。GPCRの異常は病気に直結するため、医薬品の30%以上がGPCRに作用する。GPCRは、活性化状態と不活性化状態の平衡状態で存在し、作動薬・逆作動薬が結合すると、それぞれ活性化状態・不活性化状態に平衡が偏り、大きな構造変化を起こす(図2)。

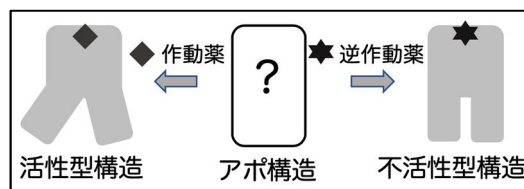


図2. GPCRの構造変化(上が細胞外側)

これまでにGPCRの活性型構造、不活性型構造の構造情報は蓄積され、GPCRが関わる生命現象の理解や合理的な創薬研究に役立ってきた。しかし、GPCRの理解を更に深めるには、これらの平衡に達した後の構造情報だけでは不十分と考えられる。例えばGPCRの作動薬は、100%の活性化を引き起こす完全作動薬と100%未満の活性化を引き起こす部分作動薬に分類できるが(図3)、これまでに発表されている部分作動薬、完全作動薬が結合した構造に違いは見られず、作動薬の薬効の違いの分子機構はわかっていない。この問題を解決するためには、薬が結合した直後の構造変化も調べる必要があると考えられた。

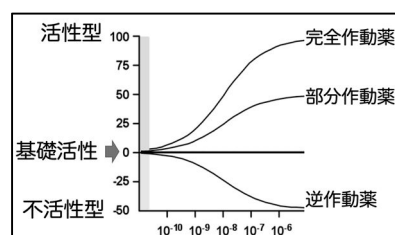


図3. GPCRの活性と薬効

2. 研究の目的

多くのタンパク質は光非感受性であり、XFELを用いた時分割測定を多様なタンパク質で行うためには、光非感受性のタンパク質で時分割測定を行える測定系の確立が必須である。本研究計画の目的は以下の2点である。XFELを使った時分割測定を、光非感受性の膜タンパク質であるGPCRで成功させ、タンパク質の時分割測定を汎用化する。時分割測定により、GPCRに各種の薬が結合した直後の構造変化を観測する。そして、薬剤の結合様式や、構造変化の違いを精査することで、GPCRの細胞外側に結合した薬はどのように細胞内側の構造変化を誘起するのかの解明や、GPCRを標的とする薬の合理的な開発に役立てる。

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。GPCR の安定化には、これまでの研究から主に 2 通りのやり方があり、本研究でも同様に、それら 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。GPCR は、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安定化できることが知られており、本研究でも挿入する水溶性タンパク質の種類や挿入位置の検討を行った。種類としては、従来の研究で使われた T4 リゾチーム (T4L) やアポシトクロム b562 (bRIL)、glycogen synthase from *Pyrococcus abyssi* (PGS) などの他、使用例の無い水溶性タンパク質、新たに作製した高安定型水溶性タンパク質も試した。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。構造解析は X 線結晶構造解析の手法を用いた。

4. 研究成果

GPCR は、薬剤を結合させないと安定性が低下するため、GPCR の立体構造はアゴニストやインバースアゴニストを結合させた状態で決定されてきた。一方で、GPCR に薬剤が結合した時の構造変化を観測するためには、薬剤が結合していない状態での結晶化・立体構造の解析が必要になる。本研究では「研究の方法」の項で示した安定化の検討により、挿入タンパク質として新たに作製した高安定型水溶性タンパク質を利用し、さらに立体構造認識抗体を結合させることで、GPCR の一種であるドパミン D2 受容体について、薬剤が結合していない構造 (アポ構造) を決定できた。分解能は 2.8Å 程度で、膜タンパク質であり不安定な GPCR の構造としては良好であった。しかし、ナノ秒からミリ秒での僅かな構造変化を追跡する時分割測定にはより高分解能のデータが必要となるため、現状では XFEL を利用した時分割測定を行うことはできなかった。SPring-8 でシンクロトロン X 線を利用して、ドパミン D2 受容体のアポ構造の結晶から取得したデータを構造解析した結果を以下に示す。まず全体構造は図 4 のようになった。抗体の Fab 断片 (ピンク色) がドパミン D2 受容体 (緑色) の細胞外側に結合し、細胞内第 3 ループを置換した高安定型水溶性タンパク質 (オレンジ色) は細胞質側に存在した。ドパミン D2 受容体を含むアミン受容体は、リガンド分子内のアミンの正電荷と相互作用するため、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸残基を保存している。ドパミン D2 受容体では Asp114 がこのアスパラギン酸に相当する。Asp114 付近の電子密度マップを図 5 に示す。図 5 から分かるように、Asp114 付近には薬剤に相当する電子密度が観測されず、この構造がアポ構造であることを示唆した。

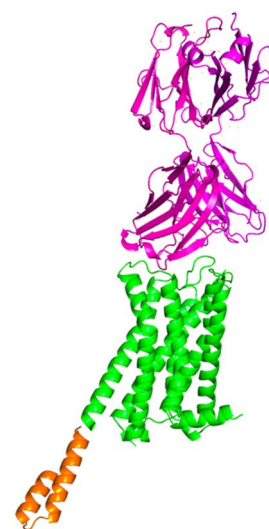


図 4. ドパミン D2 受容体のアポ構造

本研究では、情報量が限られている GPCR のアポ構造を決定できた。ドパミン D2 受容体は、アゴニストやインバースアゴニストが結合した構造は既に発表されており、新たにアポ構造の構造情報も利用できるなったことで、ドパミン D2 受容体の活性化や不活性化時の構造変化の解明に役立つと考えられる。今後は受容体のさらなる安定化や結晶化条件の検討により分解能を改善し、時分割測定を行いたいと考えている。

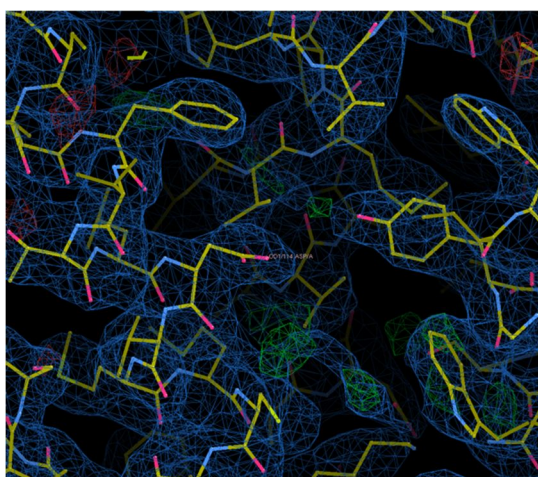


図 5. 薬剤の結合に重要な Asp114 付近の電子密度マップ

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jaunet-Lahary Titouan, Shimamura Tatsuro, 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 Toyomoto Masayasu, Inoue Asuka, Iida Kei, Denawa Masatsugu, Kii Isao, Ngako Kadji Francois Marie, Kishi Takayuki, Im Dohyun, Shimamura Tatsuro, Onogi Hiroshi, Yoshida Suguru, Iwata So, Aoki Junken, Hosoya Takamitsu, Hagiwara Masatoshi	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 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 537-579
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 Oda Kazumasa, 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 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.62389	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 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 1-11
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 津本浩平、前仲勝実、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	

〔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)	

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