

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19360

研究課題名（和文）オピオイドの副作用の要因となるヘテロマー化受容体のシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of the signal transduction mechanism of hetero-dimerized opioid receptors that cause side effects of opioids

研究代表者

小林 拓也（KOBAYASHI, Takuya）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20311730

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：GRPRに不活性型固定変異を導入して熱安定性をあげ、哺乳類培養細胞株Expi293とバキュロウイルスを用いた大量発現系で単分散性の高いGRPRの精製を行った。精製したGRPRは人工脂質二重膜（プロテオリポソーム）に再構築して抗原とし、マウスに免疫した。得られた抗体から変性したGRPRには反応しない立体構造認識抗体をリボソームELISA法や蛍光ゲルろ過法によりスクリーニングし、GRPRの細胞外領域に結合する立体構造認識抗体を5種類作製した。得られた抗体の塩基配列をシーケンスし、ヒトキメラ組み換えFabを作製した。MORも熱安定性の高い変異体をスクリーニングして精製を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヘテロマーを安定化する抗体を開発し、GRPR-MOR1Dヘテロマーのクロスアクティベーションの分子機構を構造生物学的に解明することを目指す。独自のタンパク質精製技術と抗体作製技術を用いて、ヘテロマー認識抗体や、各々の受容体に特異的な抗体を人工的につなげたバイスペシフィック抗体などのヘテロマー安定化抗体を作製する。抗体安定化MOR1D-GRPRヘテロマーの構造情報はX線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡単粒子解析により原子分解能で明らかにする。本研究におけるヘテロマー安定化抗体取得技術は多くのGPCRヘテロマーの構造解析に応用できるため、ヘテロマー研究を大きく推進する。

研究成果の概要（英文）：G protein-coupled receptors (GPCRs) mediate intracellular physiological processes by interacting with signaling molecules such as G proteins and arrestins, a process initiated by binding with extracellular agonists. The emergence of biased agonists, which can selectively propagate signals in the presence of agonists, has garnered attention in the development of drugs without side effects. This strategy encompasses developing agents that can preferentially actuate either G protein or arrestin signaling pathways, leveraging therapeutic advantages while minimizing adverse outcomes. However, the intricacies of how biased agonists provoke selective signal transduction remain largely elusive.

研究分野：生化学

キーワード：オピオイド 副作用 オピオイド受容体 ヘテロ二量体 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (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)の中には、細胞膜上でヘテロマーを形成し、受容体のリガンド親和性やシグナル伝達などの機能変化を引き起こすものがある。病態生理的条件下では、GPCRのヘテロマー化は副作用を抑えた創薬のターゲットとして注目されている。例えば、モルフィネによる副作用の一つである痒みは、 $\mu$ オピオイド受容体のアイソフォームである MOR1D 受容体 (Gi 結合型) が中枢の痒み受容体 GRPR (Gq 結合型) と結合しヘテロマー化する事に起因する (Liu XY., et al., *Cell*, 2011)。

MOR1D に結合したモルフィネは GRPR-Gq-PLC という分岐経路を活性化 (クロソアクティベーション) して痒みシグナルを伝達する。これまで、GPCR の結合によるクロソアクティベーションなどの機能変化のメカニズムは全く分かっておらず、構造生物学を用いた解析が求められている。しかし、創薬標的であるクラス A-GPCR には構造生物学に適した安定的なヘテロマー形成の例は無く、GPCR ヘテロマーの構造解析は世界で誰も成功していない。

## 2. 研究の目的

本研究ではヘテロマーを安定化する抗体を開発し、GRPR-MOR1D ヘテロマーのクロソアクティベーションの分子機構を構造生物学的に解明することを目指す。独自のタンパク質精製技術と抗体作製技術を用いて、ヘテロマー認識抗体や、各々の受容体に特異

的な抗体を人工的につなげたバイスペシフィック抗体などのヘテロマー安定化抗体を作製する。抗体安定化 MOR1D-GRPR ヘテロマーの構造情報は X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡単粒子解析により原子分解能で明らかにする。本申請のヘテロマー安定化抗体取得技術は多くの GPCR ヘテロマーの構造解析に応用できるため、ヘテロマー研究を大きく推進することが期待される。

### 3. 研究の方法

一般にヒト GPCR は構造が不安定なため構造解析が困難である。申請者はこれまで GPCR を安定化し結晶化を促進する立体構造認識抗体の作製技術を開発して、多くのヒト GPCR の構造解析に成功してきた。さらに、発現が困難な GPCR においても、点変異などを導入した安定化変異体を蛍光ゲルろ過法(FSEC)で高速スクリーニングし、浮遊 HEK293 発現系により大量生産する技術を開発した。本申請ではこれまで蓄積してきた技術をさらに発展させ、GPCR ヘテロマー分子機構解明を目指した構造解析を以下のように行う。

**コンストラクトスクリーニング** GFP タグをつけた MOR1D と GRPR に様々な点変異や BRIL などの安定化タンパク質を導入する。FSEC を用いて発現量、単分散性が良好な変異体をスクリーニングし、大量精製する。GRPR は安定化変異体を作製、精製済みである。

**ヘテロマー認識抗体作製** 精製標品が安定にヘテロマー形成する場合、これを抗原としてヘテロマー認識抗体の取得を試みる。ヘテロマーをプロテオリポソームに再構成し、免疫不全マウスに免疫する。脾臓 B 細胞を回収し、ハイブリドーマを作製する。ハイブ

リドームの中からのヘテロマーのみを認識する抗体を「リボソーム ELISA 法」によりスクリーニングする。構造認識抗体を選別するために、変性した抗原を用いた ELISA 法で配列認識抗体を除外する。

**ヘテロマー安定化バイスペシフィック抗体作製** 得られた変異体のヘテロマーが不安定な場合、2つの受容体を連結させるバイスペシフィック抗体を作製し、ヘテロマーの安定化を行う。上記の方法で GRPR と MOR1D 各々の細胞外認識抗体をスクリーニングし、ハイブリドームから cDNA を合成して可変領域 VH、VL の塩基配列を得る。GRPR と MOR1D の VH、VL 配列を各々リンカーで1本鎖に結合して、HEK293 による分泌系で発現させバイスペシフィック抗体(BiTE)を得る。得られた複数の抗体のコンビネーションから様々な性質を持ったヘテロマー安定化抗体を取得する。

**抗体の評価** 得られたヘテロマー認識抗体やバイスペシフィック抗体は、HEK293 細胞に発現させた GRPR や MOR1D の免疫染色、FSEC によるゲルシフトアッセイにより評価する。またクロスアクティベーションを起こす抗体を、発光シグナルを指標にした NanoBiT アッセイにより検討する。

**構造解析** MOR1D-GRPR のヘテロマーもしくはヘテロマー-抗体複合体を精製し、X線結晶構造解析およびクライオ電顕で立体構造を解析する。

#### 4. 研究成果

これまで、GPCR の結合によるクロスアクティベーションなどの機能変化のメカニズムは全く分かっておらず、構造生物学を用いた解析が求められている。しかし、創薬標的であるクラス A-GPCR には構造生物学に適した安定的なヘテロマー形成の例は無く、GPCR ヘテロマーの構造解析は世界で誰も成功していない。本研究ではヘテロマーを安定化する抗体を開発し、GRPR-MOR1D ヘテロマーのクロスアクティベーションの分子機構を構造生物学的に解明することを目指した。独自のタンパク質精製技術と抗体

作製技術を用いて、ヘテロマー認識抗体や、各々の受容体に特異的な抗体を人工的につなげたバイスペシフィック抗体などのヘテロマー安定化抗体の作製を試みた。本研究のヘテロマー安定化抗体取得技術は多くの GPCR ヘテロマーの構造解析に応用できるため、ヘテロマー研究を大きく推進することが期待される。まず初めに GRPR に不活性化固定変異を導入して熱安定性をあげ、哺乳類培養細胞株 Expi293 とバキュロウイルスを用いた大量発現系で単分散性の高い GRPR の精製を行った。精製した GRPR は人工脂質二重膜（プロテオリポソーム）に再構築して抗原とし、マウスに免疫した。得られた抗体から変性した GRPR には反応しない立体構造認識抗体をリポソーム ELISA 法や蛍光ゲルろ過法によりスクリーニングし、GRPR の細胞外領域に結合する立体構造認識抗体を 5 種類作製した。得られた抗体の塩基配列をシーケンスし、ヒトキメラ組み換え Fab を作製した。MOR も熱安定性の高い変異体をスクリーニングして精製を試みたが、収量と単分散性が低く、マウスへの免疫に必要な量の精製を行えていない。今後はさらに精製方法を改良していく必要がある。引き続き、マウスの抗体が得た後には、scFv が連結した抗体に GRPR と MOR の相補性決定領域を組み込んだバイスペシフィック抗体を作製し構造解析やシグナルアッセイなどのヘテロマー解析に用いる予定である。最終的には、抗体安定化 MOR1D-GRPR ヘテロマーの構造情報は X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡単粒子解析により原子分解能で明らかにしたい。

## 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 2件）

1. 著者名 Kayo Imamura, Ken-Ichi Akagi, Yohei Miyanoiri, Hirokazu Tsujimoto, Takatsugu Hirokawa, Hideo Ashida, Kaori Murakami, Asuka Inoue, Ryoji Suno, Takahisa Ikegami, Naotaka Sekiyama, So Iwata, Takuya Kobayashi, Hidehito Tochio.	4. 巻 32(3)
2. 論文標題 Interaction modes of human orexin 2 receptor with selective and nonselective antagonists studied by NMR spectroscopy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 352-361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2023.12.008	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 Hideo Ogiso, Ryoji Suno, Takuya Kobayashi, Masashi Kawami, Mikiyoshi Takano, Masaru Ogasawara	4. 巻 27(15)
2. 論文標題 A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method to Study the Interaction between Membrane Proteins and Low-Molecular-Weight Compound Mixtures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27154889.	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 Ryoji Suno, Yukihiko Sugita, Kazushi Morimoto, Hiroko Takazaki, Hirokazu Tsujimoto, Mika Hirose, Chiyo Suno-Ikeda, Norimichi Nomura, Tomoya Hino, Asuka Inoue, Kenji Iwasaki, Takayuki Kato, So Iwata, Takuya Kobayashi	4. 巻 40(11)
2. 論文標題 Structural insights into the G protein selectivity revealed by the human EP3-Gi signaling complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 111323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111323.	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 Kabe Yasuaki, Koike Ikko, Yamamoto Tatsuya, Hirai Miwa, Kanai Ayaka, Furuhashi Ryogo, Tsugawa Hitoshi, Harada Erisa, Sugase Kenji, Hanadate Kazue, Yoshikawa Nobuji, Hayashi Hiroaki, Noda Masanori, Uchiyama Susumu, Yamazaki Hiroki, Tanaka Hirotohi, Kobayashi Takuya, Handa Hiroshi, Suematsu Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Glycyrrhizin Derivatives Suppress Cancer Chemoresistance by Inhibiting Progesterone Receptor Membrane Component 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3265 ~ 3265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13133265	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 Okamoto Hiroyuki H., Miyuchi Hirotake, Inoue Asuka, Raimondi Francesco, Tsujimoto Hirokazu, Kusakizako Tsukasa, Shihoya Wataru, Yamashita Keitaro, Suno Ryoji, Nomura Norimichi, Kobayashi Takuya, Iwata So, Nishizawa Tomohiro, Nureki Osamu	4. 巻 28
2. 論文標題 Cryo-EM structure of the human MT1?Gi signaling complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 694 ~ 701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-021-00634-1	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 -

1. 著者名 Katayama Kota, Suzuki Kohei, Suno Ryoji, Kise Ryoji, Tsujimoto Hirokazu, Iwata So, Inoue Asuka, Kobayashi Takuya, Kandori Hideki	4. 巻 4
2. 論文標題 Vibrational spectroscopy analysis of ligand efficacy in human M2 muscarinic acetylcholine receptor (M2R)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02836-1	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 寿野良二
2. 発表標題 バイアスドリガンドによるヒト オピオイド受容体シグナル伝達の構造的洞察
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寿野良二
2. 発表標題 Structural and dynamic insights into the biased signaling mechanism of the kappa opioid receptor
3. 学会等名 生理学研究会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寿野良二
2. 発表標題 Structural insights into human kappa opioid receptor signaling by biased ligand
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寿野良二、小林拓也
2. 発表標題 G蛋白質共役受容体の多様な機能発現機構の構造生物学的解明
3. 学会等名 東京理科大学 研究推進機構 総合研究院 生物環境イノベーション研究部門・公開シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林拓也
2. 発表標題 プロスタグランジン受容体の立体構造を基盤とした創薬開発を目指して
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林拓也
2. 発表標題 プロスタグランジン受容体の立体構造を基盤とした創薬開発を目指して
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林拓也
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるプロスタグランジン受容体/Gタンパク質複合体の構造解析
3. 学会等名 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業令和3年度BINDS公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水(小林)拓也、寿野良二	4. 発行年 2023年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 クライオ電子顕微鏡ハンドブック	

〔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
研究分担者	井上 明俊 (INOUE Akitoshi) (50709152)	関西医科大学・医学部・助教  (34417)	
研究分担者	寿野 良二 (SUNO Ryoji) (60447521)	関西医科大学・医学部・准教授  (34417)	

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