

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05037
研究課題名：生体環境でのGPCRの構造ダイナミクス
研究代表者氏名（ローマ字）：濡木 理（NUREKI Osamu）
所属研究機関・部局・職：東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授
研究者番号：10272460

研究の概要：

GPCRは7回膜貫通型の蛋白質であり化学物質など外界からの刺激を受容し細胞内にシグナルを伝達する。本研究では、生体膜環境に近い状態に再構成したGPCRの構造をクライオ電子顕微鏡法によって決定し、さらにクライオ蛍光顕微鏡やトモグラフィーを駆使することで、GPCRがどのように細胞にシグナルを伝えているのかを生々の状態で可視化する。構造情報を元にGPCRの活性を操る新規薬剤の開発につなげる。

研究分野：構造生物学 クライオ電子顕微鏡法 創薬

キーワード：GPCR シグナル伝達 膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

生物は化学物質など外界からの刺激に応じて細胞内で酵素反応などを惹起し、環境に適応してきた。これらの刺激を受容し細胞内にシグナルを伝達する上で重要な役割を果たすが、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）である。直近20年の構造生物学研究により、GPCRが多様なリガンドを選択的に認識する機構、活性化するメカニズム、Gタンパク質と共役する機構について構造基盤が次々に解明され、GPCRが担う生理現象への理解や関連する疾患への創薬・臨床応用は飛躍的に進歩した。一連の研究ではGPCRを界面活性剤で可溶化することで精製・構造解析を達成してきたが、生体内と異なる物理化学的条件で再構成されていたため構造が生体内での挙動を捉えていない可能性が長らく問題視されている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が着目しているGPCRに関して、Cryo-EMを含む多様な手法で、動的ダイナミクスも考慮した構造機能研究を進める。さらに界面活性剤でGPCRを可溶化して構造解析する従来の手法に加えて、膜骨格タンパク質（MSP）およびスチレンマレイン酸コポリマー（SMALP）を用いてより生体膜に近い物理化学的環境で再構成する脂質ナノディスク法をGPCRに適用する。具体的には、脂質ナノディスク法で再構成したGPCRシグナル伝達複合体およびGPCRオリゴマーの構造解析を通じて、脂質・pH・イオンがGPCRのシグナル伝達を制御するメカニズムをin vitroで解明する。さらに本研究ではGPCRを標識した細胞に研究対象を拡張することで、GPCRの構造ダイナミクスの解明をめざす。

3. 研究の方法

クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によってGPCR-G蛋白質複合体の構造機能解析を行う。簡便に脂質ナノディスクに再構成する技術を開発し、生体膜環境に近い状態のGPCR構造を得る。クライオ蛍光顕微鏡技術などを開発し、CLEMによってin situでのGPCRの高次構造解析を行う。

4. これまでの成果

GPCR-Gタンパク質複合体の構造機能解析により、リガンドと受容体の相互作用や活性化機構が明らかになってきている。PTH1R、β3アドレナリン受容体、メラトニン受容体MT1、LPA1、LysoPS受容体などの研究により、リガンドの結合様式やシグナル伝達の選択性などが明らかになり、副作用の少ない新規薬剤の開発につながる事が期待されている。

また本研究では、以下の3つの要素技術を開発した。

- ・ ナノディスク再構成法の開発: His8抗体を用いて高純度の膜タンパク質を精製するシステムを構築し、迅速かつ高効率にナノディスク化された膜タンパク質を精製するプロトコルを確立した。
- ・ Fusion G systemの開発: GPCRとG蛋白質の複合体形成能が低いGPCRに対して、複合体を安定化しCryo-EMによる構造解析を可能とする新規手法を開発した。
- ・ クライオ蛍光顕微鏡の開発: 機械的安定性をオンゲストロームレベルに向上させ、走査範囲を広げた新規クライオ蛍光顕微鏡を開発し、シームレスにつなげるシステムを構築中である。

5. 今後の計画

Cryo-EMを用いてGPCRの構造機能解析を行い、ナノディスク環境での構造を解析する。エンドソーム中でのPTH1Rの構造基盤を明らかにし、創薬基盤の拡充を目指す。Cryo-EMとCryo-ETを用いて嗅覚受容体の構造解析を行い、匂い分子受容の分子基盤を明らかにする。また、嗅覚受容体や共に働くチャンネルの

局在や形態を解析する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Phototrophy by antenna-containing rhodopsin pumps in aquatic environments.
Chazan A, Das I, Fujiwara T, Murakoshi S, Rozenberg A, Molina-Márquez A, Sano FK, Tanaka T, Gómez-Villegas P, Larom S, Pushkarev A, Malakar P, Hasegawa M, Tsukamoto Y, Ishizuka T, Konno M, Nagata T, Mizuno Y, Katayama K, Abe-Yoshizumi R, Ruhman S, Inoue K, Kandori H, León R, Shihoya W, Yoshizawa S, Sheves M, **Nureki O***, Béjà O*. Nature. 2023, 615, 535-540, 査読あり
2. Structure of the active G_i-coupled human lysophosphatidic acid receptor 1 complexed with a potent agonist.
Akasaka H, Tanaka T, Sano FK, Matsuzaki Y, Shihoya W, **Nureki O***. Nat Commun. 2022, 13, 5417, 査読あり
3. Endogenous ligand recognition and structural transition of a human PTH receptor.
Kobayashi K, Kawakami K, Kusakizako T, Miyauchi H, Tomita A, Kobayashi K, Shihoya W, Yamashita K, Nishizawa T, Kato HE, **Inoue A***, **Nureki O***, Mol Cell. 2022, 82, 3468-3483, 査読あり
4. Structure of the Dicer-2-R2D2 heterodimer bound to a small RNA duplex.
Yamaguchi S, Naganuma M, Nishizawa T, Kusakizako T, Tomari Y, Nishimasu H, **Nureki O***. Nature. 2022, 607, 393-398, 査読あり
5. Cryo-EM structures of the β₃ adrenergic receptor bound to solabegron and isoproterenol.
Nureki I, Kobayashi K, Tanaka T, Demura K, Inoue A, Shihoya W, **Nureki O***, Biochem Biophys Res Commun. 2022, 611, 158-164, 査読あり
6. Lateral access mechanism of LPA receptor probed by molecular dynamics simulation.
Suenaga R, Takemoto M, **Inoue A**, Ishitani R*, **Nureki O***, PLoS One. 2022, 17, 査読あり
7. Structural basis of gating modulation of Kv4 channel complexes.
Kise Y, Kasuya G, Okamoto HH, Yamanouchi D, Kobayashi K, Kusakizako T, Nishizawa T, Nakajo K., **Nureki O***. Nature. 2021, 599, 158-164, 査読あり
8. Cryo-EM structure of the human MT₁-G_i signaling complex.
Okamoto HH, Miyauchi H, **Inoue A**, Raimondi F, Tsujimoto H, Kusakizako T, Shihoya W, Yamashita K, Suno R, Nomura N, Kobayashi T, Iwata S, Nishizawa T, **Nureki O***, Nat Struct Mol Biol. 2021, 28, 694-701, 査読あり
9. Cryo-EM structure of the β₃-adrenergic receptor reveals the molecular basis of subtype selectivity.
Nagiri C, Kobayashi K, Tomita A, Kato M, Kobayashi K, Yamashita K, Nishizawa T, **Inoue A***, Shihoya W*, **Nureki O***. Mol Cell. 2021, 81, 3205-3215, 査読あり

<受賞>

第26回 慶応医学賞

第26回 安藤百福賞大賞

7. ホームページ等

<http://www.nurekilab.net/>