研　究　報　告　書

「NMR による脂質二重膜中における GPCR の動的構造平衡の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研 究 者：　上田　卓見

1．　研究のねらい

G タンパク質共役型受容体（GPCR）は、シナプスの神経伝達物質や血中のホルモン、および体外の光や感覚刺激物質の受容体であり、多くの重要な生理機能を制御する。GPCR を標的とする薬は、現在市販されている医薬品の 30%以上を占める。GPCR は、7 回膜貫通型の膜タンパク質であり、リガンド結合により活性化すると、細胞内の G タンパク質を活性化して、cAMP 濃度変化等のシグナルを誘起する。

申請時までに、本研究者は、GPCR に属するβ_2アドレナリン受容体（β_2AR）の NMR スペクトルを、活性の異なる各種リガンドが結合した状態で取得した。その結果から、β_2AR が二つの不活性型と一つの活性型の動的構造平衡状態にあり、結合しているリガンドに応じて存在割合や交換速度が変化しており、活性型の割合が G タンパク質活性化能を決定していることを明らかにした。この事実は、GPCR の活性発現は、動的構造平衡により行われていることを示している。

また、本研究者は、GPCR であるケモカイン受容体 CCR5 を、生理的な膜環境を模倣した再構成高密度リポタンパク質、rHDL（reconstituted high-density lipoprotein）の脂質二重膜中に再構成して、活性を十分保持する試料調製法を開発してきた。さらに、カリウムチャネルの開状態と閉状態の動的構造平衡の量比が、rHDL の脂質二重膜中とミセル可溶化状態では異なることを明らかにした。この事実は、膜タンパク質、さらには GPCR の動的構造平衡は、脂質二重膜構造の有無や脂質組成といった膜環境の影響を受けることを示している。

一方、生理的な膜環境を反映した、rHDL に再構成した GPCR は巨大分子であるため、NMR でその動的構造平衡を明らかにするためには、NMR シグナルの先鋭化、およびスペクトルの簡略化が必須である。そのためには、重水素化および選択標識が必要である。一方、酵母や昆虫細胞でしか、GPCR の活性体は大量発現しない。しかし、酵母や昆虫細胞では、安定同位体標識が難しい点が問題である。

そこで本研究では、生理的な膜環境を反映した、rHDL の脂質二重膜中における GPCR の動的構造平衡を NMR により解明して、GPCR のシグナル伝達や制御の機構を明らかにすること、および、これらを可能とする要素技術として、酵母および昆虫細胞発現系を用いて、重水素化と選択標識を両方施した GPCR を大量調製する方法を開発することをねらいとした。

2．　研究成果

（1）概要

本研究では、昆虫細胞発現系において重水素化を開発して、rHDL の脂質二重膜中のβ_2AR の膜貫通領域のメチオニン残基の NMR シグナルの感度を約 5 倍に上昇させることに成

功した。さらに、脂質二重膜中における β_2AR の活性型の割合および交換速度が、界面活性剤中とは顕著に異なることが明らかになった。脂質二重膜中における活性型の割合は、ミセル中における値よりも、G 蛋白質シグナル活性化能と良く対応しており、GPCR が活性を正しく発揮する上では脂質二重膜環境が必要であることが明らかとなった。また、β_2 アドレナリン受容体の活性化に要する時間は受容体型チロシンキナーゼより顕著に短く、迅速な神経伝達や感覚認知を可能としていることが示された。

さらに、一期生の服部素之研究員と、P2X$_4$ 受容体の共同研究を行った。リガンド依存型イオンチャネルは、部分アゴニストの結合により部分的に活性化して、完全アゴニスト結合時より弱い電流を流すことが知られている。完全アゴニストより望ましい薬理作用を持つ、リガンド依存型イオンチャネルの部分アゴニストが複数開発されている。ATP により開口する陽イオンチャネルである P2X 受容体では、α,β−メチレン ATP との結合に伴い、ATP 結合時より弱い電流が誘起される。しかし、P2X 受容体が部分的に活性化されるメカニズムは不明であった。本研究では、α,β−メチレン ATP 結合状態において、ゼブラフィッシュ由来 P2X$_4$ 受容体の膜貫通領域が、ポアを開いた構造と閉じた構造の動的平衡状態にあり、開いた構造の割合が電流の大きさを決定することを明らかにした。

（2）詳細

研究テーマ A「重水素化と選択標識を両方施した GPCR の調製」

入手可能な重水素化アミノ酸を全て添加した培地で、モデル蛋白質であるチオレドキシンを発現させて、その NMR スペクトルから、各アミノ酸残基の重水素化率を算出した。その結果、添加量やタイミング等を最適化した条件では、14 種類の残基が、重水素化されたことが示された。一方、発現量の限られる GPCR の重水素化体の調製においては、重水素化するアミノ酸の数を必要最小限とした方が、収量やコストの面で望ましい。そこで、β_2AR の立体構造において、観測するメチオニン残基と近接するアミノ酸を調べて、重水素化するアミノ酸を選定した。その結果、A, C, F, I, L, M, T, V, Y, W を部分重水素化すると、観測原子に近接するプロトンを効率良く減らして、rHDL 中のβ_2AR のシグナル強度を数倍以上増大できることが示唆された。

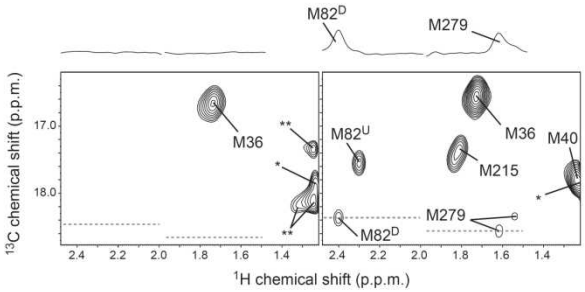

Fig.1 非重水素化(左)および重水素化(右)メチオニン選択標識 β_2AR-rHDL の、逆アゴニスト (carazolol) 結合状態における ^{1}H-^{13}C HMQC スペクトル。

そこで次に、部分重水素化とメチオニン ^{13}C 標識を両方施した β_2AR −rHDL と、重水素化していない β_2AR−rHDL を調製して、逆アゴニスト存在下における NMR スペクトルを測定した(Fig.2)。その結果、重水素化を行わなかった時の β_2AR−rHDL の NMR スペクトルでは、M82, M215, M279 の NMR シグナルはほとんど観測されなかったのに対し、重水素化した条件では、各メチオニン残基の NMR シグナルが、十分な感度で観測された。これらの結果は、重水素化によりシグナル強度が 5 倍以上向上したことを示しており、重水素化率からの予測と良く対応

した。

さらに、アラニン ^{13}C 標識と重水素化を両方施す方法の最適化を進めた。その結果、部分重水素化しながら、モデルタンパク質のアラニン残基のメチル基を約 30%の標識効率で標識することが可能となった。

研究テーマ B「rHDL の脂質二重膜中における GPCR の動的構造平衡の NMR 解析」

活性の異なる様々なリガンドが結合した状態における、重水素化 β_2AR-rHDL の NMR スペクトルを測定した上で、ミセル状態の解析において活性と対応するシグナル変化を示していた M82 のシグナルを重ね合わせた(Fig.2)。その結果、ミセルの時と同様、各リガンドの efficacy に対応した、連続的な化学シフト変化が観測された。したがって、rHDL 中においても、β_2AR が活性型と不活性型の構造平衡にあることが示された。一方、ミセル中の β_2AR のスペクトルと比べると、部分アゴニスト結合状態の化学シフトが、より完全アゴニスト結合状態に近い値となっていた。このことは、rHDL 中では、活性型の割合がやや多いことを示している。また、ミセル状態と比べると、部分アゴニスト結合状態のシグナルが顕著に広幅化しており、特に弱い部分アゴニスト結合状態では、シグナルが二つに割れていた。以上の現象交換速度がミセルの時よりも小さいことを示している。

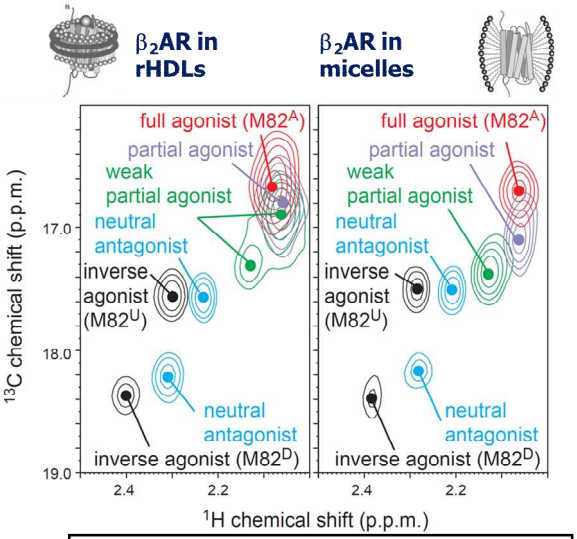

Fig.2 重水素化およびメチオニン選択標識を施した、rHDL 中（左）およびミセル中（右）の β_2AR-rHDL における、各リガンド結合状態の ^1H-^{13}C HMQC スペクトル。

ミセル中および rHDL 中における活性型の割合から cAMP 変化量を計算して、実験値と比較した結果、rHDL 中の方が、DDM 中より良く対応した（Fig.3）。したがって、脂質二重膜環境が、β_2AR の活性に重要な影響を与えることが示された。

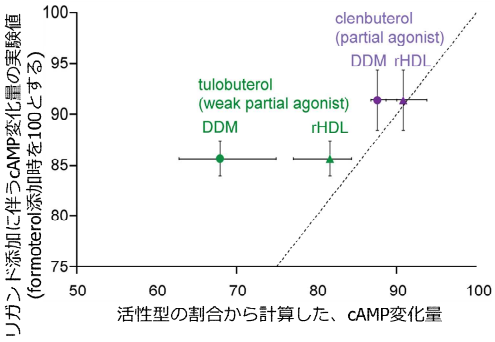

Fig.3 rHDL 中および DDM ミセル中における、活性型の割合から計算した cAMP 変化量と、実験値の相関プロット。

研究テーマ C「NMR による P2X 受容体の活性を制御する動的構造平衡の解明」

（服部素之研究員（一期生）との共同研究）

ゼブラフィッシュ由来 $P2X_4$ 受容体（以下単に $P2X_4$ と記述する。）を昆虫細胞に発現させて、界面活性剤 DDM で可溶化して、精製した上で、rHDL の脂質二重膜に再構成した。その結果、リガンド結合活性を保持した $P2X_4$-rHDL が培地 1 L あたり 0.05 mg の収量で得られた。

SEC の溶出体積が rHDL のストークス径と対応したこと、および SDS-PAGE における MSP と P2X4 のバンドの強度比がモル比として 2:3 であったことから、3 量体の $P2X_4$ が rHDL に再構成されたことが示された。

部分重水素化とメチオニン ^{13}C 標識を両方施した $P2X_4$-rHDL の NMR スペクトルを apo 状態および ATP 結合状態の両状態で取得した結果、$P2X_4$ のメチオニン残基数（5 個, Fig.4）とおよそ対応する数のシグナルが観測された。各メチオニン残基の変異体のスペクトルと比較することで、全ての残基のシグナルを帰属した。また、アラニン ^{13}C 標識を利用して、細胞外領域と膜貫通領域を繋ぐ位置に存在する A330（Fig.4）のシグナルの観測および帰属を行った（Fig.5）。さらに、膜貫通領域の動的構造平衡を調べるために、膜貫通領域に位置する L339 および L351（Fig.4）にメチオニン残基を導入した変異体のスペクトルを取得して、M339、M351 の NMR シグナルの観測および帰属を行った（Fig.5）。ATP の結合に伴い、M339 のシグナルの ^{1}H の化学シフトが低磁場シフトしたこと（Fig.5）は、結晶構造において、apo 状態においてのみ、L（M）339 が環電流効果を受ける程度にまで Y45 と近接することと対応していた。したがって、apo 状態および ATP 結合状態で観測されたシグナルは、結晶構造で観測された閉状態および開状態の構造に対応することが示された（Fig.6）。

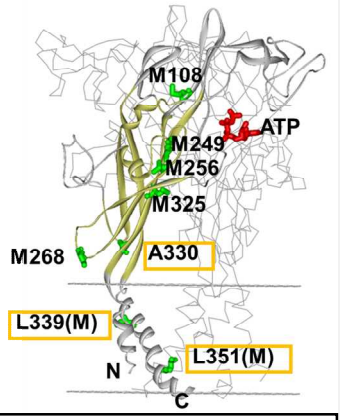

Fig.4 $P2X_4$ 受容体の NMR シグナルを観測した残基の分布。(PDB entry: 4DW1)

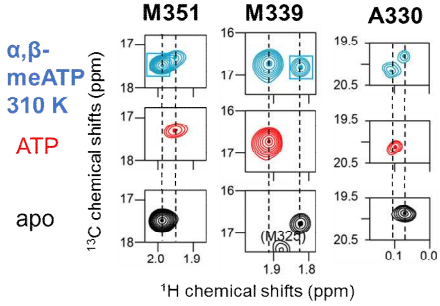

Fig.5 各リガンド結合状態における、A330, M339, M351 の NMR シグナル。

次に、α,β-meATP 結合状態における、上記の残基に由来する NMR シグナルを観測した。その結果、膜貫通領域に導入した M351 と M339、ならびに lower body の膜側に位置する A330 と M325 のシグナルが二つ観測され、一方はアポ状態と、もう一方は ATP 結合状態と化学シフトが同じであった（Fig.5）。また、温度を上昇させた結果、ATP 結合状態と化学シフトが同じシグナルの相対強度が可逆的に増大した。したがって、膜貫通領域およびリガンド結合部位と膜貫通領域を繋ぐ領域が、閉じた状態と開いた状態の間を化学シフト差よりも遅いタイムスケール（< 100 /s）で交換していることが示された(Fig.6)。

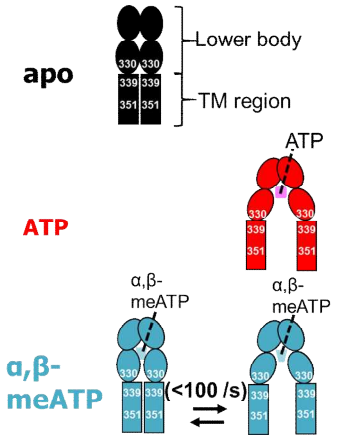

Fig.6 NMR により解明した、各リガンド結合状態における $P2X_4$ の構造平衡。

約 20℃では、α,β-meATP 結合状態の $P2X_4$ の 35%が開構造を取っていることが、NMR スペクトルから示唆される。一方、電気生理実験において、$P2X_4$ にα,β-meATP が作用した時に観測された電流の大きさは、ATP が作用した時の 28%程度であり(Fig.7)、開構造の割合と良く対応していた。したがっ

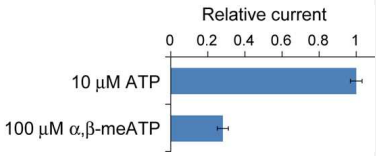

Fig.7 $P2X_4$ 発現細胞に ATP および α,β-meATP が作用した時に誘起される電流の大きさ。

て、α,β-meATP 結合状態において、開構造をとる $P2X_4$ 受容体が少量存在することにより、部分的に活性化されることが示された。

3. 今後の展開

GPCR は、G 蛋白質シグナルとアレスチンシグナルを活性化する。一方、片方のシグナルを選択的に活性化する GPCR リガンドが知られており、副作用の小さい薬物を開発する上で重要であると考えられている。我々は、μ オピオイド受容体が、不活性型と複数の活性型の動的構造平衡状態にあり、各活性型の割合がシグナルの選択性に関与することを明らかにした。今後、これまでの研究を発展させて、NMR により得られる情報の空間的および時間的な精度を向上する手法を開発した上で、開発した手法を応用してシグナル選択性の機構を解明する。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

・研究目的の達成状況、

本研究では、重水素化により、昆虫細胞発現系に発現させた GPCR の NMR シグナルの感度を 5 倍以上向上させることに成功した。また、開発した手法を応用して、rHDL の脂質二重膜中の GPCR の動的構造平衡を NMR で明らかにして、脂質二重膜中では平衡の交換速度および量比が界面活性剤ミセル中とは顕著に異なることを明らかにした。加えて、アラニン残基の選択標識法を開発した上で、rHDL の脂質二重膜中の $P2X_4$ 受容体の NMR 解析に応用して、P2X 受容体の薬効発現機構を解明した。以上の成果を、投稿論文に発表している（Kofuku et al., Angew. Chem., 2014, Minato et al., PNAS, 2016)。さらに、より高度な生理的膜環境下の GPCR の動的構造平衡の解析に予備的に成功している。したがって、研究目的を達成していると考えた。

・研究の進め方（研究実施体制及び研究費執行状況）、

研究者が所属する、NMR 試料調製、NMR 測定、データ解析に必要な設備が整った研究室において、学生 2 名と研究を進め、P2X 受容体の研究に関しては一期生の服部素之研究員と共同研究を行った。したがって、研究実施体制は適切であると考えた。研究費に関しても、昆虫細胞および酵母に発現させた安定同位体標識 GPCR を rHDL に再構成した NMR 試料を多数調製して、NMR 解析を行っており、適切に執行していると考えた。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果（今後の見込みを含む）

従来の医薬品の合理的設計では、標的部位への結合の強さが主な指標として用いられてきた。しかし、結合の強さのみを指標とした場合、リガンドが誘起するシグナルの強さを設計するのは困難である。本研究で、脂質二重膜中における GPCR の活性制御機構を明らかにしたことで、アンタゴニストからアゴニストへの変換の指針を提示することが可能となり、GPCR を標

的とした創薬が加速することが期待される。

G タンパク質と β-アレスチン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、理想的な作用を持つ薬物を開発する上で重要であると考えられている。例えば、μオピオイド受容体に結合して、G 蛋白質依存的な経路を選択的に活性化する化合物である TRV130 が、G 蛋白質依存的な経路と β-アレスチン依存的な経路を両方活性化するモルヒネよりも、動物実験において副作用が生じにくいことが報告されている。本研究で得られた、脂質二重膜環境における GPCR の活性制御機構の知見を応用して、G タンパク質および β-アレスチンの活性化および活性制御機構を解明すれば、一方のシグナルを選択的に活性化するリガンドを設計する指針を提示することが可能となり、GPCR を標的とした創薬が加速することが期待される。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年２回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

重水素交換により NMR の感度を高め、rHDL(reconstituted high-density lipoprotein)脂質二重膜中の β2 アドレナリン受容体を NMR 解析することに成功した。また、P2X4 受容体の構造平衡状態を解析し、イオン透過性のメカニズムを明らかにした。NMR を用いた GPCR の機能解析としては、非常に高いレベルに達したと考える。

今後は、手法を GPCR の生理的機能の説明に適応していくことが重要であるので、さらに試料の量を減らす手法等を開発して欲しい。

なお、本研究者は本さきがけ研究の成果が認められ、代表的な NMR 国際学会である ENC の招待講演をうけるとともに、国内学会の招待講演も増え、本分野のトップランナーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

５． 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Yuichi Minato, Shiho Suzuki, Tomoaki Hara, Yutaka Kofuku, Go Kasuya, Yuichiro Fujiwara, Shunsuke Igarashi, Ei-ichiro Suzuki, Osamu Nureki, Motoyuki Hattori, Takumi Ueda, and Ichio Shimada., “Conductance of P2X4 purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region”, ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** (2016) 113,4741-4746
2. Junya Okude, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Motohiko Sato, Naoyuki Nobuyama, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Takuya Mizumura, Kento Onishi, Mei Natsume, Masahiro Maeda, Hideki Tsujishita, Takefumi Kuranaga, Masayuki Inoue, and Ichio Shimada,“Identification of a Conformational Equilibrium That Determines the Efficacy and Functional Selectivity of the μ-Opioid Receptor”,***Angew. Chem. Int. Ed.*** (2015) 54, 15571-15576
3. Chie Yoshiura, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Masahiko Matsumoto, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Koh Takeuchi, and Ichio Shimada, “Elucidation of the CCR1- and

	CCR5- binding modes of MIP-1α by application of an NMR spectra reconstruction method to the transferred cross-saturation experiments", ***J. Biomol., NMR*** (2015) 63, 333-340
4.	Takumi Ueda, Chie Yoshiura, Masahiko Matsumoto, Yutaka Kofuku, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Koh Takeuchi, and Ichio Shimada, "Development of a method for reconstruction of crowded NMR spectra from undersampled time-domain data", ***J. Biomol., NMR*** (2015) 62, 31-41
5.	Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Junya Okude, Yutaro Shiraishi, Keita Kondo, Takuya Mizumura, Shiho Suzuki, and Ichio Shimada, "Functional dynamics of deuterated β_2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR Spectroscopy", ***Angew. Chem. Int. Ed.*** (2014) 53, 13376-13379

（2）特許出願

研究期間累積件数:0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

主要な学会発表

"Conductance of P2X4 receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region", 58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, California, March 25-31, 2017

"リガンドとの相互作用に伴う膜蛋白質の動的立体構造変化", 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢, 2015 年 9 月

"NMR による、限定されたデータからの GPCR の動的構造情報の抽出", 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 2014 年 7 月