

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03375

研究課題名（和文）核磁気共鳴法によるG蛋白質共役型受容体の活性制御機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of GPCR signaling regulation mechanism by NMR

研究代表者

上田 卓見（Ueda, Takumi）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・准教授

研究者番号：20451859

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：BMS-986122は、 μ オピオイド受容体（mOR）に非競合的に作用すること、および薬効度が最も高い薬物が結合した mOR のシグナル伝達活性をさらに上昇させることが報告されている。本研究では、mOR のメチオニン残基を観測する NMR 解析を、各種リガンドと BMS-986122 が存在する条件下で行った。その結果、BMS-986122 が、T162 がある TM3 と、活性と関連する構造平衡が観測された TM6 の相互作用に摂動を与えることで、複数の活性型構造の中でも細胞内側がより開いた完全活性型構造を安定化することで、薬物が結合した mOR のシグナル伝達活性をさらに上昇させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCR を標的とする医薬品は、GPCR の細胞外側に存在するポケットに結合して GPCR を活性化する。しかし、既存薬は GPCR の活性を十分に引き出すことができないことから、このポケット以外の場所に結合して作用するアロステリック薬剤の実用化が期待されている。本研究の成果により、アロステリック薬剤が GPCR に対してその構造平衡状態を変え、既存薬の限界を超えて活性を上昇させることができる可能性が示された。したがって、本研究の成果は、これまで十分な薬効を持つ医薬品が見つかっていない GPCR 関連疾病に対し、十分な薬効を示す新しい医薬品開発に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：BMS-986122 is reportedly non-competitively bound to mu opioid receptor (mOR) and increase the signaling activity of mOR bound to the full agonist. In this study, we observed resonances from methionine residues of mOR in the presence of BMS-986122 and various ligands. Our study revealed that BMS-986122 enhances the signaling activity of mOR bound to the full agonist by perturbing the interaction between TM3 and TM6, in which signaling activity-related conformational dynamics was observed, and stabilizing the fully active state, in which the intracellular region adopts open conformation,

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR GPCR 膜タンパク質 動的構造平衡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は様々な神経伝達物質やホルモン等の受容体であり、現在市販されている 30% 以上の医薬品は GPCR を標的とする。GPCR はリガンド結合により活性化すると、G 蛋白質を活性化して、cAMP の濃度変化等を誘起する。また、活性化された GPCR は、アレスチンを活性化して、G 蛋白質とは別の細胞内シグナルを誘起する。GPCR は、リガンド非存在下でも弱く細胞内シグナルを誘起することが知られており、基礎活性と呼ばれる。また、GPCR を内在性の完全作動薬より弱く、部分的に活性化するリガンドが存在することが知られている。このような薬効度の違いは、医療にも活用されており、例えば β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) では、完全作動薬が急性の喘息に有効である一方、慢性的な治療では副作用の小さい部分作動薬が有効であることが報告されている。また、G 蛋白質シグナルとアレスチンシグナルの一方を選択的に活性化する GPCR リガンドが存在することが知られており、バイアスリガンドと呼ばれている。バイアスリガンドは、有用な薬効を持つ薬剤になると考えられている。例えば、代表的な GPCR である μ オピオイド受容体 (μ OR) のリガンドにおいて、G 蛋白質をより強く活性化するリガンドは、鎮痛作用を誘起する一方、副作用を誘起しにくいことが知られている。

現在までに、様々な GPCR について、逆作動薬が結合した不活性型の構造および完全作動薬と G 蛋白質やアレスチン結合した活性型の構造が報告されている。これらの構造により、P/I/F モチーフを含む、膜貫通領域全域に分布する GPCR 間で広く保存された残基群が活性化に伴い構造変化して、G 蛋白質やアレスチンの活性化が可能となることが示されている。しかし、不活性型および活性型の静的構造だけでは、薬効度やリガンドバイアスを説明できない。

応募者は、核磁気共鳴法 (NMR 法) を用いて、 β_2 AR および μ OR における P/I/F モチーフの構造を反映するメチオニン残基を、薬効度やシグナル選択性が異なる様々なリガンドが結合した状態で観測した。その結果、1. β_2 AR および μ OR は不活性型と活性型に対応する複数の構造の動的平衡状態にあること、2. 基礎活性は活性型が低い割合で存在することに起因すること、3. 各リガンド結合状態における活性型の割合が薬効度を規定すること、4. μ OR は G 蛋白質シグナルに有利な活性型とアレスチンシグナルに有利な活性型の平衡状態にあり、両状態の割合がシグナル選択性を規定することを明らかにした (図 2, Nat. Commun. 2012 & 2018、Angew. Chem. Int. Ed. 2014 & 2015)。このような知見は、静的な立体構造情報を与える X 線結晶構造解析や極低温顕微鏡解析では得られないものである。上記の研究をさらに発展させて、 β_2 AR や μ OR の活性を規定する分子全体における動的構造平衡を明らかにした上で、分子全体の構造平衡が、生理的リガンドと非競合的に作用するリガンドの結合や活性を変える変異の導入によりどのように変調するかを解析すれば、薬効度やシグナル選択性の制御機構が解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、 β_2 AR および μ OR の薬効度やシグナル選択性を規定する、分子全体における動的構造平衡を明らかにすること、および分子全体の構造平衡が、活性を変える変異や生理的リガンドと非競合的に作用するリガンドによりどのように変調するかを明らかにすることにより、GPCR の薬効度やシグナル選択性の制御機構を解明することを目的とする

3. 研究の方法

(1) 【 β_2 AR および μ OR の各モチーフの構造を反映する NMR シグナルの観測、帰属】

β_2 AR および μ OR のアラニン残基の変異体の NMR スペクトルを取得して、変異導入前と比較することにより、各アラニン残基の NMR シグナルを帰属する。また、活性および収量・安定性に影響ない変異を導入することで、シグナルの縮重を軽減する。以上により、活性化に伴い構造変化する領域のアラニン残基に由来する NMR シグナルの観測を可能とする。

(2) 【各リガンド結合状態の β_2 AR および μ OR のシグナルの観測】

(1) で観測および帰属を行った NMR シグナルを、完全作動薬、部分作動薬、各種バイアスリガンドの存在下で観測する。

(3) 【活性を変調する変位を導入した β_2 AR のシグナルの観測】

1. β_2 AR の P/I/F モチーフと NP_{xxx}Y モチーフの間に位置する L124 への変異導入により、G 蛋白質活性化能を保持したままアレスチン活性化能が顕著に低下することが報告されている。そこで、アレスチンの活性化に重要なモチーフ構造を同定するために、L124 の変異体に対して (2) の実験を行い、変異導入に伴う構造平衡の変化を調べる。

(4) 【非競合性リガンド結合状態の μ OR のシグナルの観測】

薬理的解析により、複数のリガンドがモルヒネ等の従来の μ OR リガンドに対して非競合的

に作用して、 μ OR の活性を正に制御することが報告されている (Livingston et al. Mol. Pharmacol. (2018) 93, 157-167)。非競合リガンドには、受容体のアゴニストに対する親和性と、受容体のシグナル伝達活性を両方変調できるという、通常の GPCR リガンドにはない特徴があるため、その活性制御機構は重要である。そこで、非競合リガンドを添加した条件で (2) の実験を行い、リガンド結合部位の同定および構造平衡の変化の検出を行う。

(5) 【 β_2 AR および μ OR の構造平衡モデルの構築】

マルコフ連鎖モンテカルロ法を利用して、(2)~(4) で取得した NMR シグナルを再現できるような構造平衡モデルを構築する。得られた結果に基づいて、 β_2 AR および μ OR が G 蛋白質シグナルとアレスチンシグナルの一方を選択的に活性化するメカニズムを考察する。

4. 研究成果

(1) 【 β_2 AR および μ OR の各モチーフの構造を反映する NMR シグナルの観測、帰属】

β_2 AR に関しては、部分重水素化およびチロシン残基の主鎖 ^{15}N 標識を施した β_2 AR の NMR スペクトルを測定して、残基数に対応する数のシグナルを観測した。各チロシン残基の変異体のスペクトルを測定して、野生型と比較することにより、モチーフ近傍に位置する 3 残基のシグナルを帰属することに成功した。 μ OR に関しては、膜貫通領域上の 6 つの残基にメチオニン残基を変異導入した μ OR の NMR スペクトルを測定して、シグナルを帰属した。

(2) 【各リガンド結合状態の β_2 AR および μ OR のシグナルの観測】

β_2 AR に関しては、(1) で帰属したチロシン残基の NMR シグナルを、逆作動薬結合状態と作動薬結合状態で観測した。その結果、作動薬結合状態では、いずれのシグナルも逆作動薬結合状態と比較して広幅になっており、モチーフが特定の構造に安定化されておらず、構造多型が存在することが示唆された。 μ OR に関しては、完全作動薬結合状態と部分作動薬結合状態、およびシグナル伝達活性が向上する変異を導入した状態で、各メチオニン残基の NMR シグナルを測定した。その結果、モチーフの近傍に位置する残基のシグナルが三つ観測され、各シグナルの相対強度がシグナル伝達活性に対応して変化することが観測された。これらの結果から、 μ OR が不活性化型、部分活性化型、活性化型の間の構造平衡状態にあり、各状態の存在割合がシグナル伝達活性を規定していることが示唆された。

(3) 【非競合性リガンド結合状態の μ OR のシグナルの観測】

BMS-986122 は、 μ OR に非競合的に作用すること、および薬効度が最も高い薬物が結合した μ OR のシグナル伝達活性をさらに上昇させることが報告されている。今年度は、BMS-986122 が μ OR のシグナル伝達活性を制御するメカニズムを解明するために、 μ OR のメチオニン残基を観測する NMR 解析を、各種リガンドと BMS-986122 が存在する条件下で行った。その結果、M283 等の NMR シグナルに、シグナル伝達活性と対応する変化が観測され(図 1)、 μ OR が、不活性化構造、部分活性化型構造、完全活性化型 構造の平衡状態にあること、薬効度が最も高いリガンドが結合した状態においても部分活性化型構造が存在すること、BMS-986122 は、完全活性化型の割合を上昇させることが明らかとなった。加えて、solvent PRE 実験により、完全活性化型では、M283 が溶媒に露出することが明らかとなり、細胞内側がより開いた構造を取ることが示された。さらに、BMS-986122 存在下では、 μ OR の T162M 変異体では、BMS-986122 による活性上昇が観測されなくなったことから、BMS-986122 が T162 近傍のポケットに結合することが示された。以上より、BMS-986122 が、T162 がある TM3 と、活性と関連する構造平衡が観測された TM6 の相互作用に摂動を与えることで、複数の活性化型構造の中でも細胞内側がより開いた完全活性化型構造を安定化することで、薬効度が最も高い薬物が結合した μ OR のシグナル伝達活性をさらに上昇させることが明らかとなった(図 2)。以上の成果を、投稿論文として発表した。(Kaneko et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (2022) 119, e2121918119)

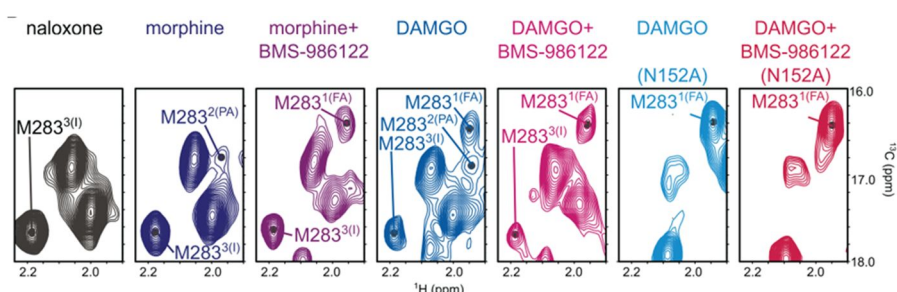


図 1. 各種リガンドと BMS-986122 が存在する条件における、 μ OR の M283 に由来する NMR シグナル。

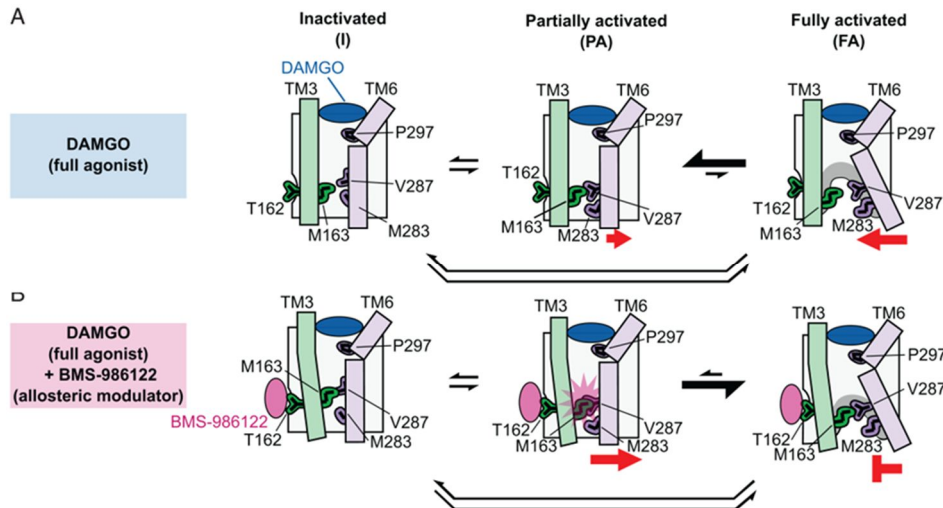


図 2. 本研究により明らかとなった、BMS-986122 が μ OR の活性を規定する構造平衡を変化させるメカニズムの模式図。

(4) 【活性を変調する変位を導入した β_2 AR のシグナルの観測】

アレスチン活性化能が低下することが報告されている L124G 変異を導入した β_2 AR について、完全作動薬結合状態におけるメチオニン残基メチル基およびチロシン残基主鎖の NMR シグナルを観測して、野生型と比較した。その結果、L124G 変異体の PIF モチーフは、野生型と同様に on 状態である一方、DRY モチーフや TM5 細胞内側では、野生型で存在していた構造多型が抑制され、別の構造を取っていること、また NPxxY モチーフには構造多型が存在することが示唆された。したがって、DRY モチーフと TM5 細胞内側の構造多型が、G タンパク質とアレスチンを共に活性化する上で重要であると考えた。

(5) 【構造平衡モデルの構築】

NMR により明らかにした β_2 AR の動的構造平衡と、先行論文で報告されている GPCR シグナル伝達の数理モデルを組み合わせることで、49 個のパラメータから構成される常微分方程式の数理モデルを構築した。さらに、交換モンテカルロ法によりこれらのパラメータを網羅的に探索することにより、先行論文 (J. Biol. Chem. (2008) 283, 2949-2961) で報告されている、 β_2 AR 発現細胞に作動薬を添加した時の cAMP 濃度の経時変化を、シグナル伝達の様々な部位を阻害した条件において観測したデータを再現することができた。以上により、NMR で解明した、GPCR のシグナル伝達活性と相関する動的構造平衡を含みつつ、GPCR シグナルを再現するような数理モデルを構築することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaneko S, Imai S, Asao N, Kofuku Y, Ueda T, Shimada I.	4. 巻 119
2. 論文標題 Activation mechanism of the μ -opioid receptor by an allosteric modulator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2121918119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2121918119	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 Ueda T, Imai S, Shimada I.	4. 巻 336
2. 論文標題 Function-related dynamics of GPCRs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Magn Reson.	6. 最初と最後の頁 107164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmr.2022.107164	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 Shiraishi Y, Kofuku Y, Ueda T, Pandey S, Dwivedi-Agnihotri H, Shukla AK, Shimada I.	4. 巻 12
2. 論文標題 Biphasic activation of β -arrestin 1 upon interaction with a GPCR revealed by methyl-TROSY NMR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 7158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27482-3	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 該当する
1. 著者名 Takeuchi K, Kofuku Y, Imai S, Ueda T, Tokunaga Y, Toyama Y, Shiraishi Y, Shimada I	4. 巻 11
2. 論文標題 Function-Related Dynamics in Multi-Spanning Helical Membrane Proteins Revealed by Solution NMR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/membranes11080604	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 Yuki Hosono, Satoshi Uchida, Moe Shinkai, Chad E. Townsend, Colin N. Kelly, Matthew R. Naylor, Hsiau-Wei Lee, Kayoko Kanamitsu, Mayumi Ishii, Ryosuke Ueki, Takumi Ueda, Koh Takeuchi, Masatake Sugita, Yutaka Akiyama, Scott R. Lokey, Jumpei Morimoto, Shinsuke Sando	4. 巻 14
2. 論文標題 Amide-to-ester substitution as a stable alternative to N-methylation for increasing membrane permeability in cyclic peptides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-36978-z	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 該当する

1. 著者名 Kim J, Kobayashi H, Yokomine M, Shiratori Y, Ueda T, Takeuchi K, Umezawa K, Kuroda D, Tsumoto K, Morimoto J, Sando S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Residue-based program of a -peptoid twisted strand shape via a cyclopentane constraint	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Org Biomol Chem.	6. 最初と最後の頁 6994-7000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ob01300b	査読の有無 無
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 Yokomine M, Morimoto J, Fukuda Y, Shiratori Y, Kuroda D, Ueda T, Takeuchi K, Tsumoto K, Sando S.	4. 巻 61
2. 論文標題 Oligo(N-methylalanine) as a Peptide-Based Molecular Scaffold with a Minimal Structure and High Density of Functionalizable Sites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angew Chem Int Ed Engl.	6. 最初と最後の頁 e202200119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202200119	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takumi Ueda
2. 発表標題 Clarification of the GPCR signaling mechanism based on the function-related conformational dynamics
3. 学会等名 第61回NMR討論会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田 卓見、土田 知輝、栗田 政稔、水村 拓也、今井 駿輔、白石 勇太郎、幸福 裕、竹内 恒、嶋田 一夫
2. 発表標題 アデノシンA2A受容体とリガンドの滞在時間を規定する構造基盤の解明
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://biophys.f.u-tokyo.ac.jp/

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