

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460033

研究課題名(和文)GPCRの、バイアスを含むシグナル制御機構の構造生物学的解明

研究課題名(英文)Structural elucidation of the mechanism underlying biased signaling of GPCRs

研究代表者

上田 卓見 (Ueda, Takumi)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20451859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：NMRシグナルの感度を従来法の5倍以上とする、昆虫細胞発現系で重水素化したタンパク質を調製する手法を開発した。加えて、重水素化を施した上で、rHDLの脂質二重膜中に再構成したb2ARを調製して、各種リガンド結合状態のNMRスペクトルを取得することにも成功した。その結果、rHDL中では、活性型の量比がミセル中より多く、交換速度がミセルにおける値の数分の一であることが示された。さらに、アレチンシグナルを選択的に活性化する状態のGPCRのNMRシグナルを観測した。その結果、GPCRが複数の活性型の構造平衡状態にあり、各活性型の割合がシグナル選択性を決定していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To increase the signal intensities, a deuteration method was developed for GPCRs expressed in an insect cell/baculovirus expression system. The NMR sensitivities of the methionine methyl resonances from the β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) in lipid bilayers of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) increased by approximately 5-fold upon deuteration. NMR analyses revealed that the exchange rates for the conformational equilibrium of β_2 AR in rHDLs were remarkably different from those measured in detergents. The timescales of GPCR signaling, calculated from the exchange rates, are faster than those of receptor tyrosine kinases and thus enable rapid neurotransmission and sensory perception. We could also identify conformational equilibrium of GPCRs that determine their biased signaling.

研究分野：構造生物学

キーワード：GPCR NMR 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、ヒトゲノム中の膜蛋白質の中で最大のファミリーを形成しており、市販されている医薬品の 25% は GPCR を標的とする。細胞外領域へのリガンド結合により活性化された GPCR は、細胞内の G タンパク質を活性化して、細胞内にシグナルを伝達する。これに加えて、活性化された GPCR が G 蛋白質キナーゼ (GRK) によるリン酸化を受けた上で、 β -アレスチンを活性化することによるシグナル伝達経路も存在する。

GPCR に作用する化合物の中には、G 蛋白質を介するシグナル経路と β -アレスチンを介する経路の一方を選択的に活性化するようなリガンドが存在し、その薬理作用も両方の経路を活性化する通常のリガンドとは異なることが知られている。例えば、 β アドレナリン受容体に作用する薬物の中でも、カルベジロールは、 β -アレスチンを介する経路のみを選択的に活性化すること、および類縁の薬物より高い心不全治療効果を持つことが知られている。このように一方のシグナル伝達経路を選択的に活性化する現象はバイアスと呼ばれ、理想的な作用を持つ薬物を開発する上で重要であると考えられている。しかし、カルベジロール結合状態の β アドレナリン受容体の結晶構造は、阻害剤結合時の不活性型の構造と同一であった。

2. 研究の目的

本研究では、バイアスを有するリガンドと有さないリガンドが結合した状態における、GPCR の構造を明らかにして、バイアスのあるシグナル制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

精製した DDM ミセル中の β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) に脂質および MSP1 を混合して rHDL に再構成した上で、ゲルろ過ク

ロマトグラフィーおよび His タグを用いた空 rHDL の除去を行った。(rHDL) の脂質二重膜に再構成した β_2 AR (β_2 AR-rHDL) を調製した。調製した β_2 AR-rHDL に、完全アゴニストであるフォルモテロール、Gs タンパク質および 35 S-GTP γ S を添加した上で、G タンパク質結合型 35 S-GTP γ S を検出する GDP-GTP 交換アッセイを行い、G タンパク質活性化能を調べた。さらに、調製した β_2 AR-rHDL を用いて、フォルモテロールもしくはカルベジロール存在下において、GRK2 によるリン酸化反応を行い、反応液を SDS-PAGE 解析した上で、染色強度がリン酸基の数に対応する Pro-Q Diamond および染色強度が総タンパク質の量に対応する SYPRO-Ruby による染色を行った。

入手可能な重水素化アミノ酸を全て添加した培地で、モデルタンパク質であるチオレドキシンを発現させて、その NMR スペクトルから、各アミノ酸残基の重水素化率を算出することにより、昆虫細胞発現系での重水素化法を検討した。

活性の異なる様々なリガンドが結合した状態における、重水素化 β_2 AR-rHDL の NMR スペクトルを測定した

4. 研究成果

脂質二重膜中における β_2 AR の動的構造平衡を明らかにするために、再構成高密度リポ蛋白質 (rHDL) に再構成した β_2 AR、 β_2 AR-rHDL を調製した。SDS-PAGE 解析および RI リガンド結合アッセイの結果、収量は培地 1L あたり約 150 μ g、活性割合は 80% 以上であることが示された。得られた β_2 AR-rHDL が、リガンド依存的に G タンパク質を活性化すること、および GRK2 によるリン酸化を受けることを確認した。

rHDL 中の β_2AR は巨大分子であり、重水素化による NMR シグナルの先鋭化が必須である。そのため、昆虫細胞発現系での重水素化法を検討した。その結果添加量やタイミング等を最適化した条件では、14 種類の残基が、重水素化されたことが示された。一方、発現量の限られる GPCR の重水素化体の調製においては、重水素化するアミノ酸の数を必要最小限とした方が、収量やコストの面で望ましい。そこで、 β_2AR の立体構造において、観測するメチオニン残基と近接するアミノ酸を調べて、重水素化するアミノ酸を選定した。その結果、A, C, F, I, L, M, T, V, Y, W を部分重水素化すると、観測原子に近接するプロトンを効率良く減らして、rHDL 中の β_2AR のシグナル強度を数倍以上増大できることが示唆された。

そこで次に、部分重水素化とメチオニン ^{13}C 標識を両方施した β_2AR -rHDL と、重水素化していない β_2AR -rHDL を調製して、逆アゴニスト存在下における NMR スペクトルを測定した (Fig.1)。その結果、重水素化を行わなかった時の β_2AR -rHDL の NMR スペクトルでは、M82, M215, M279 の NMR シグナルはほとんど観測されなかったのに対し、重水素化した条件では、各メチオニン残基の NMR シグナルが、十分な感度で観測された。これらの結果は、重水素化によりシグナル強度が 5 倍以上向上したことを示しており、重水素化率からの予測と良く対応した。

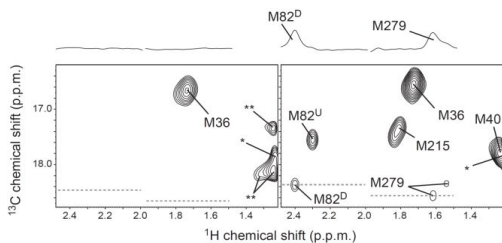


Fig.1 非重水素化(左)および重水素化(右)メチオニン選択標識 β_2AR -rHDL の、逆アゴニスト (carazolol) 結合状態における 1H - ^{13}C HMQC スペクトル。

次に、活性の異なる様々なリガンドが結合した状態における、重水素化 β_2AR -rHDL

の NMR スペクトルを測定した上で、ミセル状態の解析において活性と対応するシグナル変化を示していた M82 のシグナルを重ね合わせた (Fig.2)。その結果、ミセルの時と同様、各リガンドの efficacy に対応した、連続的な化学シフト変化が観測された。したがって、rHDL 中においても、 β_2AR が活性型と不活性型の構造平衡にあることが示された。一方、ミセル中の β_2AR のスペクトルと比べると、部分アゴニスト結合状態の化学シフトが、より完全アゴニスト結合状態に近い値となっていた。このことは、rHDL 中では、活性型の割合がやや多いことを示している。また、ミセル状態と比べると、部分アゴニスト結合状態のシグナルが顕著に広幅化しており、特に弱い部分アゴニスト結合状態では、シグナルが二つに割れていた。以上の現象交換速度がミセルの時よりも小さいことを示している。

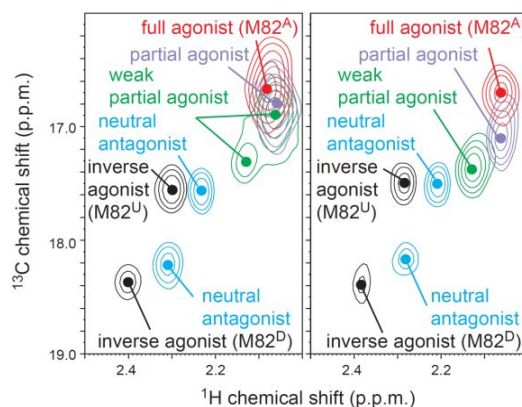


Fig.2 重水素化およびメチオニン選択標識を施した、rHDL 中 (左) およびミセル中 (右) の β_2AR -rHDL における、各リガンド結合状態の 1H - ^{13}C HMQC スペクトル。

そこで、rHDL では、交換速度が半分 ~ 1/5 程度となり、活性型の割合が 1.2 倍程度になるという仮定に基づいて、各リガンド結合状態の NMR シグナルのシミュレーションを行った。その結果、上記の実測したスペクトルの特徴を良く再現することができた。以上の結果から、rHDL 中の β_2AR は、ミセル中と同様、二つの不活性型と活性型の平衡状態にあ

るが、活性型の割合が多く、交換速度が数分の一程度であると結論した (Fig.3)。

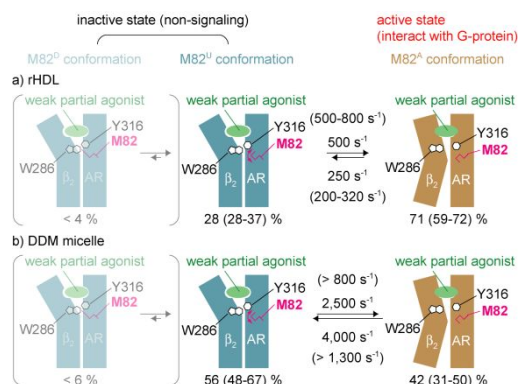


Fig.3 ミセル中と rHDL 中における、 β_2 AR の動的構造平衡の違い (弱い部分アゴニスト結合状態)

次に、シグナルのバイアスを決定する構造平衡を明らかにするために、カルベジロール結合状態における、部分重水素化とメチオニン ^{13}C 標識を両方施した β_2 AR-rHDL の NMR スペクトルを取得した。その結果、メチオニン残基の化学シフトが他のリガンド結合状態とは異なっており、化学シフトとバイアスの程度は良く相関していた。以上の結果から、 β_2 AR は複数の活性型の構造平衡状態にあり、カルベジロール結合時にはアレスチンの活性化に有利な活性型の割合が高くなると考えた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Yuichi Minato, Shiho Suzuki, Tomoaki Hara, Yutaka Kofuku, Go Kasuya, Yuichiro Fujiwara, Shunsuke Igarashi, Ei-ichiro Suzuki, Osamu Nureki, Motoyuki Hattori, Takumi Ueda, and *Ichio Shimada, "Conductance of P2X₄ receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region", *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2016) 113,4741-4746 (査読有)
2. Junya Okude, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Motohiko Sato, Naoyuki Nobuyama, Keita

Kondo, Yutaro Shiraishi, Takuya Mizumura, Kento Onishi, Mei Natsume, Masahiro Maeda, Hideki Tsujishita, Takefumi Kuranaga, Masayuki Inoue, and *Ichio Shimada, "Identification of a conformational equilibrium that determines the efficacy and functional selectivity of the μ -opioid receptor", *Angew. Chem. Int. Ed.* (2015) 54, 15571-15576 (査読有)

3. Chie Yoshiura, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Masahiko Matsumoto, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Koh Takeuchi, and *Ichio Shimada, "Elucidation of the CCR1- and CCR5- binding modes of MIP-1 α by application of an NMR spectra reconstruction method to the transferred cross-saturation experiments", *J. Biomol., NMR* (2015) 63, 333-340 (査読有)

4. Takumi Ueda, Chie Yoshiura, Masahiko Matsumoto, Yutaka Kofuku, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Koh Takeuchi, and *Ichio Shimada, "Development of a method for reconstruction of crowded NMR spectra from undersampled time-domain data", *J. Biomol., NMR* (2015) 62, 31-41 (査読有)

5. Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Junya Okude, Yutaro Shiraishi, Keita Kondo, Takuya Mizumura, Shiho Suzuki, and *Ichio Shimada, "Functional dynamics of deuterated β_2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR Spectroscopy", *Angew. Chem. Int. Ed.* (2014) 53, 13376-13379 (査読有)

6. Kaori Esaki, Sosuke Yoshinaga, Tatsuichiro Tsuji, Etsuko Toda, Yuya Terashima, Takashi Saitoh, Daisuke Kohda, Toshiyuki Kohno, Masanori Osawa, Takumi Ueda, Ichio Shimada, Kouji Matsushima and *Hiroaki Terasawa, "Structural basis for the binding of the membrane-proximal C-terminal region of chemokine receptor CCR2 with the cytosolic regulator FROUNT", *FEBS J.* (2014) 281, 5552-5566 (査読有)

7. Takumi Ueda, Koh Takeuchi, Noritaka Nishida, Pavlos Stampoulis, Yutaka Kofuku, Masanori Osawa, and *Ichio Shimada, "Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments", *Q. Rev. Biophys.* (2014) 47, 143-187 (査読有)

8. Noritaka Nishida, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Shunsuke Imai, Pavlos Stampoulis, Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, and *Ichio Shimada, "Functional dynamics of cell surface membrane proteins", *J. Magn. Reson.* (2014) 241, 86-96 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 上田卓見, 吉浦知絵, 幸福裕, 松本昌彦, 奥出順也, 近藤啓太, 白石勇太郎, 嶋田一夫, 「多次元 NMR スペクトル再構成法の開発とケモカイン-ケモカイン受容体複合体の転移交差飽和実験への応用」, 第 54 回 NMR 討論会, 2015 年 11 月 8 日, 千葉

2. 上田卓見, 幸福裕, 嶋田一夫, 「リガンドとの相互作用に伴う膜蛋白質の動的立体構造変化」, 第 53 回生物物理学会, 2015 年 9 月 14 日, 金沢

3. 上田卓見, 「NMR による、限定されたデータからの GPCR の動的構造情報の抽出」, 2014 年 6 月 27 日, 横浜

4. 上田卓見, 吉浦知絵, 松本昌彦, 幸福裕, 奥出順也, 近藤啓太, 白石勇太郎, 嶋田一夫, 「二次点 NMR インターフェログラム再構成法の開発および CCR5 の MIP-1 結合様式の解明への応用」, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 29 日, 熊本

5. 上田卓見, 「NMR による G タンパク質共役型受容体の機能解明」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー "第 4 回神経科学と構造生物学の融合研究会", 2013 年 11 月 29 日, 大阪

〔その他〕

ホームページ等

<http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public.html/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 卓見 (Takumi Ueda)
東京大学大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：20451859

(2) 研究分担者

嶋田 一夫 (Ichio Shimada)
東京大学大学院薬学系研究科・教授
研究者番号：70196476