

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02414

研究課題名（和文）新規抗精神病薬の開発に役立てることを目指したアミン受容体の構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of amine receptors for the development of new antipsychotic drugs.

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は、活性型・不活性型の平衡状態で存在し、リガンドが結合しなくても一定の基礎活性を示す。Gタンパク質共役型受容体に逆作動薬が結合すると、不活性型に平衡が偏る。逆作動薬には強いものから弱いものまで様々な効力のもが存在するが、そのような効力の違いと立体構造の関係は不明である。本研究では、生体アミン受容体の一種であるセロトニン受容体について、弱い逆作動薬との複合体構造を決定した。その結果、この逆作動薬が結合した状態では、不活性型構造よりも活性型構造に近い構造をとっていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

少なくとも一部のGタンパク質共役型受容体では、完全逆作動薬や部分逆作動薬のように、結合する逆作動薬の効力の強弱により複数の不活性型構造が存在することが示唆されている。本研究の成果は、逆作動薬の強弱がGタンパク質共役型受容体の構造の違いに由来する可能性を示唆し、Gタンパク質共役型受容体の機能の理解などに貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：G protein-coupled receptors exist in equilibrium between active and inactive forms and exhibit a certain basic activity even without ligand binding. Inverse agonists exist in a wide range of potencies, from strong to weak, but the relationship between such differences in potency and structure is unknown. In this study, we determined the complex structure of the serotonin receptor with a weak inverse agonist. The results revealed that in the bound state of this inverse agonist, the structure is closer to the active conformation than to the inactive conformation.

研究分野：構造生物学

キーワード：受容体

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体は、活性型・不活性型の平衡状態で存在し、リガンドが結合しなくても一定の基礎活性を示す(図1)。G タンパク質共役型受容体に逆作用薬が結合すると、不活性型に平衡が偏る。逆作用薬は、基礎活性を 100%抑制して G タンパク質共役型受容体を完全に不活性化する完全逆作用薬と、100%未満の不活性化をする部分逆作用薬に分類される(図1)。

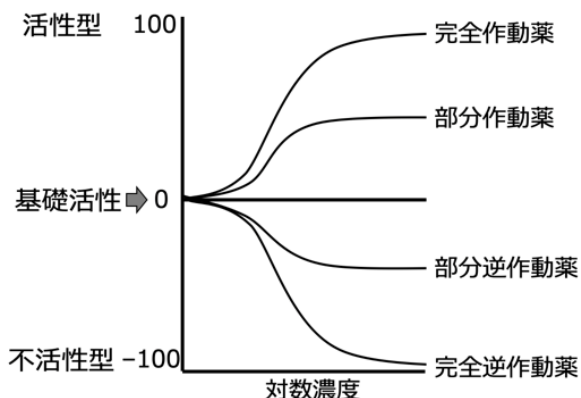


図1. Gタンパク質共役型受容体の各種リガンドと効力

最近の研究[eLife. 2020 など]によると、ドパミン D₂受容体など少なくとも一部の G タンパク質

共役型受容体では、完全逆作用薬や部分逆作用薬のように、結合する逆作用薬の効力の強弱により複数の不活性型構造が存在すると示唆されている。しかしこれらの G タンパク質共役型受容体において、効力が異なる逆作用薬が結合した不活性型構造を比較した例は無く、逆作用薬の効力の違いを説明するメカニズムの解明の妨げとなっている。

統合失調症は人口の1%が罹患する頻度の高い脳の病気である。統合失調症の薬(抗精神病薬)として現在主に使われるものは、ドパミン D₂受容体とセロトニン2A 受容体の完全逆作用薬である。しかしこれらの抗精神病薬では、ドパミン D₂受容体の

	副作用①	副作用②
症状	運動障害	口渇、代謝異常
原因	D ₂ Rの過剰な不活性化	低い受容体選択性
解決策	D ₂ Rの部分作用薬の開発	高い受容体選択性の抗精神病薬の開発

図2. 抗精神病薬の主な2つの副作用。

D₂R：ドパミンD₂受容体

過剰な不活性化により生じる副作用①(図2)と、類縁の G タンパク質共役型受容体に結合し不活性化してしまうことで生じる副作用②(図2)が主な問題となっている。申請者は、ドパミン D₂受容体[Nat Commun. 2020]とセロトニン2A 受容体[Nat Struct Mol Biol. 2019]について、完全逆作用薬との複合体構造を決定してきた。また副作用②に関連する類縁の G タンパク質共役型受容体として、ヒスタミン H₁受容体と完全逆作用薬の複合体構造[Nature. 2011]も決定した。これらの結果から、受容体選択性の改良に利用可能な受容体固有のポケットの存在を明らかにし、副作用②の軽減に役立つ構造情報を取得した。副作用①については、セロトニン2A 受容体には完全逆作用薬として、ドパミン D₂受容体には部分逆作用薬として作用する化合物が、副作用のより少ない抗精神病薬になると考えられた。しかし、部分逆作用薬が結合したドパミン D₂受容体の構造解析例が無く、適切な効力を持つドパミン D₂受容体の部分逆作用薬の効率的な開発を困難にしていた。また、オピオイド受容体やアンギオテンシン受容体などの逆作用薬のように、効力の程度により効果と副作用が変わる薬の例は他にも存在するが、それらの違いがどのような構造上の違いに基づくのかの知見は得られていなかった。

2. 研究の目的

G タンパク質共役型受容体において、完全逆作動薬が結合した場合と部分逆作動薬が結合した場合に立体構造はどのように異なり、また、立体構造の違いは逆作動薬の効力の違いにどのように影響するのかを解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

G タンパク質共役型受容体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。これまでの G タンパク質共役型受容体の構造解析の経験を活かし、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 G タンパク質共役型受容体は安定化できること、また、G タンパク質共役型受容体の不活性型構造は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。挿入する水溶性タンパク質としては、従来の G タンパク質共役型受容体の安定化で利用されたものや、新たに開発した安定性の高い変異型タンパク質などを利用した。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 G タンパク質共役型受容体をマウスに免疫し、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。以上に加え、各種の薬剤を結合させることで平衡が偏り、構造を安定化できる。構造解析を試みた G タンパク質共役型受容体はドパミン D₂受容体やセロトニン2A 受容体などが含まれる生体アミン受容体の中で、効力に違いのある逆作動薬が知られているものを選択した。構造解析は、X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を利用した単粒子解析を検討したが、構造解析に成功したのは X 線結晶構造解析であった。

4. 研究成果

ドパミン D₂受容体やセロトニン2A 受容体などの生体アミン受容体に、これまでに複合体構造が発表されている逆作動薬とは効力が異なる逆作動薬が結合した複合体の構造解析を試みた。そのなかで、セロトニン1B 受容体に逆作動薬 G が結合した複合体の構造解析の結果について記述する。セロトニン1B 受容体は、抗精神病薬が結合し、図2の副作用②に関連

する G タンパク質共役型受容体である。逆作動薬 G は、セロトニン1B 受容体の部分逆作動薬とされている。セロトニン1B 受容体については、安定化のために *Pyrococcus* glycogen synthase (PGS) を挿入した場合に良好な単分散性を示した(図3)。このコンストラクトを用いて、キュービックフェーズ法を用いて結晶化条件を検討したところ、図4のような微結晶を取得することに成功した。これらの結晶に X 線を照射して反射データを取得したところ、分解能 3.2 Å で構造を決定することに成功した。構造を解析し、既に発表されているセロトニン1B 受容体と逆作動薬との複合体の構造と比較すると、いくつか興味深い点が見つかった。生体アミン受容体は、リガン

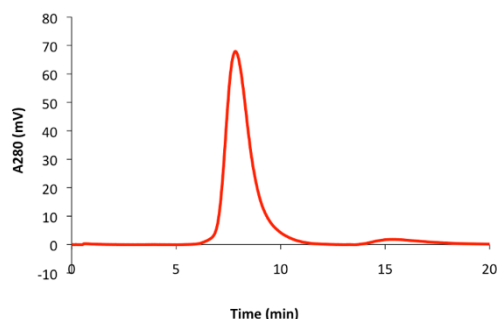


図3. セロトニン1B受容体-PGSの単分散性。

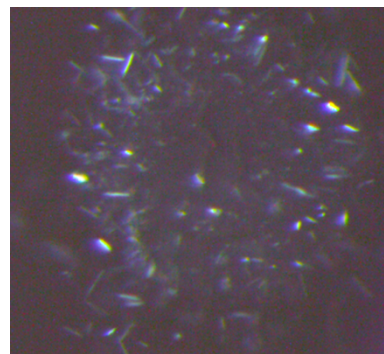


図4. セロトニン1B受容体の結晶(暗視野)。

ド結合部位の底部に Pro-Ile-Phe(PIF)モチーフが存在し、活性化に関係している。すでに発表された構造では、逆作動薬が PIF モチーフと相互作用し、構造を不活性型に固定している。これに対し、本研究で決定した構造では、逆作動薬は PIF モチーフが存在する底の方には結合しておらず、作動薬の結合様式に似た構造となっていた。一方で、細胞内側の G タンパク質と結合する部位については、すでに発表された逆作動薬との複合体構造と比較して、膜貫通ヘリックス6が内側に入り込み、G タンパク質の結合を阻害する構造となっていた。さらに構造解析を進め、構造と逆作動薬の効果との関係を解明したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0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 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.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 -

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 医学の歩み	6. 最初と最後の頁 573-578
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 島村達郎	4. 巻 791
2. 論文標題 尿管結石の形成を防ぐシュウ酸輸送体分子のX線結晶構造解析	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Isotope News	6. 最初と最後の頁 11-13
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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