

メラトニン受容体のシグナル伝達複合体の構造を解明 ～ 睡眠や概日リズムの構造基盤の理解と睡眠薬の開発に貢献 ～

1. 発表者：

岡本 紘幸（東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 博士課程1年）
井上 飛鳥（東北大学大学院薬学研究科 准教授）
西澤 知宏（東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 准教授（研究当時）／
横浜市立大学大学院生命医科学研究科 生体膜ダイナミクス研究室 教授（現所属）
濡木 理（東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 教授）
寿野 良二（関西医科大学医学部 医化学講座 講師）
清水（小林）拓也（関西医科大学医学部 医化学講座 教授）
野村 紀通（京都大学大学院医学研究科 分子細胞情報学分野 准教授）
岩田 想（京都大学大学院医学研究科 分子細胞情報学分野 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ 睡眠薬ラメルテオンと G_i タンパク質三量体（注1）が結合したメラトニン受容体（注2） MT_1 のシグナル伝達複合体（注3）の立体構造を解明することに成功しました。
- ◆ 受容体の活性化に重要なラメルテオンとの相互作用を特定しました。さらに、他のシグナル伝達複合体との構造比較から、 G タンパク質の共役選択性を特徴づける受容体の細胞内側の空間的な特徴を見出しました。
- ◆ 本研究は、メラトニン受容体を標的とする創薬開発に貢献するとともに、GPCR（注4）のシグナル伝達の初発段階である G タンパク質共役選択性の理解につながります。

3. 発表概要：

睡眠は我々の生命維持に必須であり、ホルモンなど多様な情報伝達物質で制御されます。本研究で着目したメラトニン（注5）は特に睡眠の誘導で中心的な役割を果たし、その過程では GPCR の一種であるメラトニン受容体と G_i タンパク質三量体による神経細胞の活動を抑制するシグナルが重要となります。メラトニン受容体は睡眠障害に対する治療標的として注目され、2010年に不眠症治療薬ラメルテオン（商品名ロゼレム）が承認されています。そのため、メラトニン受容体を含むシグナル伝達複合体の構造決定は睡眠のメカニズムの原子レベルでの理解のみならず、より効果的な薬の開発に貢献します。近年メラトニン受容体の結晶構造が報告されましたが、これらは不活性型構造を示しており、メラトニン受容体の活性化に伴う構造変化やシグナル伝達因子である G_i タンパク質三量体と選択的に共役する機構は不明なままでした。

今回、東京大学大学院理学系研究科の濡木理 教授らのグループは、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法（注6）でメラトニン受容体 MT_1 と G_i タンパク質三量体で構成されるシグナル伝達複合体の立体構造を解明しました。さらに国内外の複数の研究室との共同研究の下で機能解析やバイオインフォマティクス解析を行い、受容体の活性化メカニズムや G_i タンパク質三量体と選択的に結合する機構を明らかにしました。この研究成果により、睡眠障害の治療薬開発が促進されると共に、GPCR と G タンパク質との選択的なシグナル伝達に関する研究が進展することが期待されます。

本研究の成果は、英国夏時間 8 月 5 日（午後 4 時、日本時間：8 月 6 日午前 0 時）に科学雑誌 *Nature Structural and Molecular Biology* 誌に掲載されました。

4. 発表内容：

研究の背景・先行研究における問題点

メラトニンは夜間に分泌され、睡眠の誘導や概日リズム（注 7）の制御に関与するホルモンです。分泌されたメラトニンは、膜受容体タンパク質である GPCR の一種のメラトニン受容体に結合し、メラトニン受容体が G_i タンパク質三量体を介して細胞内に抑制性シグナルを伝達することで、最終的に睡眠の誘導などの生理作用をもたらします。これらの生理作用の重要性から、メラトニンおよびメラトニン受容体は、睡眠障害などの治療標的として注目を集めており、多くの作動薬（注 8）が開発され、臨床に用いられていますが、これらの薬剤がどのようにしてメラトニン受容体に作用してシグナルを伝えるのかについてはあまり分かっていませんでした。

近年、X 線結晶構造解析によって、睡眠障害の治療薬が結合した状態でメラトニン受容体の立体構造が報告され、薬剤の認識機構などが解明されました。しかし一連の構造解析では、受容体の安定化のために様々な変異が導入された、生理活性を示さないような変異体が用いられていました。そのため、受容体を活性化状態にする作動薬が結合しているにも関わらず不活性化型の構造を示しており、生理的な状況を反映していない状態でした。以上から、メラトニン受容体がリガンドによって活性化するメカニズムは不明なままであり、治療薬の開発に求められる詳細な作動メカニズムは解明されていない状況にありました。

研究内容（具体的な手法など詳細）

今回、東京大学大学院理学系研究科の岡本紘幸 大学院生、西澤知宏 准教授（研究当時）、濡木理 教授らの研究グループは、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法を用いて、リガンドが結合し活性化したメラトニン受容体 MT_1 および G_i タンパク質三量体で構成されるシグナル伝達複合体の立体構造を解明しました（図 1）。これにより、メラトニン受容体が活性化するメカニズムを明らかにしました。さらに、東北大学の井上飛鳥 准教授の開発した G_i タンパク質三量体の活性化検出法を用いたメラトニン受容体の変異体解析により、先行研究では明らかとなっていなかった受容体の活性化に重要なアミノ酸残基を新しく特定することに成功しました（図 2）。

GPCR によって活性化される G タンパク質にはいくつかの種類があり、 MT_1 は G_i と呼ばれる G タンパク質を選択的に活性化することが知られています。GPCR は一般的に活性化に際して 6 番目の膜貫通ヘリックス（TM6）が構造変化することが知られていますが、 MT_1 受容体では他の G_i シグナル伝達受容体（注 4）に比べて TM6 が大きく跳ね上がるように動くことを見出しました（図 3）。これまでの研究から、 G_i シグナル伝達受容体では G_s シグナル伝達受容体（注 4）に比べて、この TM6 の構造変化が小さく、この違いが共役する G タンパク質の選択性を決めていると考えられてきました。一方、今回明らかにした MT_1 受容体では、 G_s シグナル伝達受容体と同程度の大きさで TM6 の構造変化が見られました。したがって、この TM6 の動き自体は G タンパク質シグナルの選択性とは直接的には関係がなく、TM6 の構造変化の程度はむしろ TM6 の疎水性アミノ酸の分布に大きく依存することが示唆されました。

一方で、GPCR の構造を網羅的に比較したところ、 G_i シグナル伝達受容体では、細胞内側の空間が G_s シグナル伝達受容体に比べて狭いという特徴がわかりました（図 4）。さらに G_s シグナル伝達受容体に比べて、 G_i シグナル伝達受容体では細胞内ループなどを介した相互作用が弱く、 G_i の C 末端のみで相互作用していることが明らかになりました。イタリア Scuola Normale Superiore di Pisa の Raimondi 准教授による構造情報を用いたバイオインフォマティクス解析の結

果から、 G_s シグナル伝達受容体間では G タンパク質と受容体の相互作用が保存されている一方で、 G_i シグナル伝達受容体ではばらつきが大きく、受容体ごとにやや柔軟な相互作用を形成していることが明らかになりました。以上から G_i 共役と G_s 共役の選択性は TM6 の構造変化の程度の違いだけで決まるというこれまでの考えに対し、受容体の細胞内側の空間的な特徴や、細胞内ループを介した G タンパク質との相互作用など、より多くの要素が複合的に選択性に寄与することが明らかになりました。

社会的意義・今後の予定

本研究における活性化型のメラトニン受容体の立体構造と、先行研究の X 線結晶構造解析による不活性化型の立体構造とを組み合わせることで、計算機シミュレーションによるメラトニン受容体の薬剤探索が加速することで、不眠症や、時差ボケなど概日リズムの乱れによる体調不良に対する治療薬の開発へとつながることが期待されます。

本研究は、日本学術振興会における科学研究費助成事業の特別推進研究「物理刺激で制御される膜蛋白質の分子機構の解明」（研究代表者：濡木理）および若手研究（A）「 G タンパク質共役型受容体のリガンド多様性に関する構造的基盤の研究」（研究代表者：西澤知宏）の一環で行われました。また、本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）「創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業」の一環として、クライオ電子顕微鏡などの大型施設の外部開放を行うことで優れたライフサイエンス研究の成果を医薬品等の実用化につなげることを目的とした「創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS）」の支援および「革新的先端研究開発支援事業」ソロタイプ（PRIME）の支援により行われました。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Nature Structural and Molecular Biology*」（オンライン版）

論文タイトル：Cryo-EM structure of the human MT_1 - G_i signaling complex

著者：Hiroyuki H. Okamoto, Hirotake Miyauchi, Asuka Inoue*, Francesco Raimondi, Hirokazu Tsujimoto, Tsukasa Kusakizako, Wataru Shihoya, Keitaro Yamashita, Ryoji Suno, Norimichi Nomura, Takuya Kobayashi, So Iwata, Tomohiro Nishizawa*, Osamu Nureki*（*：共同責任著者）

DOI 番号：10.1038/s41594-021-00634-1

アブストラクト URL：https://www.nature.com/articles/s41594-021-00634-1

6. 用語解説：

（注1） G_i タンパク質三量体、 G タンパク質三量体：

G タンパク質は、細胞内情報伝達に関わる GTP 結合タンパク質であり、 G_α 、 G_β 、 G_γ サブユニットの三量体によって構成され、活性化された GPCR（注5）によって活性化されます。活性化された G タンパク質三量体では GDP-GTP 交換反応が起き、 G_α と G_β - G_γ の二つに解離します。解離したサブユニットが下流のシグナル伝達因子と結合し活性化することで、細胞に様々なシグナル応答が生じます。 G_α サブユニットは大きく G_s 、 G_i 、 $G_{q/11}$ 、 $G_{12/13}$ の4種類に分別され、特に G_i タンパク質三量体は、下流でアデニル酸シクラーゼの活性を阻害することで、抑制性のシグナルを伝達します。

(注2) メラトニン受容体：

メラトニン受容体は、低分子リガンドを結合して従来からの主な創薬標的であるクラス A GPCR に分類され、メラトニンと結合することで活性化状態となり、アデニル酸シクラーゼを不活性化抑制する G タンパク質三量体 (G_i タンパク質三量体) を選択的に活性化します。メラトニン受容体には MT₁ と MT₂ の 2 つのサブタイプが存在し、主に脳の視交叉上核に発現する MT₁ が、特に睡眠の誘導で重要な役割を果たすことが知られています。

(注3) シグナル伝達複合体：

活性化した GPCR は G タンパク質三量体と結合することでシグナル伝達複合体を形成し、G タンパク質三量体での GDP-GTP 交換反応が起きやすい立体構造に安定化されます。クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法の発達によって、これまでに多くの GPCR シグナル伝達複合体の立体構造が報告されてきました。

(注4) GPCR (G タンパク質共役受容体)、G_iシグナル伝達受容体、G_sシグナル伝達受容体：7本の α ヘリックスで構成される膜タンパク質で、膜受容体タンパク質のなかで最大のファミリーを形成しています。N末端が細胞外、C末端が細胞内に存在し、細胞外領域で特定のリガンドが結合することで活性化し、細胞内の G タンパク質三量体を活性化することでシグナルを伝達します。体内で多様な生理作用の調節に重要な役割を果たすことから、既承認薬の 30%以上が GPCR を標的にした薬剤になっています。これらのなかで、G_iタンパク質三量体と共役するものを G_iシグナル伝達受容体、G_sタンパク質三量体と共役するものを G_sシグナル伝達受容体と呼びます。

(注5) メラトニン：

メラトニンは、トリプトファンを出発物質にセロトニンを経て、脳の松果体で合成されるホルモンです。メラトニンは 1958 年に Lerner らが発見し、これまでの研究から、夜間に多く合成されて睡眠の誘導や概日リズムの調節に関与することが明らかになっています。こうした重要な生理現象に関与することから、メラトニンおよびメラトニン受容体(注2)は睡眠障害などの治療標的として注目されており、これまでメラトニンに類似した化合物が睡眠障害の治療薬として開発されてきました。

(注6) クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法：

クライオ(超低温)電子顕微鏡を用いてタンパク質などの生体高分子試料を撮影し、多数の撮影画像を画像処理することで立体構造を再構成して、タンパク質などの生体高分子の立体構造を決定する手法です。液体窒素(-196°C)による冷却下でタンパク質などの生体高分子試料に対して電子線を照射し、試料の観察および撮影を行います。検出器などにおける目覚ましい技術革新によってタンパク質などの生体高分子の立体構造を高分解能で決定する手法として普及し、2017年には開発に貢献した海外の研究者三名にノーベル化学賞が贈られました。

(注7) 概日リズム：

約 25 時間の周期で変動する生理現象であり、動物、植物、菌類、藻類などほとんどの生物で保存されています。概日リズムは、光などの環境の周期変動が無い状態でも起こる現象で、睡眠・覚醒を含む多くの生命現象に関与しており、生体内で重要な役割を担っています。

(注8) 作動薬：

作動薬は、受容体タンパク質のリガンドとして作用し、結合によって受容体の活性を向上させる薬剤です。特にメラトニン受容体では、生理的なホルモンであるメラトニンも作動薬として作用し、メラトニン受容体を標的とする睡眠障害の治療薬の多くが作動薬となっています。

7. 添付資料：

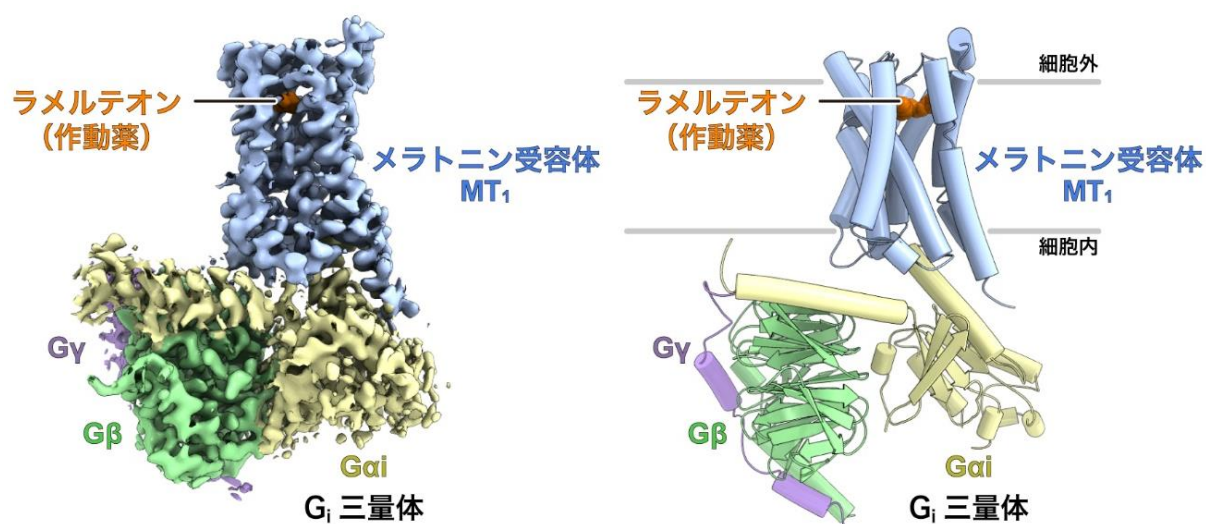


図1：メラトニン受容体 MT_1 - G_i シグナル伝達複合体の全体構造

左：メラトニン受容体 MT_1 - G_i シグナル伝達複合体の密度マップ。

右：密度マップに基づいて構築したメラトニン受容体 MT_1 - G_i シグナル伝達複合体の立体構造モデル。

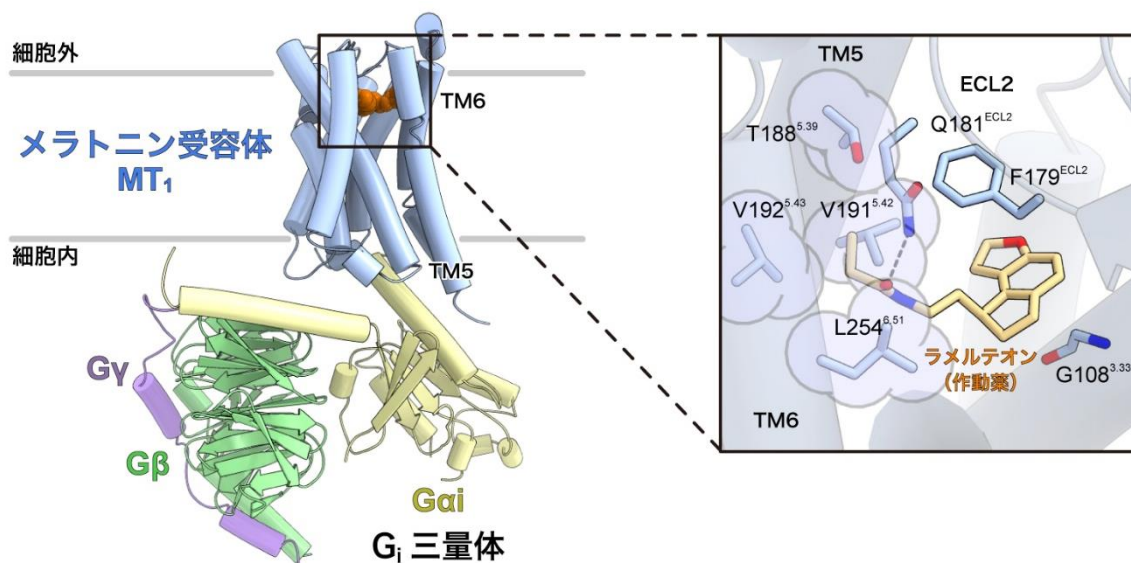


図2：活性化状態のメラトニン受容体 MT_1 による作動薬ラメルテオンと認識機構

左：メラトニン受容体 MT_1 - G_i シグナル伝達複合体の全体構造。

右：リガンド結合部位の拡大図。薄紫色で囲ったアミノ酸残基（T188、V191、V192、L254）がメラトニン受容体の活性化に重要であることを今回初めて発見した。これらのアミノ酸残基は第5、第6膜貫通ヘリックス（TM5・TM6）に存在し、多くのGPCRの間で保存されている「活性化モチーフ」と呼ばれるアミノ酸残基群の近くに位置していた。

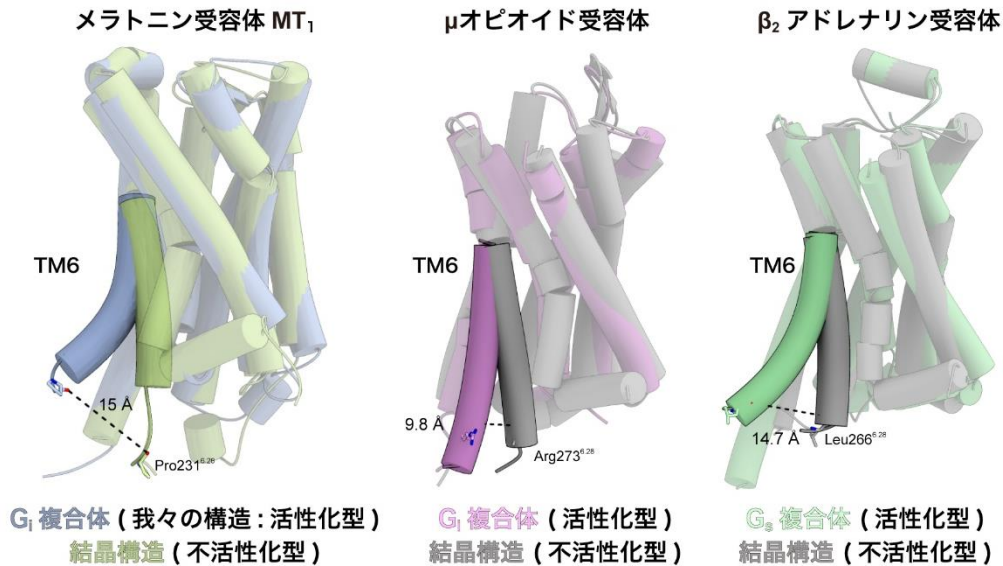


図3：不活性化型の結晶構造とシグナル伝達複合体の構造を比較

メラトニン受容体 MT₁ (左)、μオピオイド受容体 (中央)、β₂アドレナリン受容体 (右) のそれぞれの TM6 について、不活性化型の構造を取っている結晶構造と、活性化状態の構造を示すシグナル伝達複合体の構造を比較した。メラトニン受容体 MT₁ の第6膜貫通ヘリックス (TM6) は、他の G_i シグナル伝達受容体に比べて大きく構造変化し、G_s シグナル伝達受容体と同程度まで跳ね上がりを示していた。

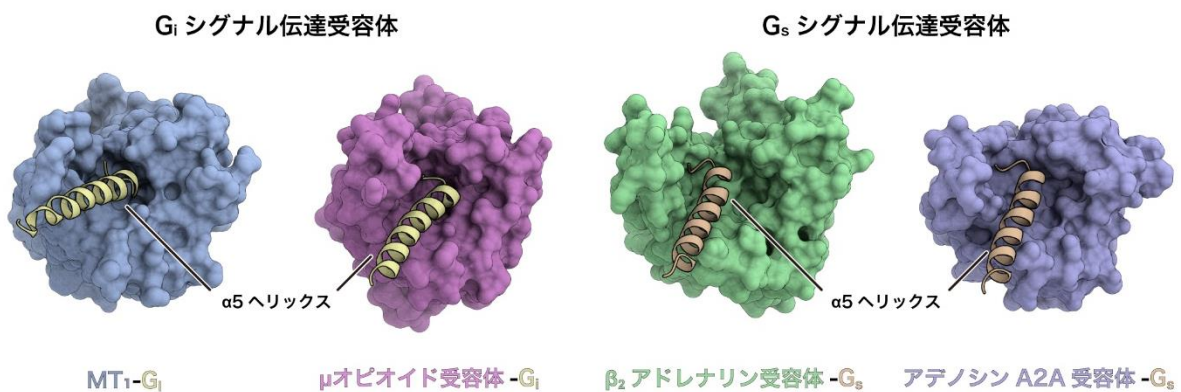


図4：G_iシグナル伝達受容体とG_sシグナル伝達受容体の構造を比較

G_iシグナル伝達受容体 (左：メラトニン受容体 MT₁、右：μオピオイド受容体) と G_sシグナル伝達受容体 (左：β₂アドレナリン受容体、右：アデノシン A2A 受容体) のそれぞれについて、細胞内側から見た構造を比較した。G_iシグナル伝達受容体は細胞内側の空間が狭い一方で、G_sシグナル伝達受容体では細胞内側の空間が比較的広いことが分かる。