

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H03428

研究課題名（和文）バイアスリガンド開発に資するG蛋白質/アレスチン-GPCR複合体の構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of G protein/Arrestin-GPCR complex for development of biased ligands

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） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：数種類あるGタンパク質のうち、OX2R、EP3それぞれと最も安定な複合体を形成する条件を選別する。EP3-GiおよびGo,G13複合体、OX2R-Gi/o複合体について条件検討を重ね、安定な複合体条件を見出しており、EP3-GiについてはCryo-EM SPAにより3.4 Å分解能で構造決定できた。我々のグループでは別のサブタイプEP4-Gタンパク質との複合体構造も決定しており、Gタンパク質の種類が異なることからプロスタグランジン受容体のGタンパク質選択性の構造基盤について薬理学的解析を加えることで議論した論文を出版した（Suno R., Cell Reports, 2022）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gタンパク質共役受容体（GPCR）は創薬ターゲットとして知られており、その構造情報は副作用のない薬剤の合理的な開発に有用な情報となる。一つのGPCRに対してGタンパク質やアレスチンなどのシグナル伝達因子を活性化することで生体内に異なるシグナルを伝達する。これらを制御することで目的の薬剤効果を発揮し、副作用を軽減することが期待される。本研究では異なるGタンパク質を活性化する2種のプロスタグランジン受容体の構造を決定し、これらのシグナル伝達の選択性に重要なアミノ酸を発見した。この研究技術は構造情報の有用性を示しており、他のGPCRにも応用できる。

研究成果の概要（英文）： Among several types of G proteins, we select the conditions that form the most stable complexes with OX2R and EP3, respectively, and have found stable complex conditions for the EP3-Gi and Go,G13 complexes and the OX2R-Gi/o complex, and for EP3-Gi, the structure was determined at 3.4 Å resolution by Cryo-EM SPA. The structure of EP3-Gi was determined at 3.4 Å resolution by Cryo-EM SPA. Our group has also determined the complex structure with another subtype of EP4-G protein and published a paper discussing the structural basis of G-protein selectivity of prostaglandin receptors based on different G-protein types with pharmacological analysis (Suno R., Cell Reports, 2022).

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

1. 研究開始当初の背景

バイアスリガンドは特定のシグナルのみを活性化することにより、そのシグナル固有の細胞機能を発現し、受容体の機能が詳細に解明でき、副作用が軽減されることが期待され、病気の治療に有用である。バイアスリガンドは受容体を特定の構造に安定化し、一つのシグナルのみ伝達すると考えられている。一つのリガンド結合で複数のシグナルが伝達されることが副作用の原因となることが知られており、バイアスリガンドは創薬に極めて重要である。実際、いくつかの受容体ではバイアスリガンドが治療薬として開発されている (Violin, J.D. et al., *Trends Pharmacol. Sci.* (2014))。しかし、合理的にバイアスリガンドを設計することは困難で、実際には膨大な化合物スクリーニングを行う。一方、構造情報を基盤とした薬剤開発 (Structure based drug design; SBDD) によるバイアスリガンド開発が求められている。つまり、G 蛋白質あるいはアレスチン結合 GPCR 複合体の立体構造を解明し、それぞれの状態のリガンド結合ポケットに特異的に結合する化合物設計を行う。さらに近年、Cryo-EM 単粒子解析の高分解能化によって、GPCR 複合体の原子分解能構造解析は現実的な技術になってきた。これまでに複合体構造解析にはいくつかのグループが成功している (Safdari H. A., et al., *Trends Cell Biol.* (2018))。これらの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 蛋白質の種類および受容体によって G 蛋白質の結合様式が異なることがわかってきた。しかし、バイアスリガンド設計のためには、同一の GPCR で G 蛋白質とアレスチンの複合体構造を決定し、比較する必要がある。これまでに同一の受容体で 2 つの複合体構造を決定したのはロドプシンのみである。現状ではバイアスリガンド開発や、G 蛋白質およびアレスチンの詳細なシグナル伝達機構の解明のための GPCR 複合体の構造解析は不十分である。G 蛋白質は G α , G β , G γ からなるヘテロ三量体を形成し、G α は数種類 (Gs, Gi/o, Gq/11, G12/13 など)、アレスチンは三種類ある。GPCR によって共役する G α の種類は異なるので、様々な組み合わせで構造解析をすることが、薬剤開発やシグナル伝達機構解明に重要である。特に G 蛋白質のうち Gq/11 や G12/13 と GPCR の複合体構造解析は全くなされず、そのシグナル伝達機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は作動薬、G 蛋白質およびアレスチン結合 GPCR 複合体の構造を決定し、その構造情報から、以下の4つを目的とする (図1)。

OX2Rと様々な作動薬の結合様式、作動薬結合依存的な構造変化の解明。

G蛋白質あるいはアレスチン結合状態のGPCRの構造変化と作動薬結合様式の

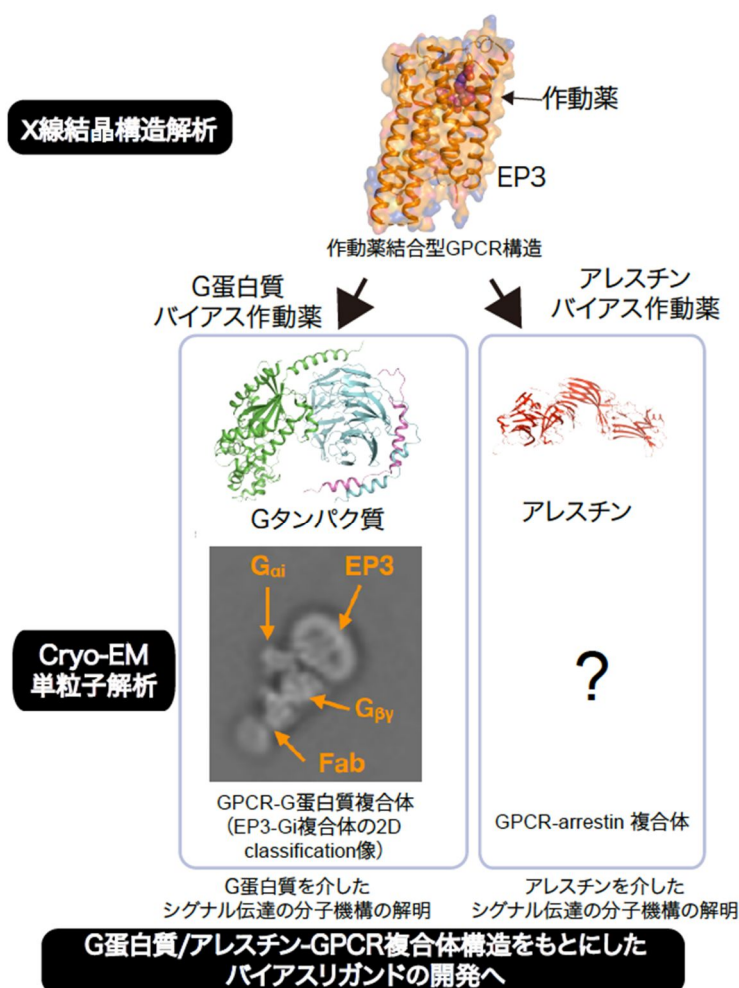


図1. 本研究の目的

解明。

これらを含めたGPCRのシグナル伝達の分子機構の解明。
の情報を元にしたバイアスリガンド開発

3. 研究の方法

以下の4つ方法での研究を遂行する。

作動薬結合型 OX2R の X 線結晶構造解析。

G 蛋白質 (Gi/o、Gq、G12/13) 結合型 GPCR の Cryo-EM 単粒子解析。

アレスチン結合型 GPCR の Cryo-EM 単粒子解析。

バイアスリガンドの合成と薬理的評価

作動薬結合型 OX2R の X 線結晶構造解析

OX2R は食欲や覚醒・睡眠の制御を行い、特にナルコレプシーの発症に関わる。ナルコレプシーは視床下部におけるオレキシンの産生不全が原因で、強烈的な眠気に襲われる脳疾患であり、治療薬は OX2R の作動薬開発が有効である。研究分担者および研究協力者ら（斉藤、長瀬、柳沢）はナルコレプシー治療薬開発を目的として数千種類の様々な骨格の OX2R 作動薬を開発している。OX2R は作動薬結合型構造が未知であるが、申請者は作動薬存在下での OX2R の結晶を得ている。良好な結果が得られなかった場合はさらにコンストラクトを検討する。さらに、様々な骨格の高親和性作動薬を用いて結晶化する。得られた構造情報から、作動薬の結合様式や作動薬結合依存的な構造変化を解明する。

OX2R/EP3-G 蛋白質複合体の Cryo-EM 単粒子解析

数種類ある G 蛋白質のうち、OX2R、EP3 それぞれと最も安定な複合体を形成する条件を選別する。そのうち EP3-Gi 複合体はすでに条件検討を重ね、Cryo-EM 単粒子解析で良好な結果が得られている（図 1、2D classification）。この条件検討の実績を生かしてその他の G 蛋白質と OX2R および EP3 の複合体形成を検討し、Cryo-EM 単粒子解析を行う。Gq、G12/13 と安定な複合体を形成しなかった場合は、ファージディスプレイによる試験管内人工進化法により受容体と強く結合する G 蛋白質を開発する。得られた構造情報から G 蛋白質結合状態のリガンド結合様式やシグナル伝達機構を解明する。

OX2R/EP3-アレスチン複合体の Cryo-EM 単粒子解析

複数のアレスチンを用いて GPCR と安定な複合体を形成する条件を検討し、Cryo-EM による単粒子解析を行う。野生型 GPCR とアレスチンが安定な複合体が形成されなかった場合は、既知のアレスチン相互作用ドメインを GPCR の C 末端に導入することにより複合体を作製する。アレスチン結合状態でのリガンド結合様式、シグナル伝達の分子機構を解明する。

バイアスリガンドの合成と薬理的評価

OX2R については ~ の情報を筑波大にフィードバックし、新規構造の化合物合成、薬理的な評価、マウスを用いた動態などの実験を行う。より選択性が高く、副作用の少ないバイアスリガンドの創出を目指す。EP3 については BINDS の支援事業を利用して、化合物合成を行う。

4. 研究成果

作動薬結合型 OX2R の X 線結晶構造解析

共同研究者である齊藤(筑波大学 IIS)等に供給していただいた OX2R リガンドを用いて結晶を得たが、2つの別のグループが作動薬結合状態の OX2R-Gi もしくは Gq 複合体構造をクライオ電子顕微鏡で決定した。この状況を踏まえて作動薬結合状態の OX2R の X 線結晶構造解析を中止した。

OX2R/EP3-G 蛋白質複合体の Cryo-EM 単粒子解析

で述べたように他グループから OX2R-G タンパク質複合体構造が報告されたため、EP3 - G タンパク質複合体の Cryo-EM SPA に集中した。EP3 はすでに N 末端や C 末端の長さを検討した EP3-BRIL というコンストラクトで我々のグループが X 線結晶構造を決定した (Morimoto K., et al., Nat Chem Biol 2019)。BRIL は結晶化のために EP3 の第三細胞内ループに導入した誘導体で、G タンパク質との複合体形成のサンプルでは BRIL を除いて野生型に戻したものを用了。このコンストラクトの N 末端には FLAG タグが、C 末端には GFP-His10 が融合されている。昆虫細胞 Sf9 を用いて発現し、Ni-NTA、FLAG 抗体カラムを用いて精製し、EP3-GFP を得た。G タンパク質複合体は大腸菌で G タンパク質を精製し、Sf9 で G を精製して混合することによってヘテロ三量体 G タンパク質を調製した。その際、ヌクレオチドを完全に除去するためにアピラーゼを添加した。精製した EP3-GFP とヘテロ三量体 G タンパク質を EP3 内在性作動薬 PGE 存在下で混合し、GFP 抗体カラムで精製した。あらかじめ EP3 と GFP の間に 3C プロテアーゼサイトを導入し、GFP 抗体カラムからの溶出は 3C プロテアーゼの切断によって実現した。得られた複合体を安定化するために G タンパク質に結合する scFv16 抗体を添加し、ゲルろ過 HPLC クロマトグラフィーを用いて複合体のピークのみを分取し、5~10mg/ml まで濃縮して電顕サンプルとした。大阪大学蛋白質研究所の 200KeV 電顕 (Talos) で電顕グリッドの質を確認した後、300keV 電顕 (Titan) で大量データの収集を行った。得られたデータを解析し、3.4Å の電子マップを得た。このマップに対して

モデリングし、EP3-Gi 複合体構造を決定した。プロスタグランジン受容体-G タンパク質複合体の構造比較と薬理的解析によって、2つの G タンパク質シグナル選択性に重要なアミノ酸を明らかにした。具体的には、第 5 膜貫通領域 (TM5) の 5.68 (BW 番号) と第 2 細胞内ループ (ICL2) の 34.51 である。5.68 の位置は

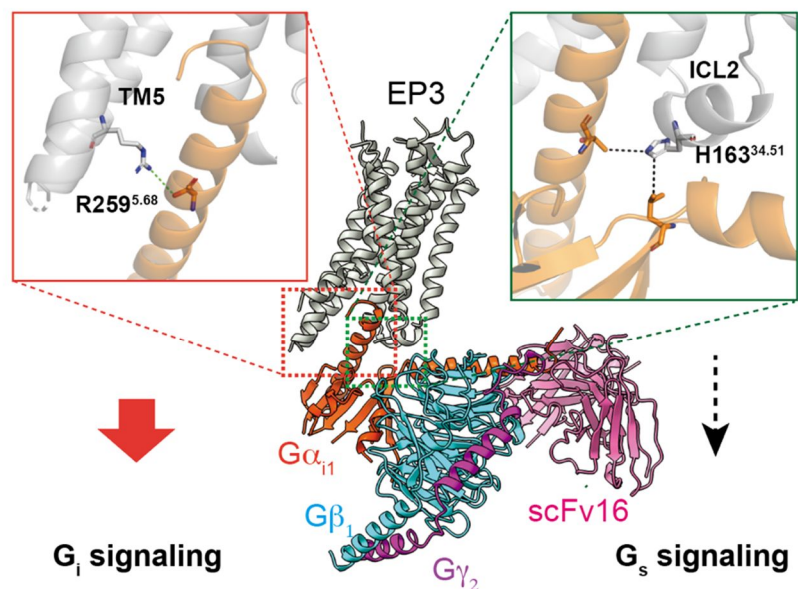


図 2

EP3 では 259 番目のアルギニン残基 (R259) で、アルギニン残基の側鎖が Gi の 340 番目のスレオニン残基 (T340) の側鎖と水素結合していた。EP4 では対応するアミノ酸は 213 番目のメチオニン残基 (M213) で、M213 は G_s の 384、385 番目のグルタミ

ン、アルギニン残基 (Q384、 R385) と相互作用する。 EP4 において M213 をアルギニンに置換した変異体 M213R は、 EP4 の G_sシグナル活性を大きく減少し、構造情報を見ると 5.68 の位置にアルギニン残基があるとその側鎖が特に R385 の側鎖と立体障害や正の電荷の反発などが生じる可能性があった。このことから 5.68 の位置がアルギニン残基の受容体は G_sシグナルを示さず、 G_iシグナル活性は示せることが示唆された。 34.51 の位置のアミノ酸は、 G_iと共役する EP3 ではヒスチジン残基であり、 G_sと共役する EP2、 EP4 ではチロシン残基であった。 EP3 の 34.51 をチロシン残基にした変異体は本来示さない G_sシグナル活性を示したことから、この位置のアミノ酸が G_s共役に重要であることが示唆された (図 2)。この内容で論文発表した (Suno R., et al., Cell Reports 2022)。

OX2R/EP3-アレスチン複合体の Cryo-EM 単粒子解析

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 OX2R, EP3, その他の GPCR A について検討した。GPCR A を用いた実験が最も進んだのでそちらの結果を述べる。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 A 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 A-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、OX2R, EP3 にも応用する。あらゆる GPCR の構造を決定する。

バイアスリガンドの合成と薬理的評価

現在までの成果として EP3-G タンパク質複合体の構造解析のみであるため、構造情報を元にしたバイアスリガンドの開発には至らなかった。本研究の研究期間内に別のプロジェクトとして立ち上がった学術変革領域 B「マルチスケールな生理作用の因数分解基盤構築」において、オピオイド受容体のバイアスリガンド結合状態の構造解析プロジェクトを推進した。OX2R, EP3 についてもオピオイド受容体で得られた知見をもとにバイアスリガンドの開発を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sunno 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 -

1. 著者名 Nojima Shingo, Fujita Yoko, Kimura Kanako Terakado, Nomura Norimichi, Suno Ryoji, Morimoto Kazushi, Yamamoto Masaki, Noda Takeshi, Iwata So, Shigematsu Hideki, Kobayashi Takuya	4. 巻 29
2. 論文標題 Cryo-EM Structure of the Prostaglandin E Receptor EP4 Coupled to G Protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 252 ~ 260.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2020.11.007	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 Katayama Kota, Suno Ryoji	4. 巻 12
2. 論文標題 The Biophysical Society of Japan (BSJ) ? Miyazaki Meeting, September 2019 Session 1SHP?frontier of structure-function studies to unveil diverse GPCR signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 271 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00689-2	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 Kohei, Katayama Kota, Sumii Yuji, Nakagita Tomoya, Suno Ryoji, Tsujimoto Hirokazu, Iwata So, Kobayashi Takuya, Shibata Norio, Kandori Hideki	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katayama Kota, Suzuki Kohei, Suno Ryoji, Tsujimoto Hirokazu, Iwata So, Kobayashi Takuya, Kandori Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Ligand Binding-Induced Structural Changes in the M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor Revealed by Vibrational Spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 7270 ~ 7276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.9b02942	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9件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1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

1. 発表者名 寿野 良二
2. 発表標題 構造情報から読み解くGPCR活性化機構 - 創薬に貢献するヒトGPCRの構造解析 -
3. 学会等名 第93回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryoji Suno
2. 発表標題 Structural insights into the subtype-selective antagonist binding to the M2 muscarinic receptor.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor laboratory Asia Meeting, Membrane Proteins: from Physiology to Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寿野 良二
2. 発表標題 理論的予測法を用いた熱安定化GPCRの構造解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寿野 良二
2. 発表標題 理論計算による熱安定化ムスカリンM2受容体の選択的アンタゴニストAF-DX 384結合型構造
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2019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	斉藤 毅 (SAITO Tsuyoshi) (80609933)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授 (12102)	

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