

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03163

研究課題名(和文) NTSR1-Gタンパク質複合体構造解析を突破口としたGタンパク質選択性機構の解明

研究課題名(英文) Structural analysis of NTSR1-G-protein complexes

研究代表者

加藤 英明 (KATO, Hideaki)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：80805961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ニューロテンシン受容体(NTSR1)-Gi1複合体、NTSR1-アレスチン複合体についてそのcryo-EM構造を決定し、NTSR1によるGi1タンパク質やアレスチンの認識機構や活性化機構の一端を明らかにすることに成功した。それらの結果をまとめ、学術誌Natureに2報の論文を発表するに至っている。さらに、NTSR1-GoA、Gq複合体のcryo-EM構造を決定し、Gタンパク質認識や会合における素過程のさらなる詳細解明に成功している(現在論文執筆中)。現在は、得られた構造情報を利用しin silico screeningを行うことでバイアスタロステリックモジュレーターの探索を行なっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニューロテンシン受容体1(NTSR1)は体温調節、血圧調節、摂食行動、痛覚などに関与するGPCRである。NTSR1はあらゆる種類のGタンパク質を活性化可能であるが、その構造基盤は未知であり、このことがNTSR1の生理的機能解析やNTSR1をターゲットとした創薬を困難にする一因となっている。本研究ではNTSR1と各種Gタンパク質やアレスチンの複合体構造解析を行い、その複合体構造同士を比較することで、NTSR1が持つGタンパク質やアレスチン認識の分子基盤の一端を明らかにした。こうした成果は、将来的に毒性や副作用の少ない鎮痛剤、摂食障害やがん、統合失調症などの治療薬開発に結びつく可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We determined the cryo-EM structures of the neurotensin receptor (NTSR1)-Gi1 and NTSR1-arrestin complexes and revealed the recognition and activation mechanisms of Gi1 protein and arrestin by NTSR1. These results have been published in two papers both in Nature. Furthermore, we have determined the cryo-EM structure of the NTSR1-GoA, and Gq complexes and have succeeded in revealing the details of the activation process of G proteins (paper in preparation). Currently, we are also searching the novel allosteric modulators by in silico screening, using the structural information we have obtained.

研究分野：構造生命科学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 GPCR ニューロテンシン受容体 Gタンパク質 アレスチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニューロテンシン(NT)は、脳内において神経伝達物質やニューロモジュレーター、消化管をはじめとする抹消器官においてホルモンとして働く、13 アミノ酸からなるペプチドである。NT は体温調節、血圧調節、摂食行動、痛覚、薬物依存、がん細胞の増殖、パーキンソン病や統合失調症など様々な生理機能や疾患に関与することが報告されているが、その大部分の機能は、3種類存在する NT 受容体のうち特にニューロテンシン受容体 1(NTSR1)の活性化に由来すると考えられている(Boules et al., *Front. Endocrinol*, 2013; Wu et al., *Front. Endocrinol*, 2013; Schroeder et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2018)。NTSR1 は、1990 年に京都大学の中西重忠博士の研究室によって発見された G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、受容体の基質結合部位に NT が結合することで三量体 G タンパク質が活性化される。三量体 G タンパク質には G_s 、 $G_{i/o}$ 、 $G_{q/11}$ 、 $G_{12/13}$ の 4 つのファミリーが存在しており、それぞれアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性化、AC の抑制、ホスホリパーゼ C の活性化、RhoGEF の活性化などの働きを持つが、中でも NTSR1 は $G_{q/11}$ ファミリータンパク質を強く活性化することが知られていた。しかし近年、NTSR1 は G_q のみならず、 G_s 、 $G_{i/o}$ 、 $G_{12/13}$ といったあらゆる G タンパク質を活性化可能であるという報告がなされ、その複雑なシグナル経路、および NTSR1 の寛容な G タンパク質認識の構造基盤に注目が集まっている(Besserer-Offroy, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 2017)。中でも特に、NTSR1 による G_i シグナルの活性化は、ERK1/2 のリン酸化を介して一部のがん細胞の増殖シグナルとして働くことが指摘され、 G_q シグナルとともに重要視されている(Ouyang et al., *Mol. Cancer.*, 2015)。NTSR1 の構造情報については、単体の結晶構造こそ複数解明されているものの(White et al., *Nature*, 2012; Egloff et al., *PNAS*, 2014)、G タンパク質との複合体構造に関しては成功例が存在せず、NTSR1 による G タンパク質の認識機構は全くの未知であった。また、現在までに構造解析に成功している NTSR1 は全て複数の熱安定性変異を導入したラット由来 NTSR1 であったため、薬理学的特性の違いから、安定性変異を導入していないヒト由来 NTSR1 (hNTSR1)の構造情報が望まれていた。

2. 研究の目的

我々は上記の背景を踏まえ、「hNTSR1 と複数のシグナル因子複合体の立体構造を決定し、その比較を行うことで G タンパク質やアレチン選択性の分子機構を明らかにする」ことが NTSR1 研究、ひいては GPCR 研究の次なるフロンティアであると着想するに至った。また、NTSR1 による G タンパク質シグナルの活性化は様々な生理機能や疾患に関与することが報告されている一方、どちらのシグナルがどの生理現象や疾患に重要なのかという知見はまだ不足している。そこで本研究では、得られた複合体構造を比較することで G タンパク質特異的な相互作用を見出し、その相互作用を阻害する低分子化合物やペプチドの設計を目指す。これは、実現すれば hNTSR1 の持つ複雑な G タンパク質シグナルを紐解くための強力なツールとなるばかりか、hNTSR1 の持つ多様な生理機能のうち、疾患治療という視点から有用と思われる生理機能のみを特異的に発現させる、理想的な治療薬になる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

本研究では、

- (1) hNTSR1- G_{i1} 複合体のクライオ電子顕微鏡(cryoEM)構造解析
- (2) hNTSR1-アレチン複合体のクライオ電子顕微鏡(cryoEM)構造解析

(3) 得られた構造の比較に基づく、特定の G タンパク質との結合を選択的に阻害する低分子化合物、ペプチドの設計

という 3 つの手法を用いて NTSR1 による G タンパク質やアレスチンの認識機構解明と、その選択的制御方法の開発を目指した。

4. 研究成果

(1) hNTSR1-G_{i1} 複合体のクライオ電子顕微鏡(cryoEM)構造解析

NTSR1-G_{i1} 複合体について、その cryo-EM 構造を 2 状態にて決定することに成功している(図 1)。また、得られた構造情報に基づき各種細胞アッセーと計算科学シミュレーションを用いた解析を行うことで、得られた 2 状態のうち一方の状態が G タンパク質活性化における完全活性化状態、他方の状態が中間体状態であることを示すことに成功した。本結果は、世界に先駆けて GPCR-G タンパク質の活性化中間体構造を高分解能で決定することに成功したとして高く評価され、学術誌 Nature に掲載された。

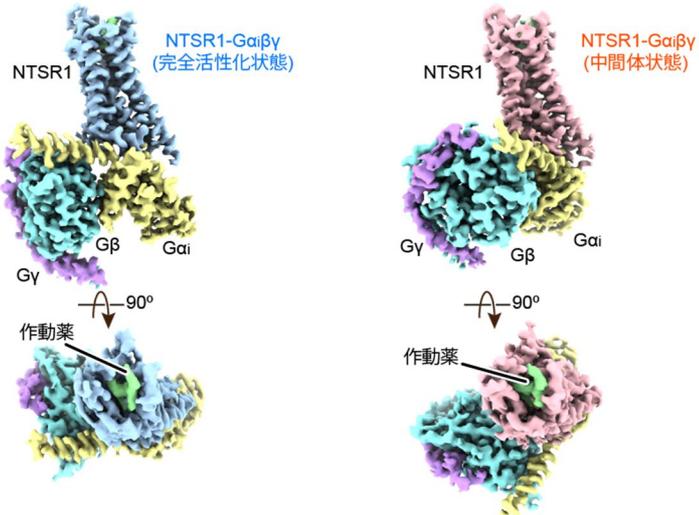


図 1 NTSR1-G_{i1} 複合体の 2 状態 cryo-EM 構造。

(2) hNTSR1-アレスチン複合体のクライオ電子顕微鏡(cryoEM)構造解析

NTSR1-アレスチン 2 複合体について、その cryo-EM 構造を決定し、NTSR1 によるアレスチン認識の構造基盤を明らかにすることに成功した(図 2)。とりわけ、先行研究にて報告されたロドプシン-アレスチン複合体と比較してアレスチンの GPCR に対する相対的角度が異なっていたことは、GPCR によるアレスチン認識の多様性を示したという意味で大きな意義を持っていた。さらに、GPCR とアレスチンの相互作用海面には PIP2 が結合しており、これがアレスチンの結合、活性化に重要であることを示すことに成功した。本結果は、世界に先駆けて(rhodopsin ではない) typical GPCR によるアレスチンの認識構造基盤を解明することに成功したとして高く評価され、学術誌 Nature に掲載された。

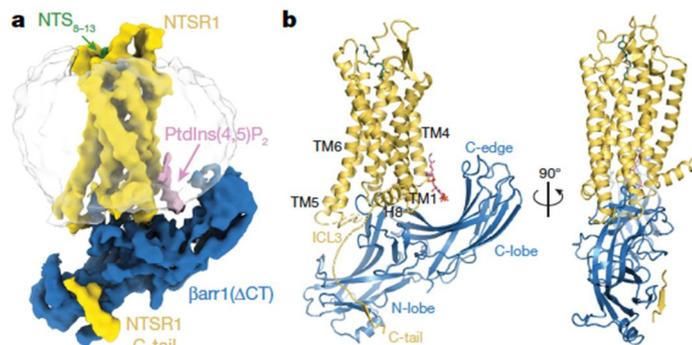


図 2 NTSR1-アレスチン複合体の cryo-EM 構造。

この結果は、世界に先駆けて(rhodopsin ではない) typical GPCR によるアレスチンの認識構造基盤を解明することに成功したとして高く評価され、学術誌 Nature に掲載された。

(3) 得られた構造の比較に基づく、特定の G タンパク質との結合を選択的に阻害する低分子化合物、ペプチドの設計

NTSR1-G_{i1} 複合体、NTSR1-アレスチン 2 複合体の構造情報に基づき、in silico での virtual screening を行うことで、「アレスチン 2 の結合は阻害しないが、G_{i1} タンパク質の結合は阻害するようなバイアスタロステリックモジュレーター」の探索を行なった。この際、化合物ライブラリーとしては AMED-BINDS の枠組みを利用し、東大創薬機構の所持するものを使用した。スコアの高い 30 のヒット化合物について、細胞を用いたアッセー系(NanoBiT G-protein dissociation assay)によって、同化合物が実際に G_{i1} タンパク質シグナルを阻害するかの実験的検証を行なったが、現在まで顕著な効果を示す化合物の同定には至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Hideaki E., Zhang Yan, Hu Hongli, Suomivuori Carl-Mikael, Kadji Francois Marie Ngako, Aoki Junken, Krishna Kumar Kaavya, Fonseca Rasmus, Hilger Daniel, Huang Weijiao, Latorraca Naomi R., Inoue Asuka, Dror Ron O., Kobilka Brian K., Skiniotis Georgios	4. 巻 572
2. 論文標題 Conformational transitions of a neurotensin receptor1-Gi1 complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 80~85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1337-6	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 該当する

1. 著者名 Huang Weijiao, Masureel Matthieu, Qu Qianhui, Janetzko John, Inoue Asuka, Kato Hideaki E., Robertson Michael J., Nguyen Khanh C., Glenn Jeffrey S., Skiniotis Georgios, Kobilka Brian K.	4. 巻 579
2. 論文標題 Structure of the neurotensin receptor 1 in complex with -arrestin 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 303~308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-1953-1	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 11件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 CryoEM analysis of the GPCR neurotensin receptor 1 signaling complexes
3. 学会等名 東京大学 医学部リサーチカンファ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Kato
2. 発表標題 Structural basis for the recognition of salient signals by GPCRs
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 CryoEM analysis of the GPCR neurotensin receptor 1 signaling complexes
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 CryoEM analysis of the GPCR neurotensin receptor 1-G protein complex for the future engineering of biased allosteric modulator
3. 学会等名 第418回 CBI学会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structural and conformational transition in NTSR1-Gi1 protein complex
3. 学会等名 名古屋工業大学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structural and conformational transition in NTSR1-Gi1 protein complex
3. 学会等名 金沢大学 NanoLSIセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structural and conformational transition in NTSR1-Gi1 protein complex
3. 学会等名 東京大学 第1292回生物科学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structural and conformational transition in NTSR1-Gi1 protein complex
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structural and conformational transition in NTSR1-Gi1 protein complex
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Kato
2. 発表標題 CryoEM analysis of the GPCR neurotensin receptor 1-G protein complex
3. 学会等名 The Joint Symposium on Fusion of Biomedical and Physical/ Informational Sciences in Neurobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Kato
2. 発表標題 CryoEM analysis of the GPCR neurotensin receptor 1-G protein complex for the future engineering of biased allosteric modulator
3. 学会等名 AHeDD2019/IPAB2019 Joint Symposium (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松井俊貴, 小柳淳暉, 加藤英明	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊「細胞」2021年 5月号 Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) の新展開	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ニューロテンシン受容体によるGタンパク質活性化機構の解明研究成果 https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0109_00184.html</p>
--

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

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

米国	Stanford University			
----	---------------------	--	--	--