

実施課題名：動的構造解析に基づくG蛋白質共役型受容体を介したシグナル伝達メカニズムの解明

【背景】(実施課題の背景・目的を簡潔に具体的に記載してください。)

G蛋白質共役型受容体(GPCR)は、様々な神経伝達物質やホルモンの受容体であり、現在市販されている医薬品の30%以上はGPCRを標的とする。GPCRは、作動薬により活性化すると、G蛋白質を活性化して、細胞内シグナルを誘起する。また、活性化したGPCRは、GPCRキナーゼによるリン酸化を受けた上で、アレスチンを活性化する。本研究課題では、 β -アレスチン1(β Arr1)の動的構造がリン酸化 β_2 アドレナリン受容体(β_2 AR)との複合体形成に伴いどのように変化するかを明らかにして、アレスチンの活性化機構を解明することを目的とする。

【実施内容】(別紙の利用報告書に記載してある実施内容を簡潔に具体的に記載してください。)

u -[2 H, 15 N], Ile δ 1-[13 C, 1 H $_3$]] β -アレスチン1(β -arr1)、および精製後 rHDL の脂質二重膜に再構成して、GPCR キナーゼにより C 末端領域をリン酸化した β_2 アドレナリン受容体(β_2 AR)を調製した上で、 β -arr1単独状態、およびリン酸化 β_2 AR添加時の 1 H- 13 C HMQC スペクトルを測定した。その結果、 β_2 AR 非存在時のスペクトルでは、イソロイシン残基数に対応する数のシグナルが観測され、リン酸化 β_2 AR 添加時のスペクトルでは、いくつかのシグナルの化学シフトが添加前とは顕著に異なっていた。したがって、 β_2 AR に結合したアレスチンの NMR シグナルが観測されたことが示唆された。両状態について変異体のNMR測定を行うことによりシグナルの帰属を行い、化学シフト変化量を残基ごとに解析した。その結果、主に N/C ドメインの界面付近に分布する残基のシグナルに顕著な化学シフト変化が生じていることが明らかとなった。さらに、高分子量膜タンパク質であるGPCRの動的構造解析を進展させるため、特定の周波数の 13 C/ 15 Nに結合した 1 Hシグナルを1次元スペクトルとして測定することで、単位時間当たりの感度を増大させるheteronuclear single field polarization transfer (HSFPT) 法を開発した。950 MHzの装置を用いてHSFPTスペクトルを測定した結果、均一標識MBPのイソロイシン残基のメチル基のシグナルも分離して観測可能であることが示された (Fig.2, Toyama and Shimada, *J. Magn. Reson.* 2019)。

• Fig.1

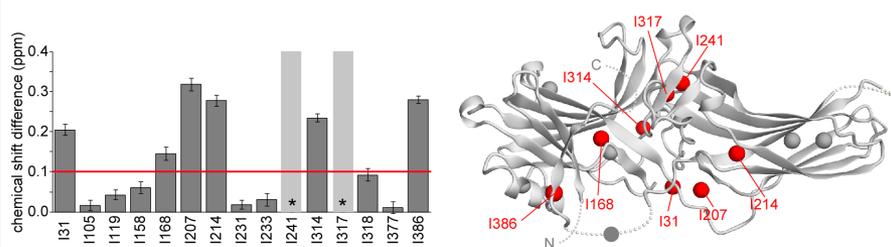


Fig.1説明 β -アレスチン1の β_2 AR添加に伴う化学シフト変化量と0.1 ppm以上の変化を示した残基のマッピング。

• Fig.2

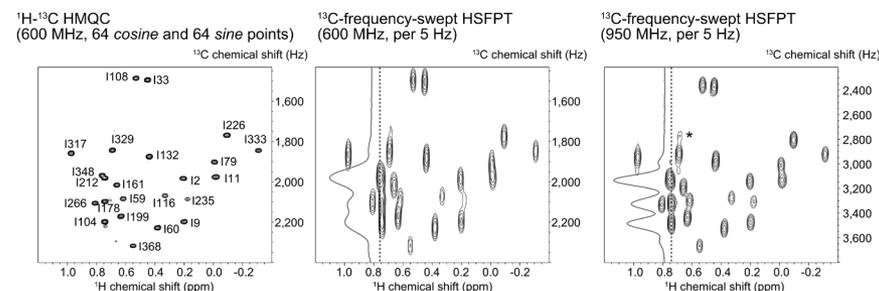


Fig.2説明 600 MHz (中) および950 MHz (右) の装置で測定した、一連のMBPのHSFPTスペクトルの等高線プロット。

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

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

| | | | | |
|--|---|--|----|-------|
| 課題受付番号 | PF18-01-Y-017 | | | |
| 利用課題名 | 動的構造解析に基づく G 蛋白質共役型受容体を介したシグナル伝達メカニズムの解明 | | | |
| 実施機関名 | 東京大学大学院 | | | |
| 実施部署名 | 薬学系研究科生命物理化学教室 | | | |
| 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 | 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室 | | | |
| 本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。) | <p>G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、様々な神経伝達物質やホルモンの受容体であり、現在市販されている医薬品の 30%以上は GPCR を標的とする。GPCR は、作動薬により活性化すると、G 蛋白質を活性化して、細胞内シグナルを誘起する。また、活性化した GPCR は、GPCR キナーゼによるリン酸化を受けた上で、アレスチンを活性化する。G 蛋白質シグナルとアレスチンシグナルはそれぞれ異なる薬理作用を誘起することが知られており、例えば鎮痛薬により活性化したオピオイド受容体では、G 蛋白質シグナルが主作用を、アレスチンシグナルが副作用を誘起する。したがって、G 蛋白質やアレスチンが GPCR と複合体を形成した、G 蛋白質シグナルやアレスチンシグナルを流す状態における動的構造が重要である。申請者らは、代表的な GPCR である β_2 アドレナリン受容体 (β_2AR) において、GRK による C 末端領域のリン酸化に伴い、β_2AR の C 末端領域と膜貫通領域が相互作用して、アレスチン活性化に特徴的な構造モチーフを形成することを解明した (Shiraishi et al. Nature Commun. 2018)。本研究課題では、これまでの研究を発展させて、アレスチンの動的構造がリン酸化 β_2AR との複合体形成に伴いどのように変化するかを明らかにして、アレスチンの活性化機構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>2018 年 8 月 1 日～2020 年 3 月 31 日</p> <p>総利用日数： 2 日</p> <p><input checked="" type="checkbox"/>当初計画どおり・<input type="checkbox"/>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) ○ | <p>利用装置①</p> <p>・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 950MHz、() 固体 950MHz</p> | | |

| | | |
|--------------|--|--|
| | | 利用期間 1 : 2018 年 12 月 10 日 ~ 2018 年 12 月 11 日 利用期間 2 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日 利用期間 3 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日 |
| | | 利用装置② ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 950MHz、() 固体 950MHz 利用期間 1 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日 利用期間 2 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日 利用期間 3 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日 |
| その他の 利用施設 | | ※4 NMR 施設以外の装置、支援などを利用した場合は記載してください |
| 成果の 概要 | 実施内容 (字数制限はありませんが 400 字 ~ 800 字以内(程度)でお書きください。) | <p>※申請書との整合性にご配慮ください。</p> <p>{u-[²H, ¹⁵N], Ileδ1- [¹³C¹H₃]} β-アレスタチン 1 (β-arr1)、および精製後 rHDL の脂質二重膜に再構成して、GPCR キナーゼにより C 末端領域をリン酸化した β₂ アドレナリン受容体 (β₂AR) を調製した上で、β-arr1 単独状態、およびリン酸化 β₂AR 添加時の ¹H-¹³C HMQC スペクトルを測定した。その結果、β₂AR 非存在時のスペクトルでは、イソロイシン残基数に対応する数のシグナルが観測され、リン酸化 β₂AR 添加時のスペクトルでは、いくつかのシグナルの化学シフトが添加前とは顕著に異なっていた。したがって、β₂AR に結合したアレスタチンの NMR シグナルが観測されたことが示唆された。両状態について変異体の NMR 測定を行うことによりシグナルの帰属を行い、化学シフト変化量を残基ごとに解析した。その結果、主に N/C ドメインの界面付近に分布する残基のシグナルに顕著な化学シフト変化が生じていることが明らかとなった。</p> <p>さらに、高分子量膜タンパク質である GPCR の動的構造解析を進展させるため、特定の周波数の ¹³C/¹⁵N に結合した ¹H シグナルを 1 次元スペクトルとして測定することで、単位時間当たりの感度を既存の 2 次元測定と比較して最大 6 倍程度増大させる heteronuclear single field polarization transfer (HSFPT) 法を開発した。950 MHz の装置を用いて HSFPT スペクトルを測定した結果、均一標識 MBP のイソロイシン残基のメチル基のシグナルも分離して観測可能であることが示された。(J. Mag. Res. 2019)。</p> |

| | |
|--|--|
| <p>本課題により得られた成果と当初目標との比較 (字数制限はありませんが400字～800字以内(程度)でお書きください。)</p> | <p>当初は、アレスチンの動的構造がリン酸化 β_2AR との複合体形成に伴いどのように変化するかを明らかにすることを目指すことを目標としていた。本課題では、この当初目標と対応するように、リン酸化 β_2AR に結合したアレスチンの NMR シグナルの観測および帰属を行い、N/C ドメインの界面付近に分布する部位が顕著に化学シフト変化することを明らかとした。さらに、当初目標に含まれていなかった、高分子量蛋白質の NMR シグナルの単位時間当たりの感度を既存の 2 次元測定と比較して最大 6 倍程度増大させる HSFPT 法の開発にも成功して、高磁場装置における手法の有効性を示し、その成果を投稿論文に発表した (Toyama and Shimada, J. Magn. Reason. 2019)。したがって、本課題では、当初目標を上回る成果が得られたと考える。</p> |
| <p>成果発表</p> | <p>※本課題利用による論文・学会発表・特許(出願中含む)等で本事業に関連する謝辞を記載頂いた成果について、可能な範囲で記載して下さい。 (謝辞の記載例【英文】: <i>The NMR experiments were performed at (機関名) of NMR Platform supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.</i> 【和文】: 本研究の NMR 測定は、文部科学省先端研究基盤共用促進事業「NMR 共用プラットフォーム」の(機関名)を利用しました。)</p> <p>1. Yuki Toyama, Ichio Shimada, J. Magn. Reason. (2019) 304, 62-77</p> |
| <p>今後の展開 (字数制限はありませんが300字～600字以内(程度)でお書きください。)</p> | <p>※特に、本課題により得られた NMR 技術を用いた応用について ここまでの解析では、リン酸化 β_2AR のリン酸化部位と膜貫通領域のどちらが β-arr1 の構造変化に寄与しているのかを切り分けて解析できていない。今後は、リン酸化 β_2AR に結合させるリガンドを変化させることで、膜貫通領域の構造に変調をかけたうえで同様の解析を行うことにより、膜貫通領域の構造が β-arr1 の活性化にどの程度寄与しているかを調べる予定である。また、β-arr1 の構造変化をより詳細に記述することを目指して、主鎖アミド基の NMR シグナルの帰属に着手する予定である。</p> |

| | |
|--|---|
| <p>社会・経済への波及効果の見直し (字数制限はありません 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p> | <p>本研究により新たに得られた構造の細胞の内側には、これまでのβ_2AR の立体構造では明らかにされていなかった特徴的な広い面が存在する。この面を選択的に認識する化合物は、作動薬あるいは内在性リガンドによって活性化したβ_2AR に更に相互作用してエフェクターとの相互作用を変調する、アロステリックリガンドになる可能性がある。このような化合物は、特定のエフェクターとの相互作用を選択的に阻害することによって、作動薬が及ぼす副作用を軽減するような新たな薬剤になると期待される。本研究の成果は、GPCR の機能を制御する新たな薬剤を、立体構造を基にして合理的に設計し、その効果を実証するための指針を与えるものである。</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>※本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用の感想を記載してください。なお複数機関の利用の場合は、どの施設に対する感想かも明記して下さい。</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ました。</p> |
| <p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p> | <p>様々な蛋白質が動的構造平衡状態にあり、活性型の割合や交換速度が活性を規定することが明らかになってきている。さらに、膜蛋白質の動的構造平衡が脂質二重膜構造の有無の影響を受けることや、細胞内環境では、内在性分子の影響により蛋白質の酸化還元状態や翻訳後修飾の状態が <i>in vitro</i> とは異なることが示されている。NMR は、生理的な溶液環境における蛋白質の動的構造を原子レベルで解析できる唯一の手法である。濃度や安定性の低い蛋白質の動的構造平衡を解明する上では、高磁場 NMR 装置が必須である。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、生理的な溶液環境下の蛋白質における活性を規定する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>※特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は必ず事前に利用機関先の課題担当者にご相談ください。</p> <p>() あり : (O) なし</p> <p>「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> |