

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02619

研究課題名（和文）Gタンパク質共役型受容体b2ARのシグナル選択性を制御する動的構造基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the dynamic structural basis controlling signal selectivity of the G protein-coupled receptor b2AR

研究代表者

今井 駿輔（Imai, Shunsuke）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：20894413

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、b2ARの動的構造をバランスリガンド結合状態とバイアスリガンド結合状態で比較することにより、GPCRのシグナル選択性の構造基盤の解明に取り組んだ。バランスリガンド isoproterenolと、バイアスリガンド isoetharineについてNMR解析を行った結果、isoetharineのエチル基とb2ARの細胞外側ループ上の残基F193の立体的な衝突が、TM3細胞内側のA134、TM5細胞内側のA226周辺の構造変化を誘起することが示された。以上の成果から、バイアスリガンド結合時に観測されるこのTM3、TM5細胞内側の構造変化がシグナル選択性の構造的要因であることを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCRのシグナル選択性は、薬の主作用と副作用のバランスを規定する可能性があるため、その機構の理解と制御は副作用を抑えたGPCR薬の開発において重要な課題である。本研究では、isoproterenolにエチル基が付加した isoetharineが、なぜisoproterenolにはないシグナル選択性を示すのかを解析し、その違いがTM3やTM5の細胞内側の残基周辺の構造変化を誘起することを示した。この成果は、この領域の構造変化に着目することで既知化合物より強いシグナル選択性を示す新規バイアスリガンドを開発できる可能性を示した点において学術的および社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to unravel the structural basis governing signal selectivity in GPCRs, focusing on b2AR. We compared the dynamic structures of b2AR in the balanced ligand-bound state and the biased ligand-bound state to shed light on the underlying mechanisms. Our approach involved subjecting the balanced ligand isoproterenol and the biased ligand isoetharine to NMR analysis. The results revealed that the ethyl group of isoetharine engages in a steric clash with residue F193 on the extracellular loop of b2AR. This collision alters the structure near A134 on the intracellular side of TM3 and A226 on the intracellular side of TM5. Based on these findings, we propose that the intracellular structural changes observed in the presence of the biased ligand play a role in determining signal selectivity. This discovery provides new insights into the complex interplay between ligand binding and the resulting conformational changes that shape the signaling outcomes of GPCRs.

研究分野：構造生物学

キーワード：GPCR 溶液NMR シグナル選択性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

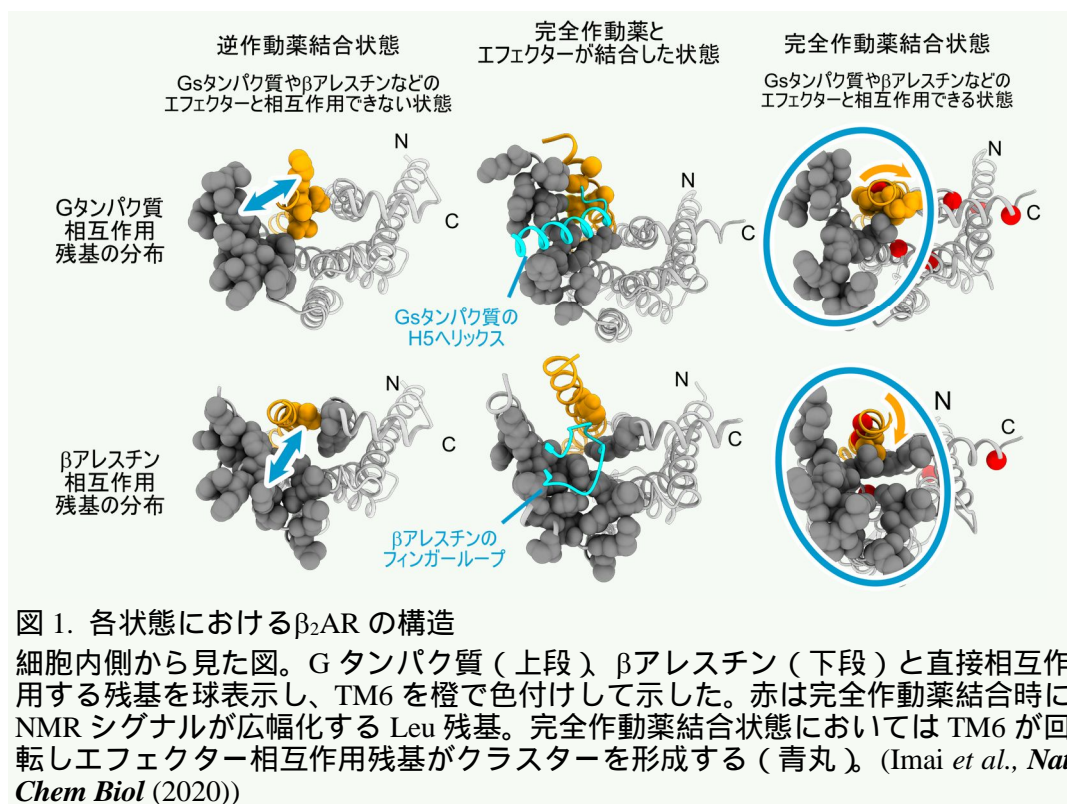
### 1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、神経伝達物質やホルモンなどの細胞外刺激を受容して活性化すると、細胞内で三量体 G タンパク質と相互作用したり、GPCR キナーゼ (GRK) によるリン酸化を受けた後にβアレスチンと相互作用したりすることによって、種々の細胞内シグナルを様々なバランスで誘起する、7 回膜貫通型のタンパク質である。GPCR は様々な生理応答とその制御を担い、現在承認されている医薬品の 30% 以上の結合標的でもあるため、その機能発現機構を理解することは、生物学的にも薬理的にも重要な課題である。

GPCR には、リガンド非結合状態でも弱く細胞内シグナルを誘起する活性があり、これは基礎活性と呼ばれる。また、GPCR のリガンドは、その薬効度によって細胞内シグナルを最大限に誘起する完全作動薬、弱く活性化する部分作動薬、他のリガンドと競合的に結合するが活性を変化させない拮抗薬、シグナル伝達を基礎活性よりも抑制する逆作動薬に分類される。さらに、G タンパク質を介するシグナル経路とβアレスチンを介するシグナル経路のうち片方を比較的選択的に誘起するリガンド (バイアスリガンド) も存在することが知られている。GPCR の有するような特徴は、この分子がリガンド結合に伴って不活性型構造から活性型構造に変化するという単純な機構で機能しているのではないことを示しているが、その詳細には未だ不明な点が多かった。実際、それまでに報告された GPCR の X 線結晶構造やクライオ電子顕微鏡構造は、リガンドや細胞内エフェクターとの相互作用に関する詳細な情報を与えたものの、このような静的スナップショットの羅列では、GPCR の機能を完全に理解するには至っていなかった。この要因は、GPCR を活性化させる作動薬が結合した状態における既知の静的構造が、運動性を抑制すると同時に活性も失わせるような熱安定性変異を導入するなどして安定化した条件下でのみ解析されており、作動薬結合により活性化した GPCR が種々の細胞内エフェクターと相互作用しその機能を発揮しようとしている状態における描像が不明である点にあった。

申請者は研究開始当初の時点において、GPCR が機能している状態をそのまま (*in situ* で) 解析できる溶液 NMR 法を用いて、時間軸の要素を考慮した立体構造 (動的構造) の観点から、機能発現機構の解析を行っていた (Shiraishi *et al.*, *Nat Commun* (2018), Mizumura *et al.*, *Sci Adv* (2020))。特に、GPCR の一種であるβ<sub>2</sub> アドレナリン受容体 (β<sub>2</sub>AR) が完全作動薬と結合した動的構造を、活性を失わせるような熱安定性変異を導入せずに可視化することに成功していた (Imai *et al.*, *Nat Chem Biol* (2020))。得られた構造は、6 番目の膜貫通ヘリックス TM6 の中央に存在する保存性の高い Pro 残基よりも細胞内側が閉じて 90 度回転しているという、既知の X 線結晶構造やクライオ電子顕微鏡構造には見られない全く新しいものであった (図 1)。この構造から、TM6 の回転によって Gs タンパク質やβアレスチンとの相互作用残基がクラスターを形成することが明らかとなり、活性化した GPCR が細胞内シグナルを誘起する機構の構造基盤が示された。また、バランス完全作動薬結合状態のβ<sub>2</sub>AR において、膜貫通ヘリックス同士の界面のうち特に細胞内側の残基の NMR シグナルが顕著に広幅化していることもわかった (図 1)。このことは、この領域が活性の異なる複数の構造間を化学交換していることを示しており、この動的構造平衡こそが、GPCR が多様な細胞内エフェクターと様々な親和性にて相互作用し細胞内シグナルを誘起する機構の本質であることを示唆する。上述したように、GPCR は G タンパク質を介したシグナル経路とβアレスチンを介したシグナル経路の両方を誘起するが、G タンパク質が結合した状態とβアレスチンが結合した状態の GPCR の静的立体構造には明確な差がなく、これらの構造が

らでは細胞内シグナルの選択性の基盤を理解することはできなかった。このシグナル選択性を制御する新規 GPCR 標的薬を合理的に設計するためには、バイアスリガンド結合時の GPCR の動的構造平衡が、両シグナル経路を同程度に活性化するバランスリガンド結合時と比較してなぜ、どのように異なっているかを解明する必要があった。



## 2. 研究の目的

本研究では、 $\beta_2$ AR のシグナル選択性を規定する動的構造平衡を同定することを通じてその構造基盤を理解し、それを制御するバイアスリガンドを合理的に設計するための方針を示すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 各リガンド結合状態における $\beta_2$ ARの活性の比較

バランスリガンド結合状態とバイアスリガンド結合状態で $\beta_2$ ARのGタンパク質活性化能が異なることを、GTPターンオーバーアッセイにより評価する。

### (2) 各リガンド結合状態におけるLeu残基由来NMRシグナルの帰属と解析

$\beta_2$ ARの分子全体に広く分布し、構造と運動性のプローブとなるLeu残基のアミドシグナルに着目し、バイアスリガンド結合状態の構造や運動性を、バランスリガンド結合状態と比較する。この解析のため、バイアスリガンド結合状態の $\beta_2$ ARのLeuアミドシグナルの帰属を行う。必要に応じてLeuを1残基ずつ他のアミノ酸に置換した28種類の変異体ライブラリーを用い、野生型とのスペクトルの比較によりシグナルの帰属を得る。

さらに、バランスリガンド結合状態とバイアスリガンド結合状態での各シグナルの化学シフ

ト値や線幅を比較し、必要であれば各種運動性解析を行って、バイアスリガンド結合状態におけるシグナル選択性を説明する構造や運動性の差異を検出する。

### (3) リガンドが $\beta_2$ ARの構造を変化させる機構の解析

バランスリガンド結合状態とバイアスリガンド結合状態で見られた構造または運動性の差異が、シグナル選択性に関わることを示すため、2)で明らかとなった指標を再現するような変異体を設計、実証することにより $\beta_2$ ARのシグナル選択性の構造機構を実証する。

## 4. 研究成果

### (1) 各リガンド結合状態における $\beta_2$ ARの活性の比較

バイアスリガンド結合状態とバランスリガンド結合状態における動的構造の違いが、細胞内シグナルを誘起する活性とどのように対応しているのかの相関を定量的に解析するため、各リガンド結合状態におけるシグナル伝達活性のアッセイを行った。GTP ターンオーバーアッセイの結果、isoetharine 結合状態の $\beta_2$ ARのGタンパク質活性化能はisoproterenol 結合状態と比較して88%に低下することが定量的に示された。

### (2) 各リガンド結合状態におけるLeu残基由来NMRシグナルの帰属と解析

研究開始時において、Leuを1残基ずつ別のアミノ酸に置換した28種類の変異体を調製し、得られたスペクトルを変異導入前の野生型と比較することによって、バランスリガンド結合状態のNMRシグナルの帰属が得られていた。本研究において、バイアスリガンド結合状態のLeu標識 $\beta_2$ ARの $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY スペクトルを測定し、バランスリガンド結合状態と比較することによって、バイアスリガンド結合状態のNMRシグナルを全て帰属することができた。

バランスリガンド結合状態とバイアスリガンド結合状態におけるNMRシグナルの線幅を比較した結果、観測されるLeu由来シグナルに有意な線幅の差はなかったことから、両状態で $\mu\text{s}$ -msタイムスケールの運動性に顕著な差はないことが示唆された。一方で、両状態間においてL163, L167, L212, L287などのリガンド結合部近傍の残基に化学シフト変化があることが明らかとなった。さらに、アラニンメチル選択的 $^{13}\text{C}$ 標識 $\beta_2$ ARを調製し、isoetharine 結合状態およびisoproterenol 結合状態におけるメチルTROSYスペクトルを測定し、観測されたシグナルを帰属した。両者の比較の結果、A134やA226などの細胞内側の残基に化学シフト差が観測され、リガンドの違いが細胞内側に伝播していることが示された。

### (3) リガンドが $\beta_2$ ARの構造を変化させる機構の解析

バランスリガンド結合状態とバイアスリガンド結合状態で運動性に顕著な差が見られなかった一方で、リガンド結合部位周辺および細胞内側の残基に化学シフト変化が見られたことから、両リガンド結合状態における立体構造の違いがシグナル選択性の違いの要因であることが示唆された。

バランスリガンドであるisoproterenolと化学構造が類似したadrenaline 結合状態の $\beta_2$ ARとnanobodyの複合体の結晶構造から、バランスリガンドであるisoetharineにあってisoproterenolにはないエチル基は、 $\beta_2$ ARの細胞外ループに存在するF193と立体的に衝突することが示唆された。F193が $\beta_2$ ARのシグナル選択性に関わる可能性を検証するため、F193をより嵩高いTrpに置換した変異体を調製し、GTP ターンオーバーアッセイとNMR解析を行った。その結果、F193W

変異体では、isoproterenol 結合状態においても、野生型の isoetharine 結合状態と同程度の G タンパク質シグナル活性しか示さないことが明らかとなった。NMR 解析の結果、野生型において isoproterenol 結合状態と isoetharine 結合状態で化学シフト値の異なる細胞内側の残基 A134 と A226 について、F193W 変異体では、isoproterenol 結合状態における A134 と A226 のシグナルの化学シフト値が、野生型の isoetharine 結合状態における A134, A226 の化学シフト値にそれぞれ近かったことから、F193 と isoetharine のエチル基の立体的な衝突が、細胞内側の構造変化につながることを示された。

#### (4) $\mu$ オピオイド受容体への展開

当初計画以上の展開として、本研究により確立された GPCR の動的構造による活性制御機構解析に関わる知見を、鎮痛作用に関わる GPCR の 1 種である  $\mu$ オピオイド受容体(MOR)に展開した。その結果、MOR が 3 構造間の平衡にあること、各構造の存在比が結合するリガンドにより変化し薬効度が規定されていることが明らかとなった。さらに、MOR の G タンパク質活性化能を完全作動薬が結合した状態よりも更に上昇させるアロステリックモジュレータが結合すると、3 構造のうち最も相対活性の高いものの存在比が増大することを見出し、アロステリックモジュレータによって完全作動薬単独では達成出来ない高い活性が得られる機構を明らかにした。以上の成果は *Proc Natl Acad Sci USA* 誌に掲載された(Kaneko, Imai, ..., Shimada. *Proc Natl Acad Sci USA* (2022) 119:e2121918119)。さらに、このアロステリックモジュレータが結合した状態の MOR と G タンパク質の複合体のクライオ電顕解析を行い、アロステリックモジュレータが TM3,4,5 の形成する脂質膜に面したポケットに結合すること、これにより MOR 内部の R167 と Y254 の動的な相互作用が変化することによって TM6 の閉じにくさが変化することが、アロステリックモジュレータによる動的構造平衡の変調の構造基盤であることを示した。この成果は、*Nat Commun* 誌に掲載された(Kaneko, Imai, ..., Shimada. *Nat Commun* (2024) 15:3544)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Kaneko Shun, Imai Shunsuke, Asao Nobuaki, Kofuku Yutaka, Ueda Takumi, Shimada Ichio	4. 巻 119
2. 論文標題 Activation mechanism of the $\mu$ -opioid receptor by an allosteric modulator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2121918119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2121918119	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 Kaneko Shun, Imai Shunsuke, Uchikubo-Kamo Tomomi, Hisano Tamao, Asao Nobuaki, Shirouzu Mikako, Shimada Ichio	4. 巻 15
2. 論文標題 Structural and dynamic insights into the activation of the $\mu$ -opioid receptor by an allosteric modulator	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-47792-6	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 Tajiri Michiko, Imai Shunsuke, Konuma Tsuyoshi, Shimamoto Keiko, Shimada Ichio, Akashi Satoko	4. 巻 8
2. 論文標題 Evaluation of Drug Responses to Human $\alpha$ AR Using Native Mass Spectrometry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 24544 ~ 24551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.3c02737	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 UEDA Takumi, KOFUKU Yutaka, TAKEUCHI Koh, IMAI Shunsuke, SHIRAIISHI Yutaro, SHIMADA Ichio	4. 巻 64
2. 論文標題 Function-Related Conformational Dynamics of GPCRs Revealed by Solution NMR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nihon Kessho Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 279 ~ 284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5940/jcrsj.64.279	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 Takeuchi Koh, Kofuku Yutaka, Imai Shunsuke, Ueda Takumi, Tokunaga Yuji, Toyama Yuki, Shiraishi Yutaro, Shimada Ichio	4. 巻 11
2. 論文標題 Function-Related Dynamics in Multi-Spanning Helical Membrane Proteins Revealed by Solution NMR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 604 ~ 604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes11080604	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 Ueda Takumi, Imai Shunsuke, Shimada Ichio	4. 巻 336
2. 論文標題 Function-related dynamics of GPCRs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 107164 ~ 107164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmr.2022.107164	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 田尻 道子、今井 駿輔、小沼 剛、島本 啓子、嶋田 一夫、明石 知子
2. 発表標題 Gタンパク質共役受容体 (GPCR) の作動薬・拮抗薬をスクリーニングするネイティブ質量分析
3. 学会等名 第70回質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunsuke Imai, Tomoki Yokomizo, Yutaka Kofuku, Yutaro Shiraishi, Takumi Ueda, Ichio Shimada
2. 発表標題 Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of b2-adrenoreceptor
3. 学会等名 29th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shun Kaneko, Shunsuke Imai, Nobuaki Asao, Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Ichio Shimada
2. 発表標題 Activation mechanism of the $\mu$ -opioid receptor by an allosteric modulator
3. 学会等名 the 29th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunsuke Imai
2. 発表標題 Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of beta2-adrenoreceptor
3. 学会等名 The 7th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子 舜、今井 駿輔、浅尾 信央、幸福 裕、上田 卓見、嶋田 一夫
2. 発表標題 ミューオピオイド受容体のアロステリックモジュレーターによる活性化機構の解明
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井 駿輔、横溝 智貴、幸福 裕、白石 勇太郎、上田 卓見、嶋田 一夫
2. 発表標題 Gタンパク質共役型受容体b2ARのリガンド依存的活性化機構
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 田尻 道子、今井 駿輔、小沼 剛、島本 啓子、嶋田 一夫、明石 知子
2. 発表標題 ネイティブ質量分析によるGタンパク質共役受容体 (GPCR) の作動薬・拮抗薬スクリーニング
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunsuke Imai
2. 発表標題 Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of beta2-adrenoreceptor
3. 学会等名 IPR x RIKEN (BDR) Symposium 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Imai S, Yokomizo T, Kofuku Y, Shiraishi Y, Ueda T, Shimada I.
2. 発表標題 Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of b2-adrenoreceptor.
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference, 9th Asia-Pacific NMR Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------