

実施課題名 G蛋白質共役型受容体の機能を決定する動的構造平衡の解明

【背景】

現在市販されている医薬品の30%以上はGタンパク質共役型受容体 (GPCR) を標的とする。GPCR には、活性化された GPCR が細胞内の G タンパク質を活性化するシグナル経路と、GPCR が GPCRキナーゼによりリン酸化された上で、アレスチンを活性化するシグナル経路が存在する。本課題では、NMRにより得られるGPCRの構造情報の精度を向上させること、およびGPCRにおけるどのような構造上の特徴が、G蛋白質シグナルとアレスチンシグナルの活性化を可能としているかを解明することを目的とする。

【実施内容】

C末端領域を区分選択標識した上で、GRK2によりリン酸化してrHDLに再構成した β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) を調製して、リン酸化に伴うC末端領域のNMRシグナルの変化を検出していた。本課題では、20 μ Mの[Cterm-[2 H, 13 C, 15 N]]P- β_2 AR-rHDLを調製した上で、950 MHzの装置を用いてTROSY-HNCA、TROSY-HN(CO)CAを測定した。その結果、リン酸化セリンおよびリン酸化スレオニン残基に由来するシグナルの検出が可能となり、帰属を行うことができた (Fig. 1)。

観測されたNMRシグナルの化学シフトおよび線幅から、非リン酸化状態においてC末端領域は特定の構造を形成しないのに対し、リン酸化されると、T360を含むC末端領域の膜貫通領域に近い部位 (P-region) が複数の構造を交換することが示された。さらに、交差飽和実験により、P-regionが膜貫通領域に近接することが明らかになった (Fig. 2)。また、完全作動薬存在下における、リン酸化 β_2 ARおよびリン酸化 β_2 AR-アレスチン複合体のメチオニン残基に由来するNMRシグナルの解析により、リン酸化に伴いM215, M279を含む膜貫通領域の構造が、アレスチン複合体に近い状態に変化することが明らかとなった (Fig. 2)。以上のように、 β_2 ARにおいて、リン酸化に伴い、アレスチンの活性化に特徴的な構造モチーフが形成されることが示された (Fig. 2)。(Shiraishi et al., *Nat. Commun.* 2018)

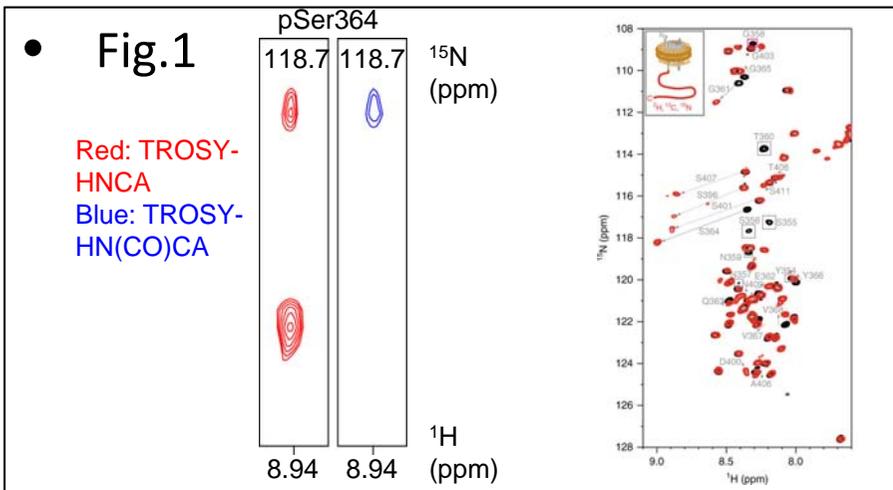


Fig.1説明: 区分選択標識 P- β_2 AR-rHDL のスペクトル。左: TROSY-HNCA, TROSY-HN(CO)CAスペクトル中のpS364のシグナル。右: 非リン酸化状態(黒)およびリン酸化状態(赤)のTROSYスペクトル。

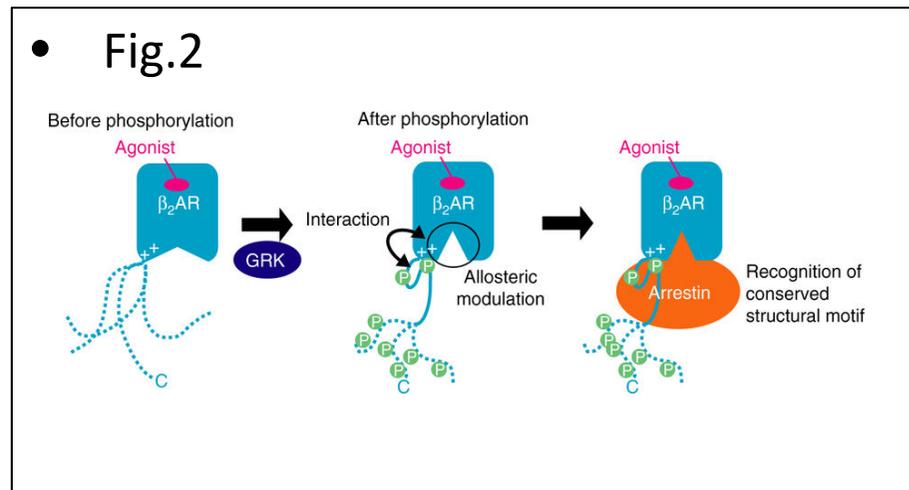


Fig.2説明: β_2 AR のリン酸化に伴う、C末端領域(P-region)と膜貫通領域の相互作用の形成および膜貫通領域の構造変化の模式図。

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題
利用報告書

課題受付番号	PF16-01-Y-001		
利用課題名	G 蛋白質共役型受容体の機能を決定する動的構造平衡の解明		
実施機関名	東京大学大学院薬学系研究科		
実施部署名	生命物理化学教室		
実施責任者管理職名・氏名	職名	教授	氏名 嶋田 一夫
実施部署所在地	東京都文京区本郷 7-3-1		
本課題の概要・目的	<p>G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、免疫応答等の多くの重要な生理機能におけるシグナル伝達を担う膜タンパク質であり、現在市販されている医薬品の 30 %以上が GPCR を標的とする。GPCR には、リガンド結合により活性化された GPCR が細胞内の G タンパク質を活性化して細胞内にシグナルを誘起する経路と、アレスチンを活性化するシグナル経路が存在する。また、G タンパク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も知られており、バイアスリガンドと呼ばれる。申請者は、昆虫細胞発現系におけるメチオニン選択標識と周囲のアミノ酸の重水素標識を組み合わせ、GPCR のメチオニンプローブの高感度 NMR 解析法を世界に先駆けて確立した (Kofuku et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2014)。さらに、開発した手法を応用して、代表的な GPCR である μ オピオイド受容体が、不活性型と複数の活性型の構造を交換しており、バイアスリガンドの結合により構造平衡がシフトすること、および各活性型の存在割合により G 蛋白質シグナルとアレスチンシグナルの選択性が規定されていることを明らかにした (Okude et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2015)。本課題では、各活性型のどのような構造上の特徴が、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ことを可能としているかを解明することを目的とする。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>平成 28 年 10 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日</p> <p>総利用日数： 5 日</p> <p>当初計画どおり 当初計画変更 (変更理由)</p>		

利用施設 横浜市立大学	NMR装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 (○) 溶液 950MHz、() 固体 950MHz 利用期間1：平成28年 8月 8日～平成28年 8月10日 利用期間2：平成28年10月11日～平成28年10月12日
その他の 利用施設		
成果の 概要	実施内容	<p>GPCR キナーゼによりリン酸化される C 末端領域の構造を調べるため、C 末端領域を区分選択標識した上で、リン酸化して rHDL に再構成した β_2 アドレナリン受容体 (β_2AR) の調製法を確立して、リン酸化に伴う C 末端領域の NMR シグナルの変化を検出することに成功していた。一方、研究室で保有する装置では、C 末端を ^2H, ^{13}C, ^{15}N 標識したリン酸化 β_2AR {Cterm-$[\text{}^2\text{H}$, ^{13}C, $^{15}\text{N}]$}P-β_2AR-rHDL の TROSY-HNCA、TROSY-HN(CO)CA スペクトルにおける、リン酸化された残基に由来するシグナルの感度が十分でなく、帰属が困難であった。そこで本課題では、20 μM の {Cterm-$[\text{}^2\text{H}$, ^{13}C, $^{15}\text{N}]$}P-β_2AR-rHDL を調製した上で、950 MHz の装置を用いて、の TROSY-HNCA、TROSY-HN(CO)CA を測定した。その結果、リン酸化セリンおよびリン酸化スレオニン残基に由来するシグナルを検出することが可能となり、帰属を行うことができた。</p> <p>観測された NMR シグナルの化学シフトおよび線幅から、C 末端領域のセリンおよびスレオニン残基が GRK2 によりリン酸化されていること、および非リン酸化状態において C 末端領域は特定の構造を形成していないのに対し、リン酸化されると、T360 を含む C 末端領域の膜貫通領域に近い部位 (P-region) が複数の構造を交換することが示された。さらに、交差飽和実験により、P-region が膜貫通領域に近接することが明らかになった。また、完全作動薬存在下における、リン酸化 β_2AR およびリン酸化β_2AR -アレスチン複合体のメチオニン残基に由来する NMR シグナルの解析により、リン酸化に伴い M215, M279 を含む膜貫通領域の構造が、アレスチン複合体に近い状態に変化することが明らかとなった。以上のように、GPCR のリン酸化に伴い、アレスチンシグナルの活性化に有利な構造モチーフが形成されることが示された。</p>
本課題により得られた成果と当初目標との比較		<p>本研究の当初目標は、NMR により得られる GPCR の構造情報の精度を向上させること、および GPCR におけるどのような構造上の特徴が、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ことを可能としているかを解明することであった。</p> <p>一方、本研究では、C 末端領域の区分選択標識および 950 MHz の装置の利用により、リン酸化 β_2AR の C 末端領域の NMR シグナルを帰属して、GPCR の C 末端領域の構造を解析することに世界で初めて成功した。加えて、GPCR のリン酸化に伴い、P-region が膜貫通領域に近接して、膜貫通領域がアレスチン結合状態に近い構造を取ることで、アレスチンシグナルの活性化に有利な状態となることを明らかにした。さらに、以上の成果を投稿論文に発表した (Shiraishi et al., <i>Nature Commun.</i> 2018)。したがって、当初目標に対応する成果が得られたと考えた。</p>

<p>成果発表</p>	<p>Research Articles:</p> <p>Yutaro Shiraishi, Mei Natsume, Yutaka Kofuku, Shunsuke Imai, Kunio Nakata, Toshimi Mizukoshi, Takumi Ueda, Hideo Iwai, Ichio Shimada, “Phosphorylation-induced conformation of β_2-adrenoceptor related to arrestin recruitment revealed by NMR” <i>Nat. Commun.</i> (2018) 9, 194</p> <p>Yutaka Kofuku, Tomoki Yokomizo, Shunsuke Imai, Yutaro Shiraishi, Mei Natsume, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Kunio Nakata, Shunsuke Igarashi, Hideyuki Yamaguchi, Toshimi Mizukoshi, Ei-ichiro Suzuki, Takumi Ueda, Ichio Shimada, “Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of β_2-adrenergic receptor expression in a baculovirus-insect cell expression system” , <i>J. Biomol. NMR</i> (2018) in press</p> <p>Yuichi Minato, Takumi Ueda, Asako Machiyama, Hideo Iwai, and Ichio Shimada, “Dynamic domain arrangement of CheA-CheY complex regulates bacterial chemotaxis, as revealed by NMR” , <i>Sci. Rep.</i> (2017) 28, 16462</p> <p>Invited Lecture:</p> <p>Takumi Ueda, Yuichi Minato, Shiho Suzuki, Tomoaki Hara, Yutaka Kofuku, Go Kasuya, Yuichiro Fujiwara, Shunsuke Igarashi, Ei-ichiro Suzuki, Osamu Nureki, Motoyuki Hattori, Ichio Shimada, “Conductance of P2X₄ receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region” , 58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, California, 2017</p> <p>Takumi Ueda, Ichio Shimada, “Application of Isotope-Labeling Methods for Studying Protein Dynamics” , 第 56 回 NMR 討論会, 八王子, 2017</p>
<p>今後の展開</p>	<p>本研究では、完全作動薬結合状態、および完全作動薬とアレスチンが両方結合した状態におけるリン酸化 β_2AR の NMR 解析を行い、β_2AR 上に生じるアレスチン活性化に特徴的な構造モチーフを同定した。本研究の手法を、GPCR と G タンパク質の複合体の解析に適用して、G タンパク質の活性化に特徴的な構造モチーフを同定することにより、シグナル選択性の理解がさらに進展することが期待される。また、β_2AR 結合状態のアレスチンの動的構造の解析により、アレスチンが活性化する機構が明らかになることが期待される。さらに、バイアスリガンドが創薬上重要であると考えられている様々な GPCR における、G タンパク質/アレスチンの活性化に特徴的な構造モチーフの同定が進むことが期待される。</p>

<p>社会・経済への波及効果の見 通し</p>	<p>本研究では、リン酸化により GPCR 上に生じる、アレチンシグナルの活性化に特徴的な構造モチーフの同定に成功した。したがって、本研究は、この構造モチーフの形成を促進もしくは阻害を指標とした、立体構造に基づくバイアスリガンドの開発を可能とする。多くの GPCR において、G タンパク質シグナルとアレチンシグナルの一方が主作用を、他方が副作用を誘起することが知られており、バイアスリガンドは、副作用のシグナル伝達のみを阻害することで、副作用を軽減することが期待されている。したがって、本研究は、副作用を軽減した医薬品の開発を加速する。</p>
<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>日程調整から測定、試料回収まで、一連の手順を順調に行うことができた。特に、サンプルの一時冷蔵保管、ならびにリガンドの添加やバッファー置換を施設内で行わせていただいたため、装置を効率的に使用できた。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>最近、生理的な脂質二重膜環境において、膜蛋白質が動的構造平衡状態にあり、各状態の量比や交換速度が活性を決定することが明らかになってきている (Minato et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> 2016, Kofuku et al., <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2014)。NMR は、生理的な溶液環境における、蛋白質の動的構造の解析を可能とする唯一の手法である。濃度や安定性の低い膜蛋白質の動的構造平衡を解明する上では、高磁場 NMR 装置が必要不可欠である。特に 950 MHz の装置は、当研究室の 800 MHz の NMR 装置と比べても、感度が約 1.4 倍高いことに加えて、シグナルの分離が良好である。したがって、NMR 共用プラットフォームで、950MHz の装置をはじめとする高磁場 NMR 装置を使用することにより、膜蛋白質や細胞内の蛋白質の動的構造平衡の解析が大きく加速することを期待する。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : (○) なし 「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>