

■受領No.1407 (中間報告)

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



1. 研究目的

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NTSR1とGタンパク質の複合体解析を行なった自身の経験を生かし、NTSR1とアレスチン複合体の構造解析を目指す。得られた構造をNTSR1-Gタンパク質複合体と比較することで、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。これは、NTと組み合わせることでアレスチン経路を選択的に活性化するカクテルとして利用することが可能であり、NTSR1の

持つ複雑なシグナル経路を紐解くツールとなるばかりか、薬物依存症を緩和する新たな治療法へと繋がる可能性が期待される。

2. 研究内容

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)hNTSR1-G₁₁複合体とhNTSR1-Arr2複合体の構造比較に基づいた「hNTSR1とG₁₁との結合を阻害する低分子化合物」の設計評価、という2つの課題に分割しておこなう。1年目は特にこのうち1つ目の課題である「hNTSR1-Arr2複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析」に注力して研究を行なった。

課題1 hNTSR1-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hNTSR1-Gタンパク質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hNTSR1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を行なった。得られた精製タンパク質同士を用いてhNTSR1-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hNTSR1のリン酸化が重要であることが判明したため、hNTSR1, 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hNTSR1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)P₂)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。

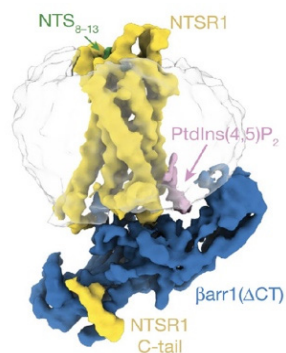


図1. hNTR1-Arr2の複合体構造

- 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)

3. 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を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 β -arrestin 1. *Nature* 579, 303-308 (2020)
2. Hideaki Kato, Structural basis for the