

■受領No.1407

## 新規の薬物依存治療法確立を目指した ペプチド GPCR のアレスチンバイアスリガンド開発

代表研究者

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



### Development of an arrestin-biased ligand for peptide GPCRs to establish a novel drug addiction treatment.

Principal Researcher

KATO Hideaki,

The University of Tokyo, Komaba Institute for Science Associate Professor

近年 GPCR の 1 つであるニューロテンシン受容体 (NTSR1) のアレスチンバイアスリガンドが薬物依存症の治療薬として有望視されている。そこで本研究では NTSR1 と G タンパク質、アレスチンとの複合体構造解析を行ない、得られた構造を比較することで G タンパク質シグナルを選択的に阻害する化合物の開発を目指した。現在までに NTSR1-アレスチン複合体、NTSR1-Gi,Go, Gq 複合体の構造解析に成功し、30 の候補化合物を得ることに成功している。

Recently, arrestin-biased ligands for the neurotensin receptor (NTSR1) have been viewed as a potential candidate for the treatment of drug addiction. In this study, we tried to solve the NTSR1 structures in complex with G protein or arrestin and compare them to develop compounds that selectively inhibit G protein signaling. To date, we have successfully solved the structures of the NTSR1-arrestin, -Gi, -Go, and -Gq complexes, and have succeeded in obtaining 30 candidate compounds.

#### 1. 研究内容

覚せい剤やアルコール、ニコチンなどに対する薬物依存症患者数は日本だけでも数千万人以上と考えられており、これらの依存症に対する安全性の高い治療法を確立することは喫緊の課題である。本研究では薬物依存症の治療標的として近年注目されている G タンパク質共役型受容体 (GPCR)、ニューロテンシン受容体 (NTSR1) に着目する。NTSR1 の作動薬であるニューロテンシン (NT) には薬物依存症の緩和効果があることが報告されていたが、そのシグナル多様性から様々な副作用を示すため、治療薬としては利用不可能であった。近年、NT による治療効果は NTSR1 のアレスチン

シグナル経路の活性化によるものであることがわかり、アレスチン経路を選択的に活性化させるアレスチンバイアスリガンドが俄かに注目を集めている。本研究において、代表研究者は自身のこれまでの GPCR 構造解析にて培った経験を生かし、NTSR1 とアレスチン複合体、G タンパク質複合体の構造解析を目指した。また、得られた構造を比較することで、NTSR1 が G タンパク質と特異的に相互作用する部位を検出し、in silico の化合物スクリーニングおよび細胞用いたアッセーを利用して、G タンパク質シグナルを選択的に阻害する化合物を開発することを狙った。

本研究では、プロジェクト全体を (1) hNTSR1-

アレスチン (Arr2) 複合体の cryoEM 構造解析、  
(2) hNTR1-G タンパク質複合体の cryoEM 構造解析(3)hNTR1-Arr2複合体と各種hNTR1-G タンパク質複合体の構造比較に基づいた「hNTR1とGタンパク質との結合を阻害する低分子化合物」の設計評価、という3つの課題に分割しておこなった。

### 課題1 hNTR1-Arr2 複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析

既に代表研究者は hNTR1-Gi1 複合体のクライオ電子顕微鏡構造を解明した経験を有していたため、同様の手法を用いて hNTR1 タンパク質を調製し、さらに、Arr2 については過去に報告された手法(Kang et al., *Nature*, 2015)に基づいて発現精製

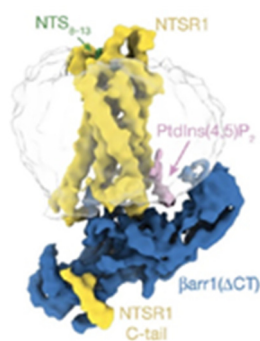


図1. hNTR1-Arr2の複合体構造

を行なった。得られた精製タンパク質同士を用いて hNTR1-Arr2 複合体調製を試みたが、安定な複合体形成にはGRK5によるhNTR1のリン酸化が重要であることが判明したため、hNTR1, Arr2に加えてGRK5の発現精製条件を確立するとともに、GRK5によるhNTR1のリン酸化条件の最適化を行なった。さらに、Arr2とhNTR1のsulfo-LC-SDAを用いた光クロスリンクを行うことでこの複合体を安定化させ、最終的にhNTR1-Arr2複合体のクライオ電子顕微鏡構造を4.2Åという分解能で決定することに成功した(図1)。得られた構造から、hNTR1に結合するArr2の配向はhNTR1と類似のGPCRであるrhodopsinに結合するArrの配向とはまるで異なる(90度近く回転している)ことが判明し、今までの当該研究領域における研究者の予想とは異なり、ArrのGPCRに対する結合様式には驚くほどの多様性が存在していることが判明した。さらに、

hNTR1とArr2の結合界面にはホスファチジルイノシトール(PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>)が結合しており、細胞ベースの機能解析と組み合わせることで、hNTR1によるArr2の活性化にはこのPIP2の結合が重要であることを見出すことができた。以上の結果は*Nature*誌のArticleに掲載された。

### 課題2 hNTR1-Gq, Go 複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析

既に代表研究者は hNTR1-Gi1 複合体のクライオ電子顕微鏡構造を解明した経験を有していたため、同様の手法を用いて hNTR1 タンパク質、Gq, Go タンパク質を調製した。得られた精製タンパク質同士を混合し、複合体を調製したのち、試料グリッドを作成し、これを用いて

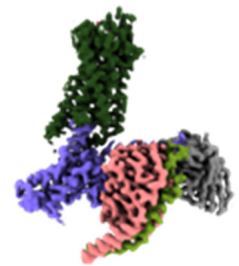


図2 hNTR1-Gq複合体の cryo-EM 構造

cryo-EM データ収集を行なった(クライオ電子顕微鏡としては東京大学の所有するKriosを利用)。得られたデータをRELION、cryoSPARCを用いて解析することにより、最終的にhNTR1-Gq複合体(図2)、Go複合体のcryo-EMを決定することに成功した(図3)。特にGo複合体については、これまで報告されたことのない、複合体形成反応における新規の中間体3種を見出すことに成功した。(現在代表研究者を最終著者及び責任著者として論文準備中。)

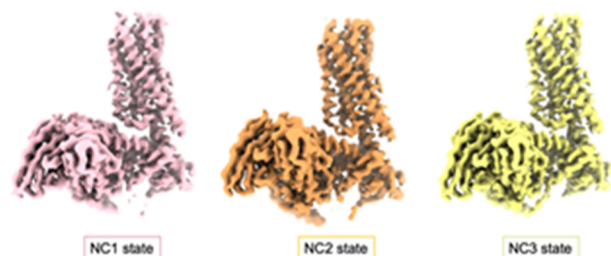


図3 NTR1-Go 複合体の3状態中間体 cryo-EM 構造

### 課題3 アレスチンバイアスアゴニストの設計

課題1,2によって得られた複合体構造を比較することで、hNTR1-Gタンパク質複合体、またはhNTR1-Arr2複合体に特異的なGPCR-Gタンパク質/アレスチン間の相互作用の検出を試みている。両構造の比較から、Arr2とGタンパク質はそれぞれ $\alpha 5$ ヘリックス、finger loopをGPCRの細胞内側のくぼみに突き刺すようにして結合していることが判明したが、その深さは $\alpha 5$ ヘリックスと比較してfinger loopの方がヘリックス1ターン程度浅いことがわかった。そこで、この深さの差を利用してGタンパク質の結合は阻害するがArr2の結合は阻害しない定分子化合物を*in silico*にて設計したところ、候補となる化合物を30種得ることに成功している。

## 2. 発表(研究成果の発表)

国内外の学会誌、学会講演会等における発表があれば5件程度記載。

記載内容:氏名、題目、誌名、巻、号、頁(年次)、学会名(場所、年次)

1. Huang, W., Masureel, M., Qianhui, Q., Janetzko, J., Inoue, A., **Kato, H.E.**, Robertson, M.J., Nguyen, K.C., Glenn, J.S., Skiniotis, G., Kobilka, B.K. Structure of the neurotensin receptor 1 in complex with  $\beta$ -arrestin 1. *Nature* 579, 303-308 (2020)
2. **Hideaki Kato**, Structural basis for the recognition of salient signals by GPCRs, 第43回日本神経科学大会, Zoom, 2020年7月30日
3. **Hideaki Kato**, CryoEM analysis of the GPCR neurotensin receptor 1 signaling complexes, 第93回日本生化学会大会, Zoom, 2020年9月15日
4. **Hideaki Kato**, CryoEM analysis of the GPCR neurotensin receptor 1-G protein complex for the future engineering of biased allosteric modulator, 第418回CBI学会講演会, Zoom, 2020年11月30日

5. 松井俊貴, 小柳淳暉, **加藤英明** クラスA GPCRの構造生物学 月刊「細胞」The CELL 53 (5), 4-7 (2021)