

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18843

研究課題名(和文)薬理的に重要なGPCRのシグナルバイアスの構造生物学的解析

研究課題名(英文)Structural basis of biased signaling mediated by pharmacologically important GPCRs

研究代表者

幸福 裕 (KOFUKU, Yutaka)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任助教

研究者番号：80737940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)のリガンドには、Gタンパク質とアレスチンを介したシグナル伝達経路の一方を選択的に活性化するものが知られており、この現象を「シグナルバイアス」と呼ぶ。本研究では、薬理的に重要なGPCRについて、メチオニンメチル基に由来するNMRシグナルを、通常のリガンドが結合した状態とバイアスリガンドが結合した状態で解析した。その結果、GPCRは不活性型構造に加えて複数の活性型構造をとること、複数の活性型構造の割合がGタンパク質およびアレスチンを介したシグナル伝達の強度を決定していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：G-protein-coupled receptor (GPCR) ligands impart differing degrees of signaling in the G-protein and arrestin pathways, in phenomena called "biased signaling". However, the mechanism underlying the biased signaling of GPCRs is still unclear, although crystal structures of GPCRs bound to the G protein or arrestin are available. In this study, we observed the NMR signals from methionine residues of pharmacologically important GPCRs in the balanced- and biased-ligand-bound states. We found that the intracellular cavity of GPCRs exist in an equilibrium between closed and multiple open conformations, and that the population of each open conformation determines the G-protein- and arrestin-mediated signaling levels in each ligand-bound state.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 NMR 膜タンパク質 シグナル伝達 GPCR

## 1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、感覚受容、神経伝達、免疫応答など様々な生理応答に関与する膜タンパク質ファミリーである。市販の医薬品の約 1/3 が GPCR を標的とすることから (Rask-Andersen et al., Nat. Rev. Drug Discov., 2011)、創薬標的としても重要である。GPCR の細胞外側にリガンドが結合すると、GPCR は細胞内の G タンパク質やアレスチンなど、エフェクター分子を活性化することにより機能する。一方で、近年、GPCR のリガンドの中には、G タンパク質およびアレスチンの一方のみを選択的に活性化する、バイアスリガンドと呼ばれるものが存在することが明らかになった。例えば、 $\beta_2$  アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ AR) のリガンドであるカルベジロールは G タンパク質を活性化しない一方で、アレスチンのみを活性化 (Wisler et al., PNAS, 2007)。さらに、 $\mu$  オピオイド受容体 ( $\mu$ OR) を介して G タンパク質のみを活性化する TRV130 は、副作用の少ない鎮痛薬として開発されている (Soergel et al., J. Clin. Pharm., 2013)。このことから、バイアスリガンドは新規作用を有するリガンドとして注目されている。一方で、バイアスリガンドが GPCR に結合すると、なぜ G タンパク質とアレスチンの一方のみが活性化されるか、その分子機構は明らかでない。いくつかの GPCR について、バイアスリガンド結合状態の X 線結晶構造が得られているが、通常のリガンドと同一の構造である (Warne et al., Structure, 2012)、あるいは同一受容体で通常のリガンド結合状態の構造が解かれていない (Wacker et al., Science, 2013) ために、どの部位の構造変化がバイアスリガンドの機能に重要であるかが明らかでない。また、 $\beta_2$ AR の細胞内側に、化学修飾により  $CF_3$  基を導入しプローブとする  $^{19}F$ -NMR 解析が行われ、通常のリガンドと比較して、バイアスリガンド結合状態では第 7 膜貫通ヘリックスの細胞内側において、構造の違いがあることが見出された (Liu et al., Science, 2012)。一方で、リガンド結合部位と G タンパク質やアレスチンとの結合部位を直接連結している膜貫通領域の構造については、バイアスリガンド結合状態の知見は得られていなかった。また、GPCR で共通するシグナル選択性の機構が存在するかについても明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、薬理学的に重要な GPCR である  $\mu$ OR および  $\beta_2$ AR を解析対象とし、タンパク質のダイナミクスを解析することのできる NMR 法を適用することで、通常のリガンド結合状態、およびバイアスリガンド結合状態において、受容体膜貫通領域の動的構造がどのような変調を受けるかを解析した。それにより、異なる複数の GPCR について、バイアスリガンドが受容体に与える影響を解

析することで、GPCR 一般に適用可能な、シグナル伝達のバイアスが生じる構造生物学的機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) $\mu$ OR のメチオニン残基メチル基の NMR シグナルの解析

申請者は、最近、 $\beta_2$ AR のメチオニンのメチル基を選択的に  $^{13}C$  標識するとともに、その周囲を  $^2H$  標識する方法を新たに開発し、メチオニンのメチル基の NMR シグナルの高感度測定が可能であることを見出した (Kofuku et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2014)。そこで、この方法で標識した  $\mu$ OR を調製し、阻害剤であるナロキソンおよび完全作動薬である DAMGO 結合状態について、 $^1H$ - $^{13}C$  相関スペクトルの測定をおこなった。膜貫通領域細胞内側のメチオニンに由来するシグナルを観測するために、それ以外のメチオニンを他のアミノ酸残基に変異して、スペクトルの簡略化をおこなった。膜貫通領域細胞内側のメチオニン残基に由来するシグナルを帰属するために、1 残基ずつメチオニンを変異した試料を調製し、スペクトルを取得した。

### (2) バイアスリガンド存在下の $\mu$ OR のメチオニン残基メチル基の NMR シグナルの解析

バイアスリガンド (TRV130) 存在下における、安定同位体標識  $\mu$ OR のスペクトルを測定した。また、 $\delta$ OR にてアレスチン選択的にシグナルを伝達することが報告されている N131A 変異体に対応する、 $\mu$ OR の N152A 変異体について、完全作動薬結合状態のスペクトルを測定した。(1) で測定した通常のリガンド結合状態と比較することで、 $\mu$ OR の膜貫通領域のどの部位の構造がシグナル選択性に関与しているかを解析した。

### (3) バイアスリガンド結合状態の $\beta_2$ AR 膜貫通領域の NMR 解析

(1) と同様に、メチオニンのメチル基を選択的に  $^{13}C$  標識するとともに、その周囲を  $^2H$  標識した  $\beta_2$ AR を調製した。様々なシグナル伝達強度の異なるリガンド、およびアレスチンを選択的に活性化するバイアスリガンドを結合させた状態で、 $^1H$ - $^{13}C$  相関スペクトルの測定をおこなった。各リガンド結合状態における、膜貫通領域細胞内側のシグナルの化学シフトの違いから、通常のリガンドとバイアスリガンドで、 $\beta_2$ AR の動的構造がどのように異なるかを解析した。

## 4. 研究成果

### (1) $\mu$ OR のメチオニン残基メチル基の NMR シグナルの解析

阻害剤および完全作動薬結合状態の  $\mu$ OR の  $^1H$ - $^{13}C$  相関スペクトルでは、メチオニンの残基数に概ね対応する数の NMR シグナルを観測することに成功した。細胞外・細胞内

領域の6個のメチオニン残基を変異することで、スペクトルを簡略化し、膜貫通領域のメチオニンを選択的に観測することに成功した(図1)。また、観測されているすべてのNMRシグナルについて、どのメチオニン残基に由来するか帰属をおこなうことに成功した(図1)。

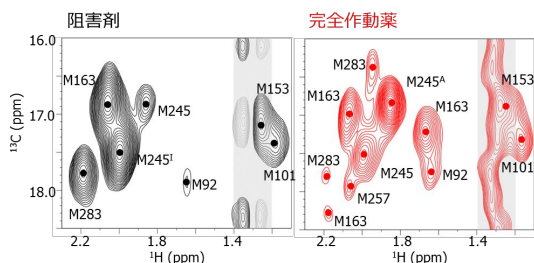


図1 細胞外・細胞内領域の6個のメチオニン残基を変異した  $\mu$ ORの $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 相関スペクトル

このうち、M245由来のシグナルに関して着目すると、阻害剤、部分作動薬、完全作動薬結合状態では、いずれも2個のNMRシグナルが観測されており、その量比はシグナル伝達強度に対応していた(図2)。このことから、 $\mu$ ORの膜貫通領域は不活性型構造と活性型構造の平衡にあり、その量比がリガンドに応じて変化するために、シグナル伝達強度が異なることが示された。

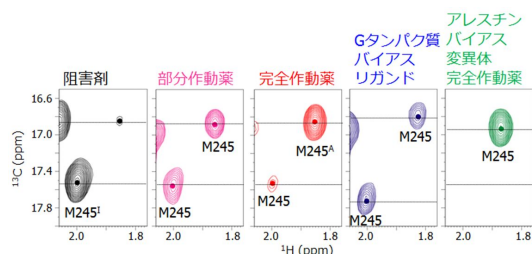


図2 様々なリガンドが結合した  $\mu$ ORのM245メチル基由来のNMRシグナル

(2) バイアスリガンド存在下の  $\mu$ ORのメチオニン残基メチル基のNMRシグナルの解析

Gタンパク質シグナルを選択的に流すバイアスリガンドが結合した状態では、同様に2個のシグナルが観測されたものの、その化学シフトが通常のリガンドと異なっていた(図2)。また、アレスチン選択的にシグナルを伝達する、 $\mu$ ORのN152A変異体について、完全作動薬結合状態のスペクトルを測定した結果、観測されたM245の化学シフトは、上述のいずれの状態とも異なっていた(図2)。そこで、活性型に対応するM245の化学シフトと、Gタンパク質・アレスチンシグナルの選択性の程度について解析したところ、両者がよく相関していた(図3)。以上のことから、 $\mu$ ORが複数の活性化構造を取り得ること、通常のリガンド結合状態とバイアスリガンド

結合状態では、この複数の活性化構造の割合が異なることが明らかになった(図4)。

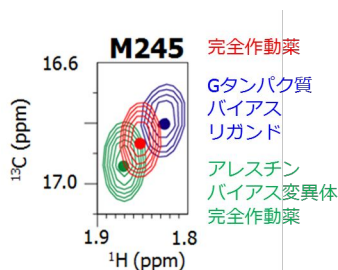


図3 活性型に対応するM245由来NMRシグナルの化学シフト

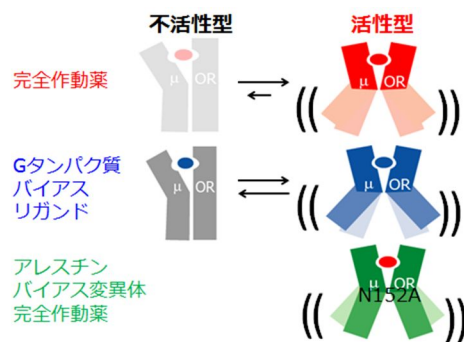


図4 NMR解析結果から示された  $\mu$ ORのシグナル選択性が生じる機構

(3) バイアスリガンド結合状態の  $\beta_2$ AR膜貫通領域のNMR解析

Gタンパク質シグナルとアレスチンシグナルとともに活性化する通常のリガンドが結合した状態では、 $\beta_2$ ARの細胞内側に位置するメチオニン残基に由来するNMRシグナルの化学シフトは、シグナル伝達活性に応じて直線的に変化した。一方で、アレスチンシグナルを選択的に流すバイアスリガンドが結合した状態では、化学シフトは通常のリガンドとは異なる方向に変化した。このことは、 $\mu$ ORと同様に、 $\beta_2$ ARの細胞内側が、複数の活性化構造を取り得ること、さらに、通常のリガンド結合状態とバイアスリガンド結合状態では、この複数の活性化構造の割合が異なることを示している。以上の結果は、GPCRに共通するシグナルバイアスの機構を示唆するものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Shuxian Huang, Ryo Umemoto, Yuki Tamura, Yutaka Kofuku, Taro Q. P. Uyeda, Noritaka Nishida, Ichio Shimada, Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for structural analysis of actin-binding proteins in complex with actin, Scientific Reports, Vol. 6, 2016, 33690,

doi: 10.1038/srep33690, 査読有  
Yuichi Minato, Shiho Suzuki, Tomoaki Hara, Yutaka Kofuku, Go Kasuya, Yuichiro Fujiwara, Shunsuke Igarashi, Ei-ichiro Suzuki, Osamu Nureki, Motoyuki Hattori, Takumi Ueda, Ichio Shimada, Conductance of P2X4 purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 113, 2016, 4741-4746, doi: 10.1073/pnas.1600519113, 査読有  
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, Ichio Shimada, Identification of a conformational equilibrium that determines the efficacy and functional selectivity of the  $\mu$ -opioid receptor, Angewandte Chemie International Edition in English, Vol. 21, 2015, 15771-15776, doi: 10.1002/anie.201508794, 査読有  
Chie Yoshiura, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Masahiko Matsumoto, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Ichio Shimada, Identification of the CCR1- and CCR5-binding modes of MIP-1 $\alpha$  by application of an NMR spectra reconstruction method to the transferred cross-saturation experiments. Journal of Biomolecular NMR, Vol. 63, 2015, 333-340, doi: 10.1007/s10858-015-9992-x, 査読有  
Takumi Ueda, Chie Yoshiura, Masahiko Matsumoto, Yutaka Kofuku, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Koh Takeuchi, Ichio Shimada, Development of a method for reconstruction of crowded NMR spectra from undersampled time-domain data, Journal of Biomolecular NMR, Vol. 62, 2015, 31-41, doi: 10.1007/s10858-015-9908-9, 査読有

[学会発表](計14件)

Takumi Ueda, Tomoaki Hara, Yuichi Minato, Shiho Suzuki, Yutaka Kofuku, Go Kasuya, Yuichiro Fujiwara, Shunsuke Igarashi, Ei-ichiro Suzuki, Osamu Nureki, Motoyuki Hattori, Ichio Shimada, Conductance of P2X4 purinergic receptor is determined by

conformational equilibrium in the transmembrane region, 58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, 2017年3月26日~31日, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, California (アメリカ合衆国)

Yutaro Shiraishi, Junya Okude, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Motohiko Sato, Naoyuki Nobuyama, Keita Kondo, Takuya Mizumura, Mei Natsume, Masahiro Maeda, Hideki Tsujishita, Takefumi Kuranaga, Masayuki Inoue, Ichio Shimada, Identification of a conformational equilibrium that determines the efficacy and functional selectivity of the  $\mu$ -opioid receptor, 58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, 2017年3月26日~31日, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, California (アメリカ合衆国)

Mei Natsume, Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Junya Okude, Yutaro Shiraishi, Keita Kondo, Takuya Mizumura, Shiho Suzuki, Ichio Shimada, Functional dynamics of deuterated  $\beta$ 2-adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR spectroscopy, 58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, 2017年3月26日~31日, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, California (アメリカ合衆国)

幸福 裕、細胞遊走因子、ケモカイン受容体の動的構造研究と創薬研究への展望、第87回日本衛生学会学術総会、2017年3月26日~28日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)

幸福 裕、上田 卓見、奥出 順也、白石 勇太郎、近藤 啓太、水村 拓也、鈴木 志歩、嶋田 一夫、昆虫細胞発現系における高度重水素標識を用いた脂質二重膜中のGタンパク質共役型受容体の動的構造解析、第55回NMR討論会、2016年11月16日~18日、広島国際会議場(広島県広島市)

Junya Okude, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Motohiko Sato, Naoyuki Nobuyama, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Takuya Mizumura, Mei Natsume, Masahiro Maeda, Hideki Tsujishita, Takefumi Kuranaga, Masayuki Inoue, Ichio Shimada, Identification of a conformational equilibrium that determines the efficacy and functional selectivity of the  $\mu$ -opioid receptor, XXVIIth International Conference on Magnetic

Resonance in Biological Systems, 2016年8月21日~26日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

Takumi Ueda, Chie Yoshiura, Yutaka Kofuku, Masahiko Matsumoto, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Koh Takeuchi, Ichio Shimada, Development of an NMR reconstruction method to elucidate the CCR1- and CCR5-binding modes of MIP-1a, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016年8月21日~26日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

Tomoaki Hara, Yuichi Minato, Shiho Suzuki, Yutaka Kofuku, Go Kasuya, Yuichiro Fujiwara, Shunsuke Igarashi, Ei-ichiro Suzuki, Osamu Nureki, Motoyuki Hattori, Takumi Ueda, Ichio Shimada, Conductance of P2X4 purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016年8月21日~26日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

大西 健人、幸福 裕、塚本 宇信、鈴木 志歩、上田 卓見、嶋田 一夫、SDF-1との二段階結合によるCXCR4のシグナル伝達機構の解明、日本薬学会第136年会、2016年3月26日~29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

佐藤 元彦、奥出 順也、延山 尚幸、上田 卓見、幸福 裕、倉永 健史、井上 将行、嶋田 一夫、オピオイド受容体(OR)の活性制御機構の解明、日本薬学会第136年会、2016年3月26日~29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
幸福 裕、上田 卓見、奥出 順也、白石 勇太郎、近藤 啓太、鈴木 志歩、嶋田 一夫、NMRを用いた脂質二重膜中のGPCRの動的構造解析、第53回日本生物物理学会年会、2015年9月13日~15日、金沢大学角間キャンパス自然科学本館(石川県金沢市)

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回日本生物物理学会年会、2015年9月13日~15日、金沢大学角間キャンパス自然科学本館(石川県金沢市)

白石 勇太郎、幸福 裕、上田 卓見、夏目 芽衣、岩井 秀夫、嶋田 一夫、区分同位体標識を用いた $\beta$ アドレナリン受容体のリン酸化のNMR解析、第53回日本生物物理学会年会、2015年9月13日~15日、金沢大学角間キャンパス自然科学本館(石川県金沢市)

水村 拓也、近藤 啓太、上田 卓見、幸福 裕、嶋田 一夫、脂質によるGPCRの活性制御機構の解明、第53回日本生物物理学会年会、2015年9月13日~15日、金沢大学角間キャンパス自然科学本館(石川県金沢市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public\\_html/index\\_j.html](http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/index_j.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

幸福 裕 (KOFUKU, Yutaka)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任助教

研究者番号：80737940