

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分
令和2年3月31日現在

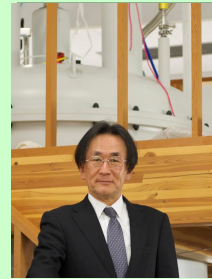
核磁気共鳴法による膜タンパク質の *in situ* 機能解明

In situ functional analyses of membrane proteins by NMR

課題番号：17H06097

嶋田 一夫 (SHIMADA, ICHIO)

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・教授



研究の概要：本研究では、*in situ* 条件下における膜タンパク質の動的構造を解析するため、生理的条件を模倣する試料調製法や NMR 測定法を開発し、動的構造が機能発現の本質であることが想定される膜タンパク質（GPCR、K⁺チャンネル、およびトランスポーター）を対象とした NMR 解析を行うことでその機能解明を行う。

研究分野：構造生物化学

キーワード：核磁気共鳴法、膜タンパク質、動的立体構造

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は生体内において重要な役割を果たすとともに最大の創薬標的タンパク質である。X線結晶構造解析および電子顕微鏡法は、膜タンパク質の機能メカニズムの解明に大きく貢献してきたが、これらの手法で得られる立体構造は静的なスナップショットであり、膜タンパク質が機能している *in situ* 状態の動的な構造や分子間相互作用を必ずしも反映しない。一方、核磁気共鳴法は *in situ* 条件下でのタンパク質の動的構造情報を得ることができるが、膜タンパク質のような高分子量タンパク質の機能解明を行う場合、その高分子量性に由来する NMR 測定制限および膜タンパク質の不安定性がボトルネックとなる。研究代表者はこれらの問題を解消するための新規測定法および試料調製法を開発し、開発された方法論を用いて、膜タンパク質の動的構造および相互作用の観点よりそれらの機能解明を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究では、生物学的に重要であり、かつ動的構造が機能発現の本質であることが想定される膜タンパク質（GPCR、K⁺チャンネル、およびトランスポーター）を対象として、*in situ* 条件下における動的立体構造解析を行う試料調製法や NMR 測定法を開発したうえで、1. バイアスリガンドによる GPCR のシグナル選択機構の解明、2. イオンチャンネルにおける電流制御機構の解明、3. 多剤耐性システムの機能メカニズムの解明を研究目的とする。

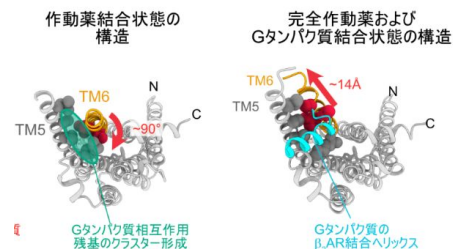
3. 研究の方法

膜タンパク質の *in situ* NMR 解析を行うため、新規安定同位体標識法、動的構造平衡の解析法、NMR 測定感度を増大させるパルスプログラムなどの開発を行う。また脂質二重膜環境を制御したナノディスクに膜タンパク質再構成し、生理的 *in situ* 環境を模倣した条件下で NMR 解析を行う。

4. これまでの成果

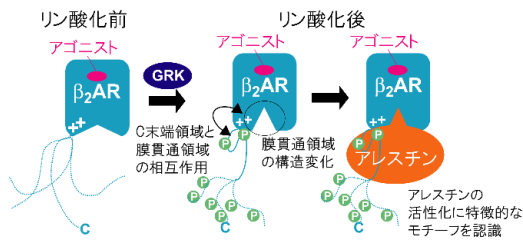
1. GPCR のシグナル選択機構の解明

GPCR の一種である β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) の作動薬結合状態における立体構造を、常磁性緩和促進 (PRE) に基づく距離情報を活用して決定した。その結果、これまでの X線結晶解析で得られていた構造とは全く異なる新規の構造を明らかにし、作動薬による G タンパク質による活性化機構を解明した (*Nat. Chem. Biol.* 2020)。

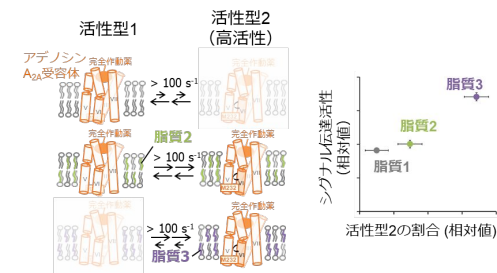


β_2 AR の C 末端を区分選択標識し、ナノディスクに再構成したうえで、GPCR キナーゼによりリン酸化したサンプルの構造解析を行った。その結果、リン酸化部位と GPCR との相互作用により、アレスチンの活性化に特徴

的な構造モチーフが形成されることが示された (*Nat. Commun.* 2018)。

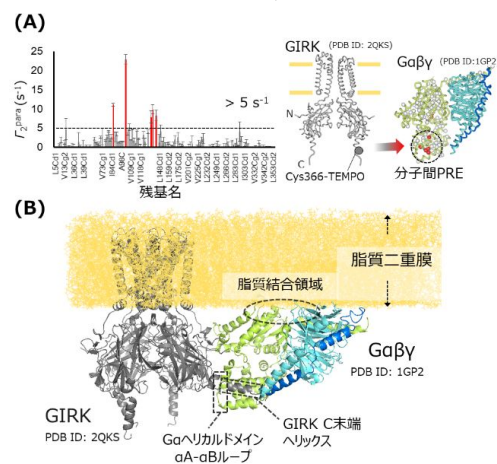


脂質組成を制御したナノディスク中に再構成した GPCR の構造解析にも取り組み、脂質がアデノシン A_{2A} 受容体の複数の活性構造の存在比を変化させ、シグナル伝達活性を制御することも明らかにした (*Sci. Adv.* 2020)。



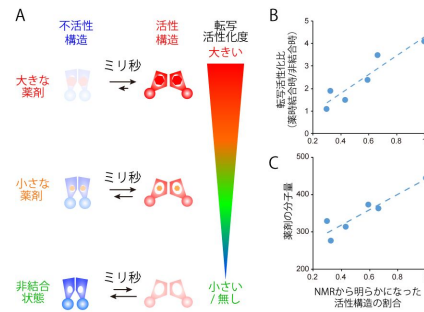
2. イオンチャネルの電流制御機構の解明

脂質二重膜中に再構成した GIRK と 3 量体 G タンパク質複合体構造モデル (MW:470K) を構築した。得られた構造モデルと BRET 法による細胞レベルでの相互作用実験を組み合わせ、Gα の αA ヘリックスを介した GIRK との結合が、活性制御の選択性を決定していることを明らかにした (*Nat. Commun.* 2019)。



3. 多剤耐性システムの機能メカニズムの解明

多剤耐性転写因子の一つである QacR と薬剤複合体の動的構造解析を行った。その結果、QacR が活性・不活性構造をミリ秒で行き来する構造平衡にあること、その平衡割合によって転写活性化度が決まることを明らかにした。また非結合時にも約 20% の QacR が活性化状態にあり、これが基底的なトランスポーターの発現を促していることが分かった。 (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019)



5. 今後の計画

今後はバイアスリガンドやアロステリックモジュレーターの存在下における β₂AR やオピオイド受容体の構造解析、G タンパク質やアレスチン結合状態の構造解析を行い、GPCR のバイアスシグナル機構を解明する。また、脂質二重膜環境依存的な K⁺イオンチャネル (KcsA) の電流変化機構を解析する。多剤耐性システムについても、pfMATE における pH 依存的な構造平衡の解析を進め、共役転写因子の立体構造解析を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- Mizumura T, Kondo K, Kurita M, Kofuku Y, Natsume M, Imai S, Shiraishi Y, Ueda T, and Shimada I*. Activation of adenosine A_{2A} receptor by lipids from docosahexaenoic acid revealed by NMR. *Sci. Adv.* (2020) DOI: 10.1126/sciadv.eaay8544
- Imai S, Yokomizo T, Kofuku Y, Shiraishi Y, Ueda T, and Shimada I*. Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of β₂ adrenoreceptor. *Nat. Chem. Biol.* (2020) DOI: 10.1038/s41589-019-0457-5.
- Takeuchi K, Imai M, and Shimada I*. Conformational equilibrium defines the variable induction of the multidrug-binding transcriptional repressor QacR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116(40), 19963-19972 (2019)
- Kano H, Toyama Y, Imai S, Iwahashi Y, Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, and Shimada I*. Structural mechanism underlying G protein family-specific regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel. *Nat. Commun.* 10(1) 2008 (2019)
- Shimada I*, Ueda T, Kofuku Y, Eddy M.T., and Wüthrich K*. GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18(1) 59-82 (2019)

7. ホームページ等

http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/index_j.html