

2023年6月7日

東京大学

東北大学

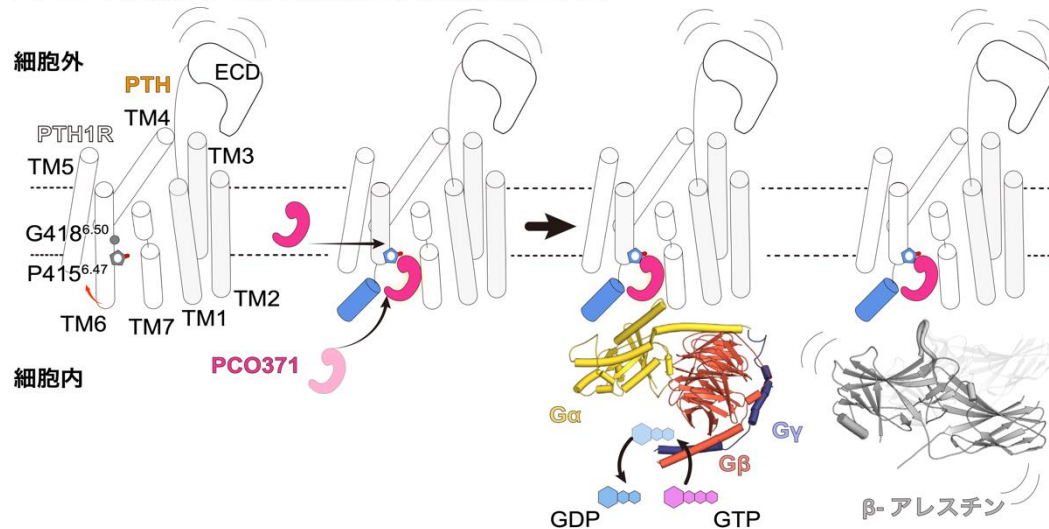
千葉大学

## GPCR 作動薬による新規の受容体活性化機構を解明 ——細胞内領域を標的とした副作用のない薬剤開発に貢献——

### 発表のポイント

- ◆クライオ電子顕微鏡を用いた構造研究により、副甲状腺ホルモン1型受容体（PTH1R）作動薬のPCO371が結合するユニークな部位を見出しました。
- ◆PCO371はGタンパク質共役型受容体（GPCR）に共通した細胞外領域を起点とした活性化様式を誘導せず、細胞内領域を直接活性化構造に誘導するとともに、受容体と三量体Gタンパク質を接着させるという新規の受容体活性化様式を持っていることが明らかになりました。
- ◆PCO371結合型PTH1Rはβアレスチンと結合しないことから、細胞内ポケットの形状を制御することで異なる種類のシグナル伝達を切り分けることが可能であることが明らかになりました。

### PCO371によるPTH1受容体の活性化メカニズム



PCO371によるPTH1Rの活性化メカニズム

### 発表概要

東京大学大学院理学系研究科の小林和弘博士課程学生（当時）、草木迫司助教、濡木理教授らの研究グループは、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析（注1）により、PCO371（注2）と結合したPTH1R及び三量体Gsタンパク質の立体構造を明らかにしました。GPCR（注3）は生物の細胞膜に存在する7回膜貫通型の受容体タンパク質であり、最大の創薬標的となるタンパク質群です。一般にGPCRは、その細胞外領域にリガンド（注4）が結合することで、活性化型構造へと変化し、その構造変化を感知して細胞内に三量体Gタンパク質（注5）及びβアレスチンを結合させシグナル（注6）を伝達します。近年、特定のシグナル伝達のみを誘導できる“バイアス型作動薬”（注7）が開発され、薬剤の主作用と副作用を分離する方法論が期

待されています。本研究の対象である副甲状腺ホルモン 1 型受容体 (PTH1R) (注 8) では、Gs タンパク質は薬効に関わる一方で、 $\beta$  アレスチンは副作用を生み出すことが知られており、Gs タンパク質選択的作動薬の開発が期待されています。本研究では低分子作動薬 PCO371 と結合した PTH1R 及び Gs タンパク質からなるシグナル複合体の立体構造解析を行いました。その結果、PCO371 がこれまで GPCR で報告されていない細胞内の薬剤ポケットに結合していることがわかりました (図 1)。また、PCO371 は PTH1R に加えて Gs タンパク質とも結合しており、2 つのタンパク質をノリのように接合させる結合様式を持つことが明らかになりました (図 1)。得られた構造に基づいて変異体機能解析を行ったところ、PCO371 は GPCR に保存された細胞外の構造変化を起点とする共通の活性化メカニズムを介さず、細胞内に進入し、PTH1R の細胞内ポケットを直接開口させるという新規の受容体活性化メカニズムを持つことを見出しました。これは、低分子薬物を用いて GPCR の細胞内領域を直接制御して、特定の下流のシグナルタンパク質を活性化するという手法論が可能であることを示します (図 2)。PTH1R のシグナル解析から、PCO371 は三量体 G タンパク質のみを選択的に活性化する一方で、 $\beta$  アレスチンは全く活性化しないことを見出しました (図 3)。PTH1R が  $\beta$  アレスチンを介して副作用を生み出すことを踏まえると、この PCO371 の薬剤プロファイルは PTH1R を介した薬剤開発に適したものであり、細胞内領域に着目して薬剤を開発することにより、直接的バイアス型作動薬を開発することが可能であることが示唆されました。

この研究成果により、細胞内の新規薬剤ポケット領域を狙った薬剤開発及びバイアス型作動薬機構の分子基盤が提供されたため、細胞内領域を狙った薬剤開発及び副作用を軽減した薬剤開発への全く異なる創薬アプローチが可能になると期待されます。

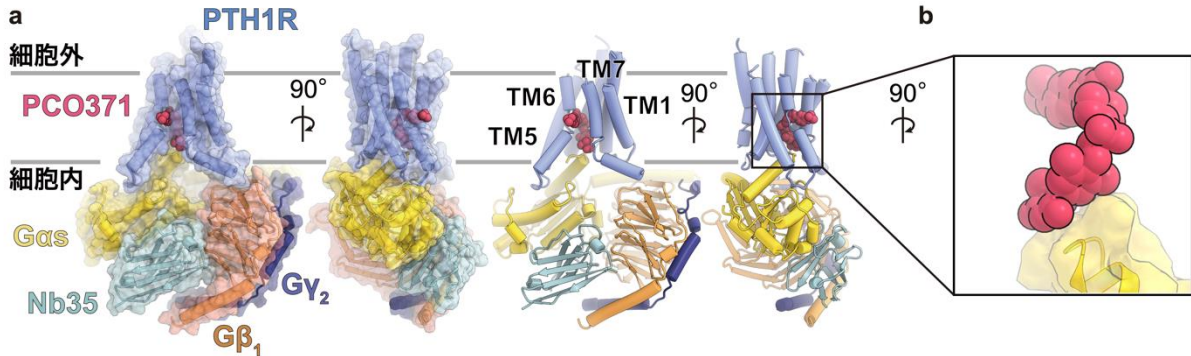
## 発表内容

### 〈研究の背景〉

GPCR は生物の細胞膜に存在するシグナル伝達タンパク質であり、ヒトにおいては約 800 種と最大の遺伝子ファミリーを形成することで多様な生命現象を制御しています。このような側面から、既存の医薬品の約 30% が GPCR の活性化状態を調節するものであり、GPCR を標的とした医薬品の改良・新規医薬品の開発が注目されています。GPCR は細胞外に特定のリガンドを結合させることで活性化し、細胞内領域へと連続した構造変化を惹起し、細胞内の三量体 G タンパク質及び  $\beta$  アレスチンへとシグナルを伝達する共通のメカニズムが存在します。これまでに数多の薬剤が開発され、構造解析を介してその共通した細胞外領域から細胞内領域へのシグナル変換メカニズムが明らかになってきました。天然のリガンドはこれら 2 つのシグナルそれぞれを強く活性化する一方で、薬効に関わるシグナルは通常一部であることから、それ以外のシグナルの活性化は副作用につながります。逆に、特定のシグナルを活性化するリガンド“バイアス型作動薬”は副作用のリスクを抑えて薬効を発揮できることが期待されています。このようなバイアス型作動薬の創薬については、低分子の内因性リガンドを受容する GPCR においては成功例がありましたが、class B1 GPCR (注 9) を始めとした比較的大きなリガンド (主にペプチドリガンド) を受容する GPCR では薬剤の改良が難しいことから有用なバイアス型作動薬の開発方針は存在しておりませんでした。また、GPCR のリガンドは細胞外に結合し、間接的に細胞内領域の立体構造を制御しており、バイアスドリガンド開発へ向けた合理的な薬剤設計方針についても存在しておりませんでした。

〈研究の内容〉

当研究グループは、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、PCO371 と結合した PTH1R 及び三量体 Gs タンパク質の立体構造を明らかにしました (図 1)。過去の研究では、PCO371 は PTH1R の細胞外領域に結合するものと推定されていましたが、今回の構造解析か



らは PCO371 は細胞内領域に結合していることがわかりました。さらに、この PCO371 は PTH1R 及び Gs タンパク質を接着させるような結合様式を持つことが明らかになりました (図 1)。

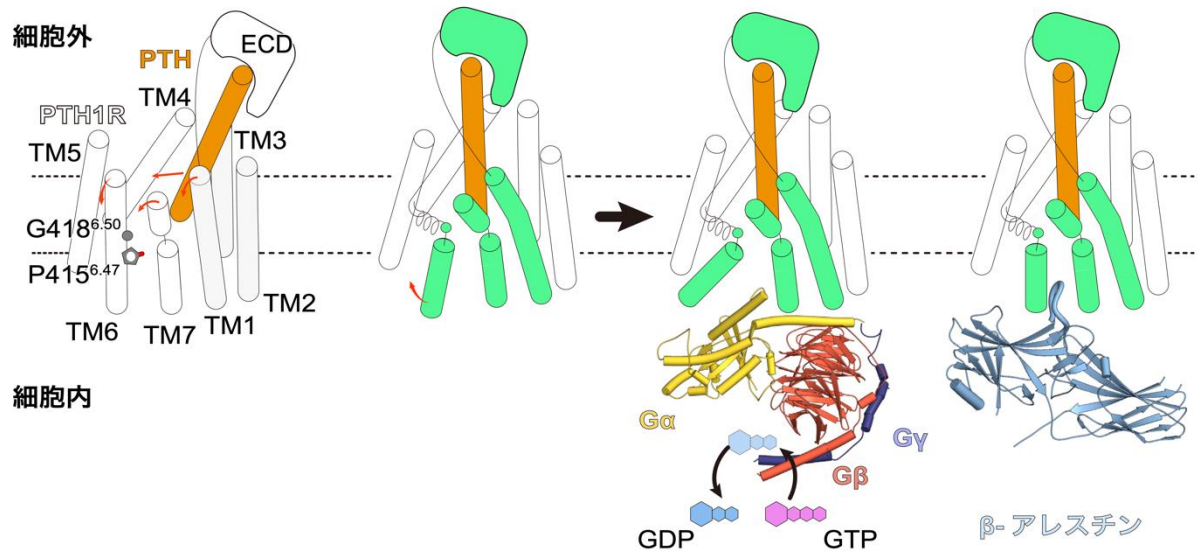
図 1 PCO371 受容体のシグナル伝達複合体の全体構造

(a) PCO371 結合型 PTH1R と Gs タンパク質のシグナル伝達複合体の全体構造を表している。Gs タンパク質は Gs, Gβ<sub>1</sub>, Gγ<sub>2</sub> の 3 量体から構成されており、今回の研究では PCO371 が PTH1R に加え Gs と共結合する新規の結合様式が示された。

(b) 受容体に加え G タンパク質とも直接結合する新規の結合様式を表している。

この PCO371 結合ポケットは、これまで他の GPCR において相同な部位は報告されておらず、極めてユニークな位置であることがわかりました。PCO371 は細胞膜を透過し直接このポケットに結合することで、細胞内領域のみを活性化構造に遷移させることが考えられます (図 2)。

## PTH による PTH1 受容体の活性化メカニズム



## PCO371 による PTH1 受容体の活性化メカニズム

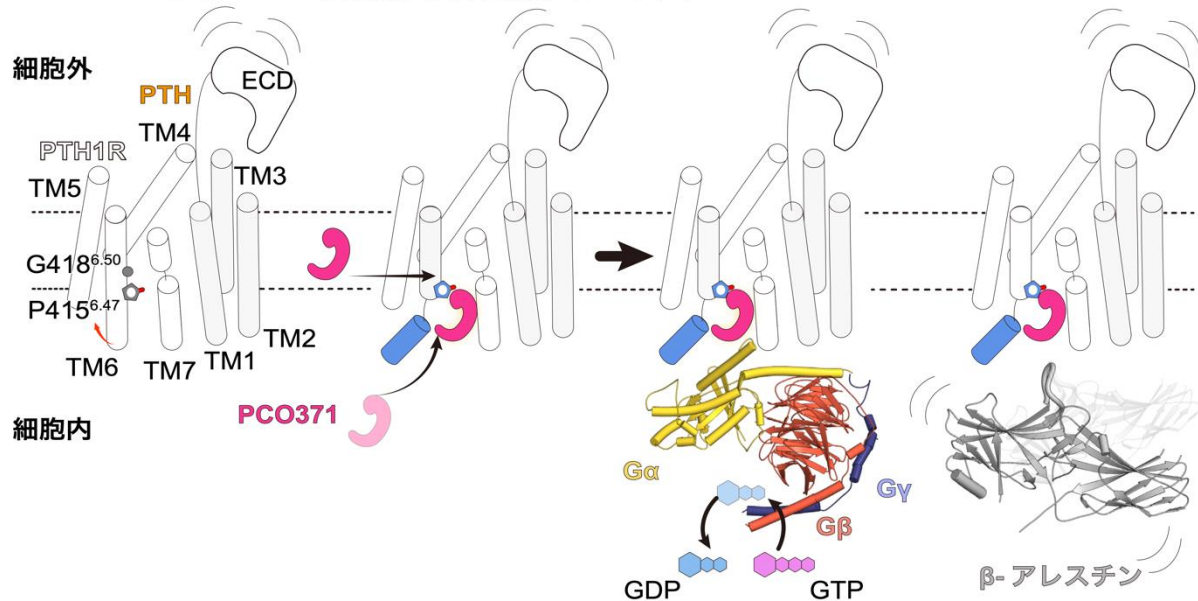


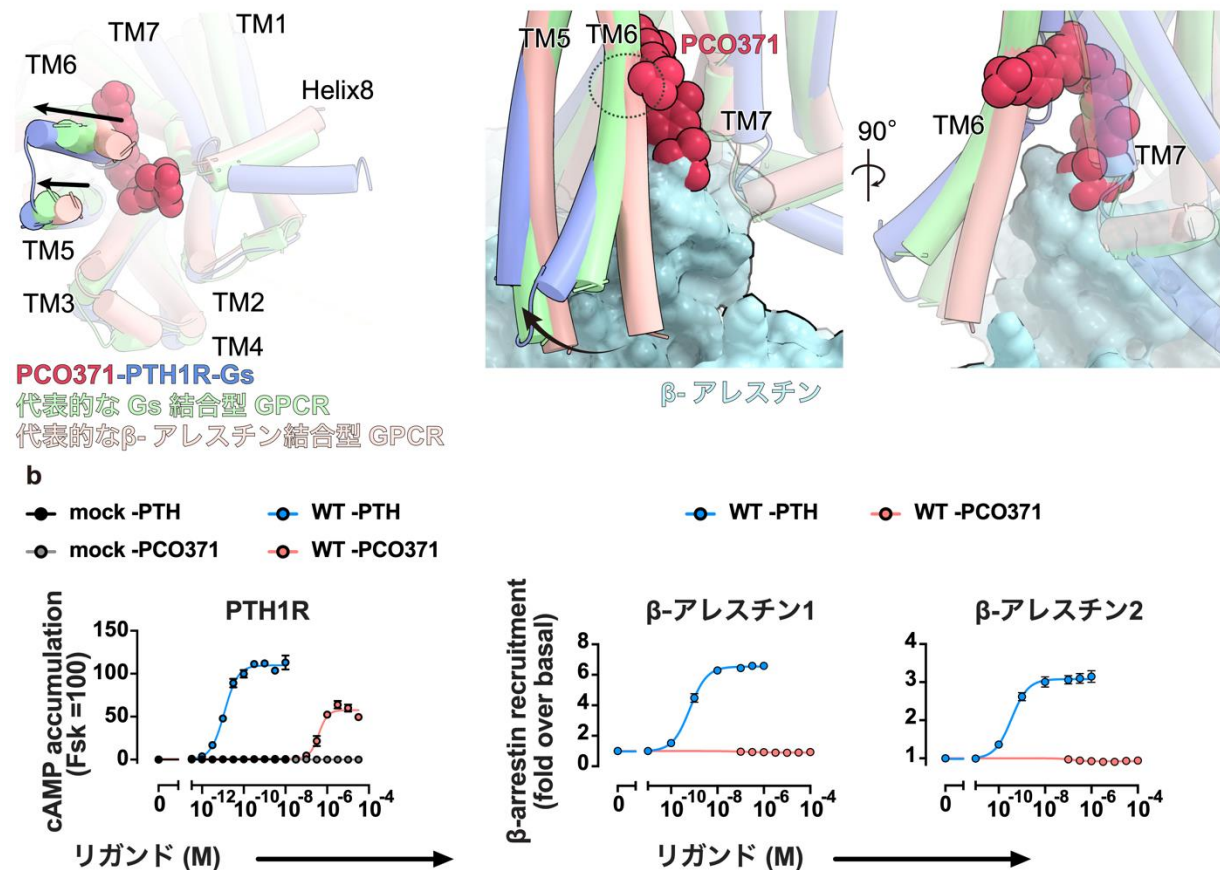
図 2 PCO371 の持つ新規の受容体活性化様式

申請者らがこれまでに明らかにした内在性作動薬 PTH 及び本研究により明らかになった PCO371 による PTH1R の活性化様式を比較している。PTH は細胞外領域に結合し、GPCR に保存された細胞外領域から細胞内領域に向かった連続した構造変化を誘導し、G タンパク質及び β-アレスチンを活性化する。その一方で、PCO371 は PTH1R の細胞内領域に直接侵入し、受容体の細胞内領域のみを直接活性化構造に変化させる。

すなわち、PCO371 はこれまで全ての GPCR 作動薬が利用していた細胞外領域から細胞内領域への保存された活性化機構ではなく、細胞内領域のみを直接的に活性化構造へと遷移させるという新規の活性化様式を持つことが示唆されました。また、PCO371 は TM6 を大きく開口させ三量体 G タンパク質選択的な受容体の立体構造を保持していました (図 3)。これまでの研究から、GPCR はその第 6 膜貫通ヘリックス (TM6) が大きく開口することで三量体 G タンパク質を選択的に結合させ、TM6 が小さく開口することで β アレスチンを選択的に結合させ



ることが知られています。東北大学大学院薬学研究科の川上耕季助教（研究当時）、井上飛鳥教授らは、これらの構造に基づく変異体 PTH1R の機能解析を実施し、PCO371 は細胞外領域に



依存せず直接的に細胞内領域を活性化させることを実証するとともに、三量体 G タンパク質に対して選択的な活性化能を持つバイアスドリガンドであることを明らかにしました（図 3）。

**図 3 PCO371 によるバイアスドリガンドシグナリングメカニズム**

(a) 同一受容体に対する Gs タンパク質結合型構造及び β-アレスチン結合型構造と PCO371 結合型 PTH1R の構造比較を表している。PCO371 結合型 PTH1R の第 6 膜貫通ヘリックス(TM6)は、受容体外向きに向かって大きく開口した状態で固定されており、G タンパク質結合に適した大きなポケットを作り出している。この PCO371 の結合様式は受容体が β-アレスチンに適した小さなポケットを形成することを妨げており、β-アレスチンと親密な結合を作り出すことができない。

(b) PTH 及び PCO371 による Gs タンパク質(左図)及び β-アレスチン(右図)の活性評価を表している。PCO371 は Gs タンパク質を活性化する一方で、β-アレスチンは全く活性化しない。

さらに、研究グループは PCO371 の結合ポケットを構成するアミノ酸残基が多くの class B1 GPCR に保存されていることを見出し、機能解析の結果、PCO371 は 15 個中 7 個の class B1 GPCR に対して作動活性を示すことを明らかにしました（図 4）。class B1 GPCR は一般的に β アレスチンを介して副作用を生じること、このような多数の受容体に保存された共通のポケットはこれまで発見されていなかったことを踏まえると、本研究によって明らかになった薬剤ポケットは大半の class B1 GPCR に対して副作用のない薬剤開発に役立つものであると考えられます。

本研究は GPCR の長い歴史に新たな 1 ページを記すものであり、GPCR の薬剤開発において、新しい可能性を提案するものであります。

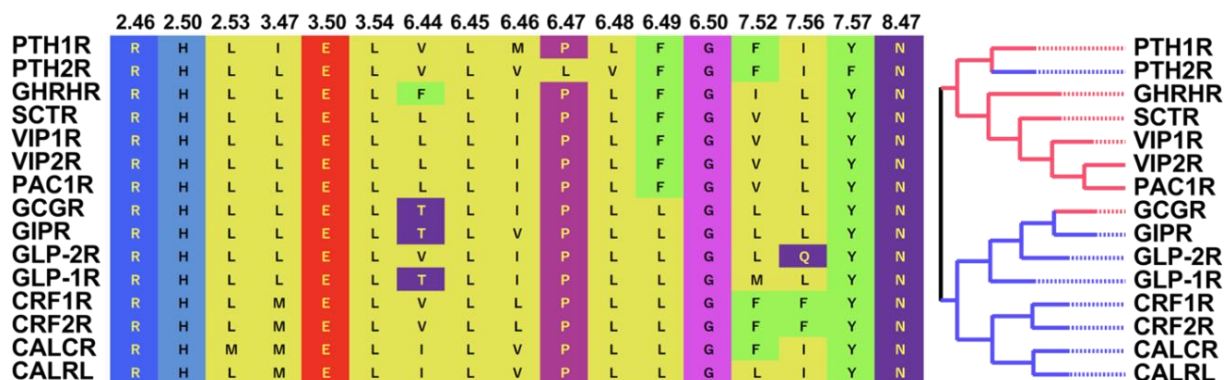


図 4 PCO371 により活性化される class B1 GPCR

PCO371 の結合していた新規細胞内ポケットは class B1 GPCR に広く保存されていることが明らかとなった(左図)。そこで、全 class B1 GPCR に対し PCO371 による Gs タンパク質の活性機能評価を行ったところ、約半数の class B1 GPCR が PCO371 により活性化され、Gs タンパク質へとシグナル伝達が可能であることが明らかになった(右図)。

#### 〈今後の展望〉

本研究は、立体構造解析、計算機シミュレーション、培養細胞の機能解析を組み合わせることで、細胞内領域の構造変化が引き金となる新規の GPCR 活性化機構を明らかにしたものです。本研究によって明らかになったユニークな GPCR 活性化様式から、class B1 GPCR の細胞内ポケットを標的とすることで副作用を低減した薬剤の合理的設計が可能であることが期待されます。

## 発表者

東京大学

大学院理学系研究科 生物科学専攻

濡木 理 (教授)

草木迫 司 (助教)

大学院総合文化研究科 広域科学専攻

小林 和弘 (特任研究員) <研究当時: 理学系研究科生物科学専攻 博士課程学生>

川上 耕季 (日本学術振興会特別研究員) <研究当時: 東北大学大学院薬学研究科 助教>

東北大学大学院薬学研究科 分子細胞生化学分野

井上 飛鳥 (教授)

千葉大学大学院理学研究院

村田 武士 (教授)

## 論文情報

〈雑誌〉 Nature  
〈題名〉 class B1 GPCR activation by an intracellular agonist  
〈著者〉 Kazuhiro Kobayashi<sup>1‡</sup>, Kouki Kawakami<sup>2‡</sup>, Tsukasa Kusakizako<sup>1</sup>, Atsuhiko Tomita<sup>1</sup>, Michihiro Nishimura<sup>1</sup>, Kazuhiro Sawada<sup>1</sup>, Hiroyuki H. Okamoto<sup>1</sup>, Suzune Hiratsuka<sup>2</sup>, Gaku Nakamura<sup>2</sup>, Riku Kuwabara<sup>2</sup>, Hiroshi Noda<sup>4</sup>, Hiroyasu Muramatsu<sup>3</sup>, Masaru Shimizu<sup>3</sup>, Tomohiko Taguchi<sup>4</sup>, Asuka Inoue<sup>2\*</sup>, Takeshi Murata<sup>5\*</sup>, Osamu Nureki<sup>1\*</sup>  
‡共同筆頭著者 \*共同責任著者 (1) 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 (2) 東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野 (3) 中外製薬株式会社 (4) 東北大学大学院薬学研究科細胞小器官疾患学 (5) 千葉大学大学院理学研究科  
〈DOI〉 10.1038/s41586-023-06169-3  
〈URL〉 <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06169-3>

## 研究助成

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業の「クライオ電子顕微鏡を用いた class B1 GPCR の構造解析」(課題番号: 20J21820 研究代表者: 小林和弘)、「生態環境での GPCR ダイナミクス」(課題番号: 21H05037 研究代表者: 濡木理)をはじめとする科学研究費助成事業 (課題番号: 19H03163, 21H05142, 21H04791, 21H05113, JPJSBP120213501, JPJSBP120218801)、および、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (BINDS) (課題番号: JP20am0101095)、革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ (PRIME) (課題番号: JP19gm5910013)、革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ (LEAP) (課題番号: JP20gm0010004)、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業さきがけ (課題番号: JPMJPR1331) およびムーンショット型研究開発事業 (課題番号: JPMJMS2023)、武田科学振興財団、アステラス病態代謝研究会、花王芸術科学財団、持田記念医学薬学振興財団、東京生化学研究会、第一三共生命科学振興財団、上原記念生命科学財団、中外製薬株式会社など多くの支援を受けて行われました。

## 用語解説

(注1) クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析 :

電子顕微鏡を用いてタンパク質を始めとした多数の生体高分子の像を撮影し、これらの画像を重ね合わせるによりその立体構造を再構成、生体高分子の立体構造を決定する手法である。この手法では液体窒素 (-196°C) 等により極低温に冷却された試料に対して電子線を照射し、資料を透過した電子線を検出することにより試料の観察を行う。ここ 10 年間で試料の測定方法や検出器などが目覚ましい技術革新を遂げており、タンパク質の立体構造を高破壊能で決定する手法として広く知られてきた。この技術革新の功績から、その開発に貢献した海外の研究者 3 名に対し、2017 年度のノーベル化学賞が贈られた。

(注3) PCO371 :

中外製薬が開発した非ペプチド性の経口投与可能な PTH1R 作動薬のこと。注射による投与が必要であったこれまでの PTH1R 作動薬と異なり経口投与により患者の身体的負担を低減した

薬剤となることが期待されている。PTH1R はペプチド性作動薬による活性化機構のみが明らかになっており、非ペプチド性作動薬による活性化機構は明らかになっていなかった。

(注3) Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) :

GPCR は細胞膜に発現する 7 回膜貫通型タンパク質であり、最大のファミリー (ヒトでは約 800 種) を形成するタンパク質として知られている。GPCR は細胞外の特定のリガンドのみにより活性化し、膜貫通部位の構造変化により細胞内の三量体 G タンパク質を活性化可能な状態になる。特定の細胞外刺激物質 (リガンド) のみが結合できるように進化した各受容体により、実質的にヒトのほぼ全ての生命現象が制御されることが知られており、GPCR を標的とした薬剤は既承認医薬品の 30%以上を占めている。本研究の対象であるクラス B1 の GPCR は細胞外ドメインと膜貫通ドメインの 2 つのドメインから構成され、ペプチドホルモンを受容するグループである。

(注4) リガンド :

リガンドとは機能をもつタンパク質に特異的に結合する物質であり、標的タンパク質に結合することで標的タンパク質の立体構造を変化させる。リガンドと標的タンパク質はいわば鍵穴と鍵の関係にあり、鍵であるリガンドが標的の鍵穴へと特異的に結合する。

(注5) 三量体 G タンパク質 :

細胞内情報伝達に関わる GTP 結合タンパク質であり、 $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$  サブユニットの 3 量体により構成されている。三量体 G タンパク質はアゴニストの結合した GPCR によって活性化され、活性化された G タンパク質は GDP-GTP 交換反応を伴って  $G\alpha$  と  $G\beta$ - $G\gamma$  の 2 つに解離する。解離した各サブユニットはそれぞれ異なる下流のシグナル伝達因子と結合し、そのシグナル伝達因子を活性化することで、細胞内において様々なシグナル応答を生じる。

(注6) シグナル :

GPCR を介した細胞プロセスを表し、G タンパク質や  $\beta$ -アレステリンによって担われている。このプロセスの種類により生じる生理応答が異なることから、特定のシグナルのみを惹起するリガンド開発が注目されている。

(注7) バイアス型作動薬 :

複数存在する GPCR を介した生理プロセスのうち、特定の生理活性経路のみを選択して活性化させる薬剤。近年、GPCR の特定の経路が副作用を惹起する例が複数報告され、薬理作用経路のみを活性化するバイアスドリガンドが注目を集めている。

(注8) 副甲状腺ホルモン 1 型受容体 (PTH1R) :

PTH1R は 2 つの内臓性ホルモンである PTH と PTHrP により活性化し、骨の形成から維持までに必須の役割を果たす G タンパク質共役型受容体である。PTH1R は骨の形成と破壊、そしてそれに伴う体内のカルシウム恒常性を制御していることから、PTH1R を標的とした医薬品開発は急性カルシウム血症、副甲状腺機能低下症、骨粗しょう症といった様々な疾患の治療が可能となることが期待されている。特に、PTH 投与による PTH1R の活性化は骨粗しょう症を有意に回復させることから、PTH や PTHrP を改変した骨粗しょう症治療薬開発が進められてきた。



(注9) class B1 GPCR :

GPCR 全体に保存されている 7 回膜貫通タンパク質ドメインに加え、N 末端領域に共通した 120~160 アミノ酸で構成される細胞外ドメインを持つ受容体群。30 残基を超える生理活性ペプチドホルモンを受容することにより活性化し、主に三量体 Gs タンパク質と  $\beta$  アレスチンを活性化することにより生理機能を発揮する。class B1 GPCR の多くの受容体が  $\beta$  アレスチンを介して副作用を生じることから G タンパク質バイアスドリガンド開発が重視されているものの、結合するリガンドが大きく複雑であることから、バイアスドリガンド開発が難しい受容体群として知られている。

## 問合せ先

〈研究に関する問合せ〉

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

教授 濡木 理 (ぬれき おさむ)

TEL : 03-5841-4394 E-mail : nureki@bs.s.u-tokyo.ac.jp

東北大学大学院薬学研究科分細胞生化学分野

教授 井上 飛鳥 (いのうえ あすか)

TEL : 022-795-6861 E-mail : iaska@tohoku.ac.jp

千葉大学大学院理学研究院

教授 村田 武士 (むらた たけし)

TEL : 03-5452-6483 E-mail : t.murata@faculty.chiba-u.jp

〈報道に関する問合せ〉

東京大学大学院理学系研究科 理学部・広報室

TEL : 03-5841-8856 E-mail : media.s@gs.mail.u-tokyo.ac.jp

東北大学大学院薬学研究科・薬学部 総務係

TEL : 022-795-6801 E-mail : ph-som@grp.tohoku.ac.jp

千葉大学広報室

TEL : 043-290-2018 E-mail : koho-press@chiba-u.jp