

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15052

研究課題名（和文）核磁気共鳴法を用いたGタンパク質共役型受容体によるアレスチン活性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of arrestin activation by G protein-coupled receptors using nuclear magnetic resonance

研究代表者

白石 勇太郎（Shiraishi, Yutaro）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：10894412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）： -アレスチン（ arrs）は、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）のリン酸化されたC末端（C tail）と膜貫通領域（TM core）と相互作用することで活性化する。しかし、C tailおよびTM coreによる相互作用が、それぞれ arrsとの親和性・構造変化にどのように寄与しているかは不明であった。本研究では、GPCRのC tailおよびTM coreとの相互作用に伴う arr構造変化を核磁気共鳴（NMR）法により解析した。その結果、C tailとの相互作用は強い親和性の獲得に必要な一方で、TM coreとの相互作用は arr1の構造変化に重要であ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

本研究により、医薬品と結合したGPCRによる arrの活性化が、GPCRのC tailを介した強い結合による複合体形成と、TM coreとの弱い結合により誘起される構造変化の2段階で達成される動的な過程であることが明らかとなった。GPCRを標的とした医薬品の arr活性化能は、従来は arrの結合親和性のみを指標としていたが、本研究の結果は、 arrの構造変化を指標に加えることで、医薬品によるアレスチン活性化能をより正確に評価できることを示している。この活性評価法は、GPCRを標的とした新しい医薬品の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）： -arrestins ( arrs) play multifaceted roles in the function of G protein-coupled receptors (GPCRs). arrs typically interact with phosphorylated C-terminal tail (C tail) and transmembrane core (TM core) of GPCRs. However, the effects of the C tail- and TM core-mediated interactions on the conformational activation of arrs have remained elusive. Here, we show the conformational changes for arr activation upon the C tail- and TM core-mediated interactions with a prototypical GPCR by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Our NMR analyses demonstrated that while the C tail-mediated interaction alone induces partial activation, in which arr exists in equilibrium between basal and activated conformations, the TM core- and the C tail-mediated interactions together completely shift the equilibrium toward the activated conformation. This plasticity of arr conformation in complex with GPCRs engaged in different binding modes may explain the multifunctionality of arrs.

研究分野：構造生物学

キーワード：核磁気共鳴法 アレスチン Gタンパク質共役型受容体

## 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)は真核生物における最大の膜タンパク質ファミリーであり、そのシグナル伝達は様々な生理機能や疾病に関与している。β-アレスチンは、リガンドにより活性化され、かつGPCRキナーゼ(GRK)によりリン酸化されたGPCRに結合する。GPCRにより活性化されたβ-アレスチンは、Gタンパク質を介したシグナル伝達(Gタンパク質シグナル)を最終させるとともに、Gタンパク質非依存的なシグナル伝達(アレスチンシグナル)を誘起する。アレスチンシグナルは、Gタンパク質シグナルとは異なる生理応答を誘起するため、アレスチンシグナルを選択的に制御する化合物は、望みの生理応答のみを誘起し、副作用を誘起しない優れた医薬品となる(Smith et al., Nat. Rev. Drug Discov. 2018)。したがって、アレスチンシグナルは創薬研究の重要な対象であり、β-アレスチンの活性化機構の理解は生物学的に重要であるとともに、医薬品開発にも大きく貢献する。

β-アレスチンは、GPCRの2つの領域と相互作用することで複合体を形成し、活性化される。1つはリガンドにより活性化構造を形成した膜貫通ドメイン(= TM core) もう一つはGPCRキナーゼ(GRK)によりリン酸化を受けたC末端領域(= C tail)である。このことから、GPCRによるβ-アレスチンの活性化機構を理解するためには、TM coreとC tailが、それぞれアレスチンのどの部位をどのように構造変化させるかを知ることが必要である。

これまでに、不活性型に対応するβ-アレスチン単独の立体構造(Han et al., Structure 2001)、活性型に対応するGPCRとの複合体中のβ-アレスチンの立体構造(Staus et al., Nature 2020, Huang et al., Nature 2020, Lee et al., Nature 2020)が報告されている。しかしながら、TM coreとC tailが、それぞれβ-アレスチンの構造変化にどのように寄与しているのかは明確でない。これを明らかにするためには、TM coreの活性化状態、C tailのリン酸化状態が様々な異なるGPCRを調製し、これらが結合した際のβ-アレスチンの構造の違いを比較することが必要である。しかしながら、従来のアレスチンの構造解析では、人工的な構造安定化が行われた条件でしか解析を行えず、このような多彩な条件での解析は困難であった。

応募者はこれまでに、TM coreに結合するリガンドや、C tailのリン酸化状態が様々な異なる

2 アドレナリン受容体(2AR)の調製法を確立し、その動的構造の違いを、溶液NMR法を適用することで明らかにした(Kofuku et al., Nat. Commun. 2012, Shiraishi et al., Nat. Commun. 2018)。以上の研究を発展させることで、β-アレスチンの動的構造を、TM coreの活性化状態とC tailのリン酸化状態が様々な異なるGPCRと結合した状態で解析・比較することにより、TM coreとC tailがβ-アレスチンの活性化に果たす役割を解明できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、核磁気共鳴(NMR)法を用いて、GPCRのTM coreとC tailがβ-アレスチンのどの部位をどのように構造変化させるかを解析することにより、アレスチンシグナル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) TM coreの活性化状態、C tailのリン酸化状態を制御した2ARの調製

完全作動薬であるformoterol結合型2AR、および逆作動薬であるcarazolol結合型2ARを、ナノディスクに再構成した状態で調製した。GRK2によるリン酸化反応を、C末端領域アミド基を観測対象としたNMR測定およびPro-Q Diamond染色により追跡した。formoterol結合状態でリン酸化した2ARに対して、carazololを過剰量添加することでリガンド交換を行い、リガンド交換前後の膜貫通領域の構造を、メチオニン側鎖メチル基を観測対象とした1H-13C HMQCスペクトル測定により解析した。

#### (2) TM coreの活性化状態とC tailのリン酸化状態がβ-アレスチン1との結合親和性へ与える影響の解析

完全作動薬結合型非リン酸化2AR、完全作動薬結合型リン酸化2AR、および逆作動薬結合型リン酸化2ARを、ビオチン化されたナノディスクに再構成したうえでセンサーチップSA上に固定化した。アナライトとしてβ-アレスチン1をインジェクトして、結合に伴うレスポンスを解析した。

#### (3) TM coreの活性化状態とC tailのリン酸化状態がβ-アレスチン1の構造へ与える影響

イソロイシン側鎖メチル基を選択的に[13C, 1H]標識し、その他をすべて重水素化したβ-アレスチン1を調製した。β-アレスチン1の1H-13C HMQCスペクトルを、単独状態、完全作動薬結合型リン酸化2AR結合状態、および逆作動薬結合型リン酸化2AR結合状態で測定した。シグナルの帰属は、各イソロイシンの点変異体のスペクトルとの比較から行った。各状態のβ-アレスチン1のイソロイシン側鎖メチルシグナルの化学シフト差とシグナル強度を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) TM core の活性化状態、C tail のリン酸化状態を制御した 2AR の調製

-アレスチン1との結合親和性や、-アレスチン1の構造変化に対するC tail のリン酸化、TM core の活性化状態の寄与を解析するために、C tail のリン酸化状態やTM core の活性化状態を独立に制御した 2AR の調製法を確立することとした。まず、2AR C tail のGRK2によるリン酸化を解析したところ、完全作動薬結合状態 2ARの方が逆作動薬結合状態 2ARよりも早くリン酸化を受けることが分かった。また、C tail の残基ごとのリン酸化を時分割NMRにより解析したところ、TM coreにより近いセリン・スレオニン残基が、より早くリン酸化を受けることが分かった。

次に、リン酸化反応後の 2AR のTM core の構造を制御するために、リガンドの交換を行った。完全作動薬結合状態でリン酸化反応を行った 2AR に対して、逆作動薬を過剰添加して室温で16時間インキュベートした。逆作動薬添加後のTM core の構造を、不活性化・活性化状態で化学シフトが異なる M82 メチルシグナルの化学シフトを指標に解析したところ、逆作動薬添加直後にはTM core が活性化状態をとっているのに対して、逆作動薬添加から16時間後にはTM core が不活性化状態をとっていることが確認された。このことから、リン酸化反応後の 2AR のリガンド交換を行い、TM core の活性化状態を制御できたと結論した。

(2) TM core の活性化状態とC tail のリン酸化状態が -アレスチン1との結合親和性へ与える影響の解析

2AR TM core の活性化状態とC tail のリン酸化状態が、-アレスチン1との結合親和性にどのように寄与しているかを明らかにするために、SPR法による結合親和性解析を行った。その結果、完全作動薬結合型非リン酸化 2AR は、-アレスチン1との結合を検出できなかった一方で、完全作動薬結合型リン酸化 2AR は、-アレスチン1との結合が検出され、その解離定数は $K_d = 0.2 \mu\text{M}$ であった。この結果は、TM core の活性化のみでは -アレスチン1との結合親和性が弱く、C tail のリン酸化が -アレスチン1との結合に必要であることを示している。一方で、逆作動薬結合型リン酸化 2AR は -アレスチン1との結合が検出されるが、その解離定数は $K_d > 1 \mu\text{M}$ と、完全作動薬型リン酸化 2AR と比較して弱かった。この結果は、活性化したTM core が、-アレスチン1との結合に寄与していることを示している。

(3) TM core の活性化状態とC tail のリン酸化状態が -アレスチン1の構造へ与える影響

2AR TM core の活性化状態とC tail のリン酸化状態が、-アレスチン1の構造変化のどのように寄与しているかを明らかにするために、-アレスチン1の構造を溶液NMR法により解析した。不活性化状態に対応する単独状態、活性化状態に対応する完全作動薬結合型リン酸化 2AR 結合状態のNMRスペクトルを比較したところ、主にNドメインとCドメインに対応する131、1168、1207、1214、1241、1314、1317、1386のNMRシグナルに顕著な化学シフト差を検出した。このことは、-アレスチン1が活性化に伴いN/Cドメイン間の相対配置が変化したことを示している。一方で、リン酸化されたC tail のみが結合に関わる逆作動薬結合型リン酸化 2AR 結合状態のNMRスペクトルでは、131、1105、1207、1233、1233、1386が、不活性化型・活性化型に対応するシグナルの両方が検出された。この結果は、C tail とのみ結合した -アレスチン1が、不活性化型と活性化型の間で構造平衡状態にあることを示している。

以上の結果から、GPCRC C tail のリン酸化は主に -アレスチン1との結合親和性の獲得に、TM core の活性化は主に -アレスチン1の構造変化に、それぞれ寄与していることが明らかとなった。このことから、GPCRによるアレスチンの活性化が、C tail との強い結合により複合体形成が開始され、しかる後にTM core との弱い結合により大きな構造変化が誘起されてシグナル伝達へと至る、2段階の動的な過程であることを提唱する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiraishi Yutaro, Shimada Ichio	4. 巻 145
2. 論文標題 NMR Characterization of the Papain-like Protease from SARS-CoV-2 Identifies the Conformational Heterogeneity in Its Inhibitor-Binding Site	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 16669 ~ 16677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.3c04115	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 Takumi, KOFUKU Yutaka, TAKEUCHI Koh, IMAI Shunsuke, SHIRAIISHI Yutaro, SHIMADA Ichio	4. 巻 64
2. 論文標題 Function-Related Conformational Dynamics of GPCRs Revealed by Solution NMR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nihon Kessho Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 279 ~ 284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5940/jcrsj.64.279	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 白石勇太郎, 嶋田一夫
2. 発表標題 SARS-CoV-2由来パピイン様プロテアーゼの阻害剤結合ポケットが示す構造柔軟性
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田卓見, 今井駿輔, 横溝智貴, 猪野麻巳子, 白石勇太郎, 幸福裕, 竹内恒, 嶋田一夫
2. 発表標題 交換モンテカルロ法を利用した、タンパク質の動的構造平衡と機能の解明
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村優平, 徳永裕二, 幸福裕, 白石勇太郎, 今井駿輔, 嶋田一夫, 竹内恒
2. 発表標題 マイクロ RNA 前駆体 pre-miR-21 の構造平衡が成熟阻害剤の活性へ及ぼす影響の NMR 解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Imai Shunsuke, Yokomizo Tomoki, Kofuku Yutaka, Shiraishi Yutaro, Ueda Takumi, Shimada Ichio
2. 発表標題 Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of b2-adrenoreceptor
3. 学会等名 29th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiraishi Yutaro, Kofuku Yutaka, Ueda Takumi, Pandey Shubhi, Dwivedi-Agnihotri Hemlata, Shukla Kumar Arun, Shimada Ichio
2. 発表標題 Biphasic activation of $\beta$ -arrestin 1 upon interaction with a GPCR revealed by methyl-TROSY NMR
3. 学会等名 29th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白石 勇太郎, 幸福 裕, 上田 卓見, Pandey Shubhi, Dwivedi-Agnihotri Hemlata, Shukla K. Arun, 嶋田 一夫
2. 発表標題 GPCRとの相互作用による $\beta$ -アレスチン1の2段階活性
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井 駿輔, 横溝 智貴, 幸福 裕, 白石 勇太郎, 上田 卓見, 嶋田 一夫
2. 発表標題 Gタンパク質共役型受容体b2ARのリガンド依存的活性化機構
3. 学会等名 第61回NMR討論会
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〕

-

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		
インド	インド工科大学		