

痛覚制御や血圧制御、薬物依存等に関与する受容体膜タンパク質、 ニューロテンシン受容体による G タンパク質活性化機構の解明

1. 発表者：

加藤 英明（東京大学 大学院総合文化研究科 先進科学研究機構 准教授）

井上 飛鳥（東北大学 大学院薬学研究科 准教授）

Ron Dror （スタンフォード大学 医学部分子細胞生理学科 教授）

Brian Kobilka （スタンフォード大学 医学部分子細胞生理学科 教授）

Georgios Skiniotis （スタンフォード大学 医学部分子細胞生理学科 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆多様な生理機能に関与する受容体膜タンパク質ニューロテンシン受容体(NTSR1)と G タンパク質の複合体構造を解明した。
- ◆2つの NTSR1-G タンパク質複合体の構造から、NTSR1 が G タンパク質を活性化する際に起こす構造変化を明らかにし、今まで報告されていなかった中間体構造を特定した。
- ◆NTSR1 は痛覚、血圧制御、薬物依存などさまざまな生理現象に関与するため、今回の構造情報は副作用を軽減させた鎮痛剤や降圧剤、薬剤依存治療薬の開発等に繋がることが期待される。

3. 発表概要：

ニューロテンシン受容体(NTSR1)（注 1）は、主にヒトの脳内や消化管で発現しており、血圧、体温、食欲、痛覚といった多様な生理機能の制御に加え、薬物依存やがん細胞の増殖などへの関与も報告されている G タンパク質共役型受容体(GPCR)（注 2）です。今回、東京大学大学院総合文化研究科の加藤英明准教授とスタンフォード大学医学部分子細胞生理学科の Brian Kobilka 教授らは、東北大学大学院薬学系研究科の井上飛鳥准教授のグループ、スタンフォード大学医学部分子細胞生理学科の Ron Dror 教授、Georgios Skiniotis 教授のグループなどとの共同研究のもと、NTSR1 と G タンパク質（注 3）との複合体構造を、クライオ電子顕微鏡（注 4）を用いた単粒子解析法（注 5）により、完全活性化状態と中間体状態の 2 状態で決定することに成功しました。さらに、立体構造をもとにした分子動力学シミュレーション（注 6）や変異体解析（注 7）により、NTSR1 による G タンパク質活性化の分子機構の一端を明らかにしました。今回の NTSR1-G タンパク質複合体の構造情報は、GPCR による G タンパク質の活性化機構に対する理解を大きく推し進めただけでなく、NTSR1 を標的とする薬剤開発の基礎となる情報を提供し、副作用を軽減させた鎮痛剤や降圧剤、薬剤依存治療薬の開発等に貢献することが期待されます。

4. 発表内容：

ニューロテンシン受容体は、ホルモンや神経伝達物質として働く内在性ペプチド”ニューロテンシン”（注 8）によって活性化される膜受容体タンパク質であり、1 型、2 型、3 型が存在しています。そのうち、1 型(NTSR1)と 2 型(NTSR2)は G タンパク質共役受容体(GPCR)に分類され、特に NTSR1 は体内の血圧や体温、食欲や痛覚の制御を担う他、薬物依存やがん細胞の増殖制御にも関わっていることが報告されています。そのため、NTSR1 の作動薬や阻害

剤は鎮痛剤や薬物依存の治療薬として利用できるのではないかと兼ねてより指摘されてきました。しかし、NTSR1の関わる生理機能が広範に渡るため、普通の作動薬や阻害剤は望んだ薬効以外の副作用を示してしまい、そのままでは薬として利用できませんでした。通常のGPCRは4種類存在するGタンパク質のうち1-2種類程度を選択的に活性化しますが、NTSR1は4種類のGタンパク質全てを活性化するという特徴を有しており、このことが、NTSR1が多様な生理機能に関与する理由の一つと考えられます。しかし、なぜNTSR1がそれだけ多くのGタンパク質を活性化できるのかということとはもとより、NTSR1によるGタンパク質活性化の分子機構は、いずれのGタンパク質についても殆ど分かっておりませんでした。

そこで、東京大学大学院総合文化研究科の加藤准教授とスタンフォード大学医学部分子細胞生理学科のKobilka教授らのグループは、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法を利用してヒト由来のNTSR1とG_{i1}タンパク質の立体構造を原子分解能で決定しました(図1)。

決定されたNTSR1-G_{i1}複合体は溶液中で2状態(C状態、NC状態)の構造を取っており、そのうちNC状態の構造は、C状態と比較してGタンパク質が45度回転するという非常に大きな構造変化を示していました。これは他のGPCR-Gタンパク質複合体において報告されたことのない全く新規の構造でした。

また、C状態のNTSR1が、活性化状態のGPCRに見られる(1)膜貫通ヘリックス(TM)の5番と6番が外向きに倒れる、(2)TMの7番が内向きに動く、という2つの構造的特徴を示していたのに対し、NC状態のNTSR1は外向きに倒れたTMの5番、6番を持つ反面、TMの7番が内向きに動いて「いない」という、活性化状態に見られる特徴と不活性化状態に見られる特徴を同時に有した構造を取っていました。そこで、スタンフォード大学医学部分子細胞生理学科のDror教授らのグループとの共同研究により分子動力学シミュレーションを行ったところ、C状態のNTSR1はNC状態を経て不活性化状態に構造遷移することが判明したため、NC状態の構造はGタンパク質がNTSR1によって活性化される際に形成する中間体状態であることが強く示唆されました。

さらに、NC状態においてのみG_{i1}タンパク質と相互作用しているNTSR1のアミノ酸残基に着目し、東北大学大学院薬学研究科の井上飛鳥准教授らのグループとの共同研究により変異体解析を行ったところ、同アミノ酸残基の変異体は数あるGタンパク質の中でもG_{i0}ファミリータンパク質の活性化効率のみを低下させることが判明しました(図2)。このことから、NC状態は確かに生理的に重要な中間体状態であるとともに、とりわけG_{i0}ファミリータンパク質との複合体形成においてのみ形成される特異的中間体であることが強く示唆されました。

以上のような多面的な解析により、(1)NTSR1の作動薬がNTSR1に結合すると、まず(2)TMの5番と6番が外側に倒れ、(3)Gタンパク質がNTSR1に結合し(=NC状態)、(4)TMの7番が内向きに動くのと同時にGタンパク質が大きく回転し(5)完全な活性化状態(=C状態)に遷移する、という、NTSR1による段階的なG_iタンパク質の活性化機構を提唱しました(図3)。

本研究によって、NTSR1、ひいてはGPCRによるGタンパク質活性化の分子機構に対する更なる理解が進むことが期待されます。また、特定のGタンパク質に特有な中間体構造の形成を阻害、あるいは促進する化合物をデザインすることで、今後、特定のGタンパク質シグナルのみを制御する手法が確立できる可能性が考えられます。これは、実現すれば、副作用を軽減し望んだ薬効のみを最大限引き出す薬剤候補化合物の開発にも繋がることが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：*Nature* (2019, Jun. 26)

論文タイトル：Conformational transitions of a neurotensin receptor 1-G_{i1} protein complex

著者：Hideaki E. Kato, Yan Zhang, Hongli Hu, Carl-Mikael Suomivuori, Francois Marie

Ngako Kadji, Junken Aoki, Kaavya Krishna Kumar, Rasmus Fonseca, Daniel

Hilger, Weijiao Huang, Naomi R. Latorraca, Asuka Inoue, Ron O. Dror, Brian K.

Kobilka* and Georgios Skiniotis* (※責任著者)

DOI 番号：10.1038/s41586-019-1337-6

アブストラクト URL：<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1337-6>

6. 注意事項：

日本時間 6月27日(木) 午前2時 (イギリス夏時間：26日(水) 午後6時)以前の公表は禁じられています。

7. 問い合わせ先：

東京大学 大学院総合文化研究科 先進科学研究機構

准教授 加藤 英明 (かとう ひであき)

Phone: 03-5465-7466

Email: hekato@bio.c.u-tokyo.ac.jp

8. 用語解説：

注1：ニューロテンシン受容体

ニューロテンシン(注8)と呼ばれる13アミノ酸のペプチドによって活性化される膜受容体タンパク質であり、1型、2型、3型が存在している。そのうち、1型(NTSR1)と2型(NTSR2)はGタンパク質共役受容体(GPCR)(注2)に分類され、特にNTSR1は体内の血圧や体温、食欲や痛覚の制御などさまざまな生理現象に関与することから着目されている。元々は1990年に京都大学中西重忠教授らのグループにより発見された。

注2：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)

細胞膜上に存在する受容体タンパク質の1ファミリー。光や匂い分子、ホルモンや情報伝達物質などを受容すると、その立体構造を変化させ、Gタンパク質(注3)と呼ばれる別のタンパク質を活性化する。活性化されたGタンパク質は細胞内のさまざまなシグナル伝達経路を活性化させ、細胞内へと情報を伝える。ヒトでは800種を超える数のGタンパク質共役型受容体が報告されており、殆どあらゆる生理現象に関与している。そのため、薬剤標的の候補としても注目されており、実際に市販の薬剤の約30%はこのGタンパク質共役型受容体を標的としている。

注 3 : G タンパク質

グアニヌクレオチド結合タンパク質の略称であり、結合した GTP を GDP に加水分解する働きを持つ。細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質であり、大きく 3 量体 G タンパク質と低分子量 G タンパク質に分類される。特に 3 量体 G タンパク質は G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ の 4 ファミリーに細分され、それぞれ異なるシグナル経路を活性化する。

注 4 : クライオ電子顕微鏡

低温に冷却したタンパク質試料に対して電子線を照射し、試料観察を行う方法。タンパク質の立体構造を決定する方法として近年目覚ましい技術革新を遂げており、2017 年には、その開発に貢献したイギリス、アメリカ、スイスの研究者三名 (Richard Henderson, Joachim Frank, Jacques Dubochet) にノーベル化学賞が贈られた。

注 5 : 単粒子解析法

タンパク質の立体構造を決定する方法のひとつ。高純度の精製タンパク質を凍結し、クライオ電子顕微鏡 (注 4) を用いて、さまざまな角度から見たタンパク質 1 分子ごとの画像を大量に収集する。その後、計算機を用いることで、得られた大量の画像から元のタンパク質の立体構造を再構成する。

注 6 : 分子動力学シミュレーション

タンパク質の機能を解析する上で幅広く用いられる手法の一つ。計算機の中で、タンパク質や周辺の脂質分子、水分子の原子間に働く力を計算し、ニュートン方程式を繰り返し解くことによって、分子の時間発展を追跡する。

注 7 : 変異体解析

タンパク質の機能を解析する上で幅広く用いられる手法の一つ。タンパク質の機能に重要と考えられるアミノ酸残基について、そのアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換した変異体タンパク質のプラスミドを用意し、その変異体タンパク質の機能を測定、評価することによって当該アミノ酸残基のタンパク質機能における寄与を推定する。本研究の場合は、NTSR1 と G タンパク質にそれぞれ発光タンパク質であるルシフェラーゼのフラグメントを融合させ、NTSR1 による G タンパク質の活性化にともなう、G タンパク質の乖離反応を発光強度の変化として測定した。

注 8 : ニューロテンシン

元々は 1973 年にウシの視床下部から単離された 13 アミノ酸からなるペプチドである。ホルモン、または神経伝達物質として働き、体内の血圧や体温、食欲や痛覚の制御などさまざまな生理現象に関与する。

9. 添付資料 :

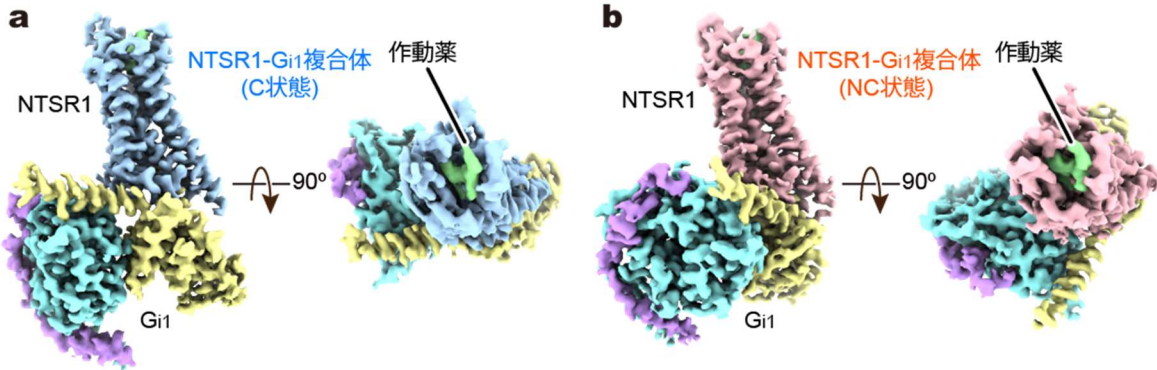


図1 NTSR1-Gi1 複合体の立体構造
(a)C 状態。(b)NC 状態。

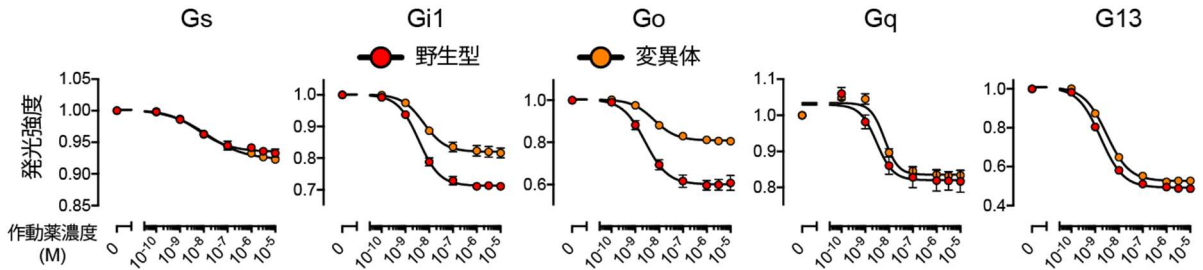


図2 NTSR1-G タンパク質複合体の変異体解析
変異体では Gi/o ファミリータンパク質のみシグナルが有意に減衰していることがわかる。

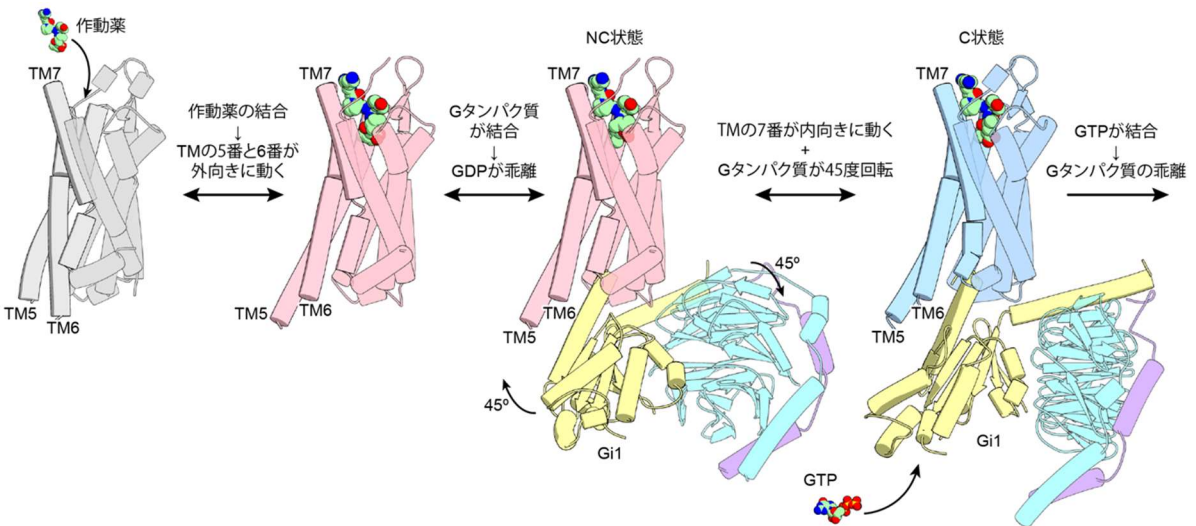


図3 NTSR1 による Gi タンパク質の活性化モデル