

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05112

研究課題名(和文) 過渡的タンパク質複合体の高速構造解析プラットフォームの構築

研究課題名(英文) Development of a platform for rapid structural analysis of transient protein complexes.

研究代表者

寿野 良二 (SUNO, Ryoji)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60447521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究領域では、多元的アウトプットとして現れる複雑な生理作用を、分子(寿野班)、細胞(井上班)、個体(櫻井班)、制御(斉藤班)といった次元に分解して検証し、分子、細胞、個体各スケールにおける「素過程」の重ね合わせの形にて記述・可視化を実現する。寿野班は分子フェーズを担当し、オピオイド受容体(KOR、DOR)を介したシグナル伝達機構の全貌をクライオ電子顕微鏡の単粒子解析によって原子分解能レベルで明らかにすることを目的とし、KORでは3つ、DORでは1つのバイアスドリガンド結合状態、KOR、DORでそれぞれ1つのバランスドリガンド結合状態の構造を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

μ、κ、δ オピオイド受容体(MOR、DOR、KOR)の作動薬は鎮痛効果があり、とくにMORの作動薬であるモルヒネはがん性疼痛などに顕著な効果を示す。一方で、薬物依存などの重篤な副作用を示すため、その使用法は制限されている。多くの製薬企業などの研究機関がMOR作動薬の副作用を軽減する努力が長年行われてきたが未だに成功していない。本研究では鎮痛効果を示すDOR、KORの作動薬に着目し、様々な性質をもつ作動薬が結合したDOR、KORの立体構造を決定した。副作用を示す作動薬と副作用が弱い作動薬の結合状態を比較し、副作用の発現メカニズムを検討した。この構造情報は副作用のない薬剤開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this research area, complex physiological actions that emerge as multidimensional outputs are examined by breaking them down into the dimensions of molecules (Suno Group), cells (Inoue Group), individuals (Sakurai Group) and regulation (Saito Group), and are described and visualised in the form of superposition of "elementary processes" at the scale of molecules, cells and individuals. The Suno group is in charge of the molecular phase and aims to clarify the whole picture of the signalling mechanism via opioid receptors (and opioid receptors (KOR and DOR)) at the atomic resolution level by single particle analysis using cryo-electron microscopy. The structures of three biased ligand-bound states in the KOR and one balanced ligand-bound state in the DOR and one balanced ligand-bound state in the KOR and DOR, respectively, have been determined.

研究分野：構造生物学、医化学

キーワード：GPCR クライオ電子顕微鏡単粒子解析 シグナル伝達 SBDD 膜タンパク質 鎮痛

1. 研究開始当初の背景

オピオイドは受容体への結合を介してモルヒネに類似した作用を示す物質の総称であり、鎮痛作用が知られている一方で便秘、嘔吐、掻痒感、眠気、呼吸抑制と言った重大な副作用が存在する。オピオイド受容体は μ 、 κ 、 δ の3種類が知られており、そのうちKORは鎮痛剤のターゲットとしてだけでなく、掻痒に関わるという特徴を持ち、DORは抗うつ、抗不安作用があることが知られている。斎藤班が開発したKOR/DOR作動薬はGタンパク質バイアス型リガンド(YNT-1612およびKNT-127)であり、副作用のない効果的な掻痒症改善剤、抗うつ剤となることが期待される。

しかし、依然としてバイアス型リガンド開発は膨大な数の化合物開発と化合物スクリーニングが必要であり、合理的な開発が難しい。薬剤開発に受容体の構造情報は有用であり、現在までにKOR/DORは不活性型と作動薬結合状態を明らかにしている(Wu, H., et al., *Nature* (2012), Che, T. et al., *Cell* (2018), Fenalti G., et al. *Nature* (2014), Claff T., et al., *Sci Adv.* (2019))。しかし、シグナル伝達因子との複合体構造は全く不明であるため、それぞれのシグナル伝達機構の詳細は明らかでない。各シグナル伝達因子との複合体構造はリガンド結合ポケットの構造の違いを明らかにし、様々な性質を持ったバイアス型リガンドの開発に重要な知見が得られることが期待される。近年のCryo-EM SPAの高分解能化によって、これまで困難であったGPCR-シグナル伝達因子複合体の原子分解能構造解析が現実的な技術となってきた。Gタンパク質、アレスチンとGPCRの複合体構造解析が報告され(Safdari H. A., et al., *Trends Cell Biol* (2018))。構造情報からシグナル伝達機構の詳細が明らかになり、Gタンパク質の種類および受容体によってGタンパク質の結合様式が異なること、アレスチンは様々な結合様式があることなどがわかってきた。しかし、多くのGPCR-シグナル伝達因子複合体は不安定であり、実際、GPCRとキナーゼとの複合体構造は未だ報告がない。このように生命現象に重要な役割を担っているにもかかわらず、複合体が不安定なために構造解析が不可能なターゲットが数多く存在する。この問題を解決できれば構造生物学だけでなく、医学薬学に大きなブレイクスルーをもたらす。そのため、過渡的なタンパク質複合体の安定化技術の開発が待たれている(図1)。

過渡的タンパク質複合体の高速構造解析プラットフォームの構築

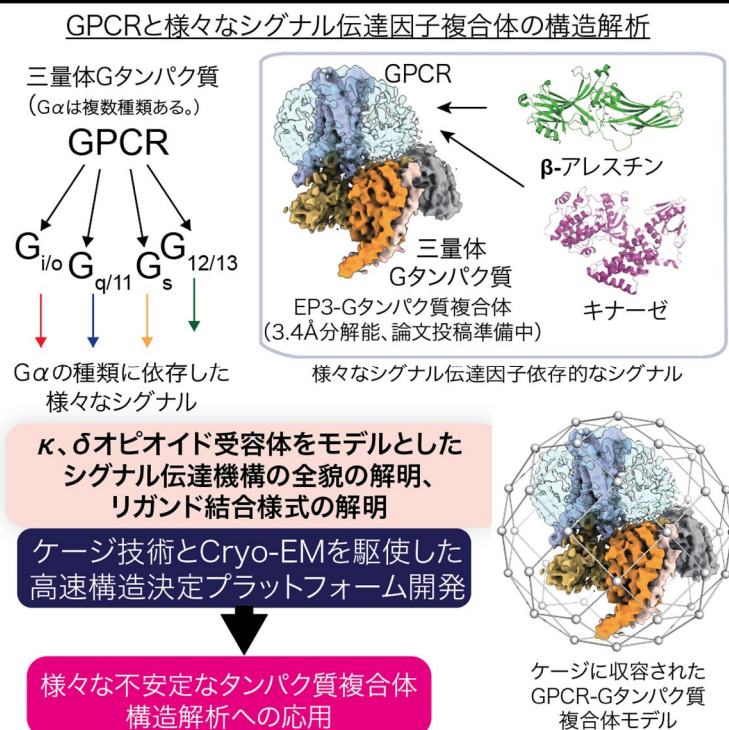


図1

2. 研究の目的

本研究は以下の3つを目的として行う。

バイアス型リガンド結合型KOR/DORのX線結晶構造解析によるシグナル選択性の解明
KOR/DORとシグナル伝達因子複合体の構造解析によるシグナル伝達機構全貌の解明
ケージ技術とCryo-EM SPAを融合した迅速構造決定プラットフォームの開発

独自に開発した KOR/DOR のバイアス型リガンドは他に例がなく、での構造情報からリガンドのシグナル選択性を明らかにすることは、学術的独自性が高く、創造性も高い。では、KOR/DOR-シグナル伝達因子複合体構造は決定されておらず、特に GPCR とキナーゼとの複合体構造は全く報告がなく、学術的独自性が高い。の藤田らがもつタンパク質安定化ケージ技術は世界的に類を見ない技術であり、これをさらに発展させ不安定な複合体を安定化させる技術を開発する。この技術と Cryo-EM SPA の組み合わせることにより、これまで不可能であった未知の複合体構造を決定する日本独自の技術となり、著しく創造性が高い。

3. 研究の方法

各計画研究班、研究分担者らと連携し (図 2) 以下の 3 点を明らかにしたい。

**Gタンパク質バイアスドリ
 ガンド結合型KOR/DORのX線結晶構造
 解析**

齋藤班が開発したリガンド YNT-1612、KNT-127 を用いて、結晶構造解析によりリガンド結合様式を明らかにし、そのシグナル選択性およびGタンパク質特異的なシグナル伝達機構を明らかにする。得られた構造情報を齋藤班、井上班にフィードバックし、新たな高親和性、高選択性リガンドの開発に貢献する。結晶化データ収集は BINDS の支援を得て SPring-8 で行い、解析、構造決定は寿野が行う。

KOR/DORとGタンパク質、アレスチン、キナーゼ複合体構造解析

KOR/DOR と各シグナル伝達因子との複合体構造を Cryo-EM SPA によって決定し、シグナル伝達機構の全貌および各状態でのリガンド結合様式の相違点を明らかにする。と同様に齋藤班、井上班にフィードバックし、薬剤開発に構造情報を提供する。Cryo-EM の測定、解析は分担者である加藤らとともに推進する。

ケージ技術とCryo-EM SPAを融合した迅速構造決定プラットフォームの開発

藤田らと連携して、Cryo-EM 測定の現課題である分析対象タンパク質のグリッド上での配向・変性問題、および分析手法の差異を越えた未踏課題である弱い/過渡的なタンパク質-リガンド複合体構造 (タンパク質間相互作用を含む) の構造観察、の二点を同一アプローチにて解決する事を目指す。Cryo-EM のサンプル調製中に直面する課題は、いくつかのパターンに分類可

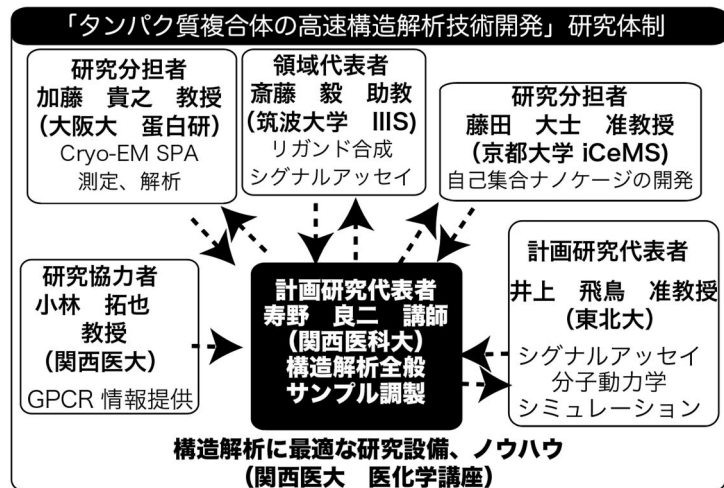


図 2

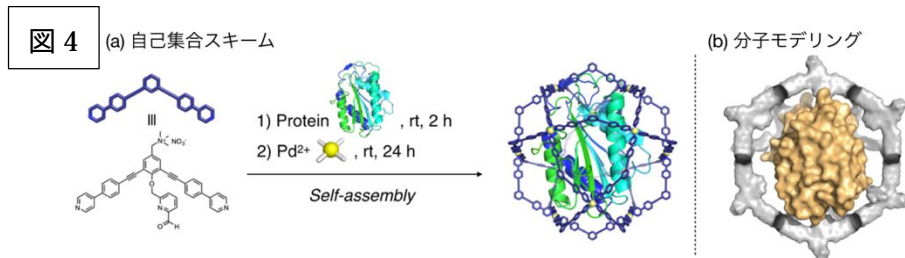
図 3



能である。

図 3 にサンプル薄膜中のタンパク質分子の分散を示す (青 = 氷薄膜 紫 = タンパク質 灰 = カーボン基材)。電子顕微鏡観察に適したサンプルは、30-100 nm の氷薄膜中に、各タンパク質分子が重なり合わずに分布し、かつ各々の分子がランダムに配向している状態である (図 3a)。申

請者は常に良好なサンプル調製を可能にする、目的タンパク質の分子性の「ワイヤーフレーム」(ケージ=鳥かご)(図4)に閉じ込め、上述の課題を解決するアイデアを提案した。この技術を用いて、分析対象タンパク質をデザイナー空間中に閉じ込め安定化するアプローチは、既存問題の解決のみに留まらない。申請者らは、同手法が弱い/過渡的なタンパク質-リガンド複合体構造(タンパク質間相互作用を含む)の構造観察を実現する汎用的なプラットフォームに拡張できる事を期待しており、これを用いてで構造決定が困難な KOR/DOR-シグナル伝達因子複合体を構造決定する。



4. 研究成果

バイアス型リガンド結合型 KOR/DOR の X 線結晶構造解析によるシグナル選択性の解明

KOR/DOR とシグナル伝達因子複合体の構造解析によるシグナル伝達機構全貌の解明

計画時は X 線結晶構造解析の手法も使用する予定であったが、バイアスドリガンド結合状態についても Cryo-EM を用いて構造決定した。バランスドリガンドは KOR、DOR で一種ずつ、バイアスドリガンドは KOR では 2 種、DOR では 1 種を用いた。KOR、DOR のコンストラクトはすでに報告されている活性型 X 線結晶構造解析の報告を参考にし、C 末端には GFP-His10 を融合した。発現には昆虫細胞 Sf9 を用い、KOR-GFP および DOR-GFP と三量体 G タンパク質を共発現した。精製は Ni-NTA、GFP 抗体カラムを用いることで KOR/DOR-Gi 複合体を精製した。複合体を安定化し、Gi の N 末端に結合する scFv16 抗体を混合してゲルろ過 HPLC クロマトグラフィーによって複合体のみを分取し、10mg/ml まで濃縮して電顕サンプルとした。上述したすべてのバランスド/バイアスドリガンド結合状態の構造決定に成功した。現在これらの構造情報を元にしてリガンド結合に関わるアミノ酸について変異体を作製し、薬理的解析を行うことでバイアスドリガンドの作用機序について検証した。このように、構造情報と薬理的解析によって KOR と DOR のシグナル選択性について明らかにし、論文投稿準備中である。

ケージ技術と Cryo-EM SPA を融合した迅速構造決定プラットフォームの開発

最初に、藤田らの班の持つケージ技術を利用する GPCR-アレスチン複合体の調製を目指した。これまで報告されている GPCR-アレスチン複合体形成法を参考に DOR、KOR について検討した。GPCR がアレスチンと複合体を形成するためには GPCR の C 末端領域のリン酸化が必要である。この点についていくつかの方法を検討した。ひとつは、精製標品を in vitro で GRK キナーゼを用いてリン酸化する方法、2 つ目は in vivo でターゲット GPCR と GRK を共発現させる方法、3 つ目は GPCR の C 末端をリン酸化されるとアレスチンと強く結合する V2 の C 末端に置換する方法を検討した。この中で最も良好な結果は C 末端にリン酸化 V2 ペプチドを、Sortase を使って融合する方法であった。この方法を用いて GPCR とアレスチンの複合体を得ることに成功した。Cryo-EM で観察したところ、GPCR とアレスチンの複合体は観測されたが、構文可能構造決定には至らなかった。この理由として、GPCR とアレスチンが様々な状態を形成することが考えられた。今後はこの手法を用いて GPCR-アレスチン複合体の構造を安定化する方法を検討するとともに、あらゆる GPCR アレスチンの構造を決定する。研究期間内に藤田らのケージ技術を利用できなかったが、今後も引き続き共同研究を行って迅速な構造決定プラットフォームの開発を目指す。

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 Sunoo Ryoji, Sugita Yukihiro, Morimoto Kazushi, Takazaki Hiroko, Tsujimoto Hirokazu, Hirose Mika, Suno-Ikeda Chiyo, Nomura Norimichi, Hino Tomoya, Inoue Asuka, Iwasaki Kenji, Kato Takayuki, Iwata So, Kobayashi Takuya	4. 巻 40
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 Reports	6. 最初と最後の頁 111323 ~ 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 Asada Hidetsugu, Im Dohyun, Hotta Yunhon, Yasuda Satoshi, Murata Takeshi, Suno Ryoji, Iwata So	4. 巻 30
2. 論文標題 Molecular basis for anti-insomnia drug design from structure of lemborexant-bound orexin 2 receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 1582 ~ 1589.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2022.11.001	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 Ogiso Hideo, Suno Ryoji, Kobayashi Takuya, Kawami Masashi, Takano Mikiyoshi, Ogasawara Masaru	4. 巻 27
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 ~ 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 Kota Katayama, Kohei Suzuki, Ryoji Suno, Ryoji Kise, Hirokazu Tsujimoto, Asuka Inoue, So Iwata, Takuya Kobayashi & Hideki Kandori	4. 巻 1321
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 1-12
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto, H.H., 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.	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 Nat. Struct. Mol. Biol.	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 Suzuki K., Katayama K., Sumi Y., Nakagita T., Suno R., Tsujimoto H., Iwata S., Kobayashi T., Shibata N., Kandori H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Vibrational analysis of acetylcholine binding to the M2 receptor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 12559-12567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA01030A	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5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 寿野 良二
2. 発表標題 プロスタグランジン受容体の構造解析によるシグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会 (札幌) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寿野 良二
2. 発表標題 創薬に資するGPCRの構造生物学
3. 学会等名 Neuro2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寿野 良二
2. 発表標題 構造生物学的技術によるGPCRの多様なシグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 第95回 日本生化学会（名古屋）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寿野 良二
2. 発表標題 ヒトプロスタグランジン受容体EP3-Gタンパク質複合体の構造解析
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寿野 良二
2. 発表標題 ヒトプロスタグランジンE2受容体EP3-Gタンパク質複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 寿野 良二、清水（小林）拓也	4. 発行年 2023年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 427
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	加藤 貴之 (KATO Takayuki) (20423155)	大阪大学・蛋白質研究所・教授 (14401)	
研究分担者	藤田 大士 (FUJITA Daishi) (20713564)	京都大学・高等研究院・准教授 (14301)	

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