

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05142

研究課題名（和文）死と生の認識におけるオキシトシン神経修飾を可視化する新規センサー開発

研究課題名（英文）The engineering of the novel imaging tools for neuromodulators

研究代表者

加藤 英明 (Kato, Hideaki)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：80805961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳の複雑な機能を理解するためには神経調節因子による神経機能の制御を詳細に理解することが不可欠だが、こうした制御機構の理解を困難にしている要因の一つに神経調節因子と受容体の対応関係の問題がある。この問題を紐解くために必要な分子ツールの開発を、本研究の目的として掲げた。研究期間中にcryo-EMを用いた神経調節因子受容体の構造解析に成功し、同受容体による神経調節因子認識の構造基盤を解明することができた。さらに、神経調節因子クロストークの謎を紐解くための分子ツール、神経調節因子の分泌可視化ツール、本学術領域に属する他研究班の研究を強力に推進するための、新規光遺伝学ツール開発に成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した分子ツールは、今後自閉症などの神経疾患の病態メカニズムを解明するための助けとなり得る。他、受容体の構造情報は低分子薬の開発に繋がる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：To understand the complex functions of the brain, it is essential to have a detailed understanding of how neuromodulators control neural functions. One factor that makes understanding these control mechanisms difficult is the correspondence problem between neuromodulators and their receptors. This study aimed to develop molecular tools needed to address this issue. During the research period, we successfully determined the cryo-EM structure of neuromodulator receptors, thereby uncovering the structural basis for their recognition. Additionally, we developed molecular tools to unravel the mysteries of neuromodulator crosstalk, visualization tools for neuromodulator secretion, and new optogenetics tools to strongly advance the research of other labs within this research groups.

研究分野：構造生命科学

キーワード：GPCR 神経調節因子 クライオ電子顕微鏡 構造生物学 タンパク質工学 神経科学

1. 研究開始当初の背景

脳内では無数の神経の接続に加え、多数の神経修飾因子が協調的に働くことで複雑な行動が表出する。そうした神経修飾因子の1つにオキシトシン(Oxt)がある。Oxtは9アミノ酸からなる神経ホルモンであり、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)であるOxt受容体(OXTR)に作用することで多様な社会性行動を制御する。本領域の課題である死と生の脳内表象に関しても、「生」の認識(アニマシー知覚)にオキシトシン(Oxt)が神経接続・神経修飾のレベルで関与する事が報告されている。しかしながらその作用機序については不明な点が多く、また相反する「死」の認識についてもOxtの関与を示唆する予備的な結果が得られているが(未発表)そのメカニズムは未知である。死と生の認識におけるOxt研究を困難にしている理由として大きく2つの要因が考えられる。1つはOxtがシナプスからのみならず細胞体や樹状突起から分泌拡散されるという複雑なダイナミクスを有している点、そしてOxtには類似の神経ホルモンであるバソプレシン(AVP)系とシグナル伝達経路上のクロストークが存在する点である。後者について、これまでAVPはAVP受容体(V1R)と呼ばれる別のGPCRに作用することで、Oxtとは異なる社会性行動を惹起すると考えられてきた。しかし近年、高濃度のOxtはOXTRのみならずV1Rを、高濃度のAVPはV1RのみならずOXTRを活性化することが報告され、このリガンド-GPCR間のクロストークを可能とする分子機構やその生理的意義が注目を集めている。しかし、こうしたクロストークのメカニズムや生理的意義を詳細に調べるための可視化・介入技術は十分に揃っておらず、このことが研究の進展を妨げる一つの要因となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、死と生の認識過程におけるOxt神経修飾の動態を高い時空間解像度で解析するために、新規ツールの開発を試みた。Oxt, AVPは共にGPCRの活性化リガンドとして機能するが、OxtはOXTR, AVPはV1Rを選択的に活性化すると考えられてきた。しかし近年、高濃度のAVPはOXTRを、高濃度のOxtはV1Rを活性化することが報告され、当初の理解よりもリガンドと受容体の関係が著しく複雑であることが判明しつつある(Song et al., *Front. Neuroendocrinol.*, 2018)。このリガンド-受容体間のクロストークを可能にする分子機構は、構造生物学者にとって大きな謎であり、その構造基盤の解明が待ち望まれている。また、一般に神経修飾因子はシナプスからだけでなく細胞体や樹状突起から分泌され受動拡散されることが知られており、このことが、死の認識におけるOxtやAVPの働きの理解に向けて、大きな妨げとなっている。単一神経細胞から分泌されたOxtやAVPはどこまで拡散するのか? 分泌されたOxtやAVPは、どの程度近傍の受容体であればnon-canonicalな受容体(Oxtに対するV1R, AVPに対するOXTR)を活性化可能なのか? どの程度拡散されると、OxtやAVPはcanonicalな受容体(Oxtに対するOXTR, AVPに対するV1R)しか活性化できなくなるのか? Oxt系, AVP系のクロストークは、死の認識においてどれだけ重要な意味を持つのか? こうした一連の問いに答えるには、まず、OxtやAVPの分泌動態を高い時空間分解能で可視化する技術が不可欠である。しかしながら、既存の技術はいずれも時間分解能あるいは空間分解能が低いという問題を抱えているのが現状であり、これらの状況を打破する革新的センサーの出現が待ち望まれていた。代表者はそうした状況を踏まえ、Oxt結合状態のOXTR, AVP結合状態のV1Rの立体構造を決定し、構造情報に基づくGPCR機能の合理的改変を行うことが、死の表象の科学やGPCR研究を次のステージへと進める端緒となると着想するに至った。具体的には、得られた構造情報を元にリガンド結合部位や細胞内ループ部分のアミノ酸を改変することで、OxtやAVPの分泌動態を可視化するための各種センサーを開発する。また、クロストークを許さない受容体の変異体を開発し、これを導入したロックインマウスを作成する。これは、実現すれば死の認識におけるOxtの作用機序やAVP系とのクロストークの寄与を紐解くための強力なツールとなると期待された。

3. 研究の方法

【1】OXTR, V1R-Gタンパク質複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析

OXTR, V1Rによるリガンド認識機構の詳細を解明するため、クライオ電子顕微鏡(cryo-EM)を用いて「Oxt結合状態のOXTR」、「AVP結合状態のV1R」の立体構造を解明することを目指した。Cryo-EMを用いた構造解析においては、標的の分子サイズが重要となるため、それぞれGタンパク質との複合体状態で解析することとした。GPCRの発現精製や複合体調製、データ収集、解析については、代表者自身が以前構造を解明した他のGPCR-Gタンパク質複合体と同様の手法を用いることにした(Kato et al., *Nature*, 2019)。

【2】Oxt, AVPの非クロストーク変異体の作成

高濃度のOxtやAVPはnon-canonicalな受容体を活性化する。そのため、【1】で得られた構造情報に基づき変異を導入することで、こうしたクロストークを排除し、canonicalなリガンドによるのみ活性化される受容体の変異体を作成する。作成した変異体は作成した変異体のリガンド選択性は、フォスファターゼを用いたTGF α 切断アッセイによって評価する(Inoue et al., *Nat. Methods*, 2012)。

【3】Oxt, AVP 分泌の時空間ダイナミクス可視化センサーの開発

【1】で得られた構造情報を利用し、Oxt, AVP の分泌動態可視化センサーを作成する。これまで、GPCR であるドーパミン受容体などにおいて、細胞内第 3 ループを蛍光タンパク質 GFP の円順列変異体 cpGFP に置換し、GPCR の活性化を cpGFP の蛍光強度変化として可視化できるツールが報告されている (Patriarchi et al., Science, 2018)。この概念は Ca²⁺イメージングで広く利用されている GCaMP 等ではよく知られているが、GPCR への応用は歴史も浅く、これまで作られたセンサーは最適化状態とは程遠い。このコンセプトを応用し、OXTR, V1R の細胞内第 3 ループを cpGFP に置換し、構造情報に基づき周辺のアミノ酸配列を効率よく最適化することで、両受容体のセンサーを開発する。センサーの評価は TGF 切断アッセイの他、顕微鏡付きプレートリーダーを用いて行う。さらに、得られたセンサーに関して、【2】で発見した変異を導入することで、クロストークを排除した Oxt, AVP に対して高い特異性を持つ分泌動態可視化センサーを開発する。

4. 研究成果

研究期間中に OXTR の立体構造、OXT の可視化センサーについては競合グループから論文がそれぞれ報告されてしまったが (Waltenspühl et al., Nat. Commun., 2022; Meyerowitz et al., NSMB, 2022; Ino et al., Nat Methods, 2022; Qian et al., Nat Biotechnol., 2023) V1R-Gq 複合体についてはその立体構造を高分解能で決定することに成功し、V1R による AVP 認識の構造基盤を解明することができた。この情報と、OXT-OXTR 複合体構造情報に基づき、多数の変異体を作成し、そのリガンド選択性を評価したところ、クロストークを示さない OXTR 変異体、V1R 変異体を開発することに成功した。さらに、同変異体を用いたノックインマウスの作成にも成功している。加えて、代表者が見出した変異体を、競合グループが報告した Oxt の可視化センサーに導入することで、Oxt に対して高い選択性を示す可視化センサーを開発することに成功した。上記の結果は、代表者を最終著者及び責任著者として論文準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tajima S, Kim YS, Fukuda M, Byrne EFX, Wang PY, Paggi JM, Kishi KE, Ramakrishnan C, Takaramoto S, Nagata T, Konno M, Sugiura M, Katayama K, Matsui TE, Yamashita K, Ikeda H, Inoue M, Kandori H, Dror RO, Inoue K, Deisseroth K, Kato HE	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural basis for ion selectivity in potassium-selective channelrhodopsins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.10.30.514430	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishi Koichiro E., Kato Hideaki E.	4. 巻 79
2. 論文標題 Pump-like channelrhodopsins: Not just bridging the gap between ion pumps and ion channels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Opinion in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 102562 ~ 102562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2023.102562	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsutsumi Naotaka, Maeda Shoji, Qu Qianhui, V?gele Martin, Jude Kevin M., Suomivuori Carl-Mikael, Panova Ouliana, Waghra Deepa, Kato Hideaki E., Velasco Andrew, Dror Ron O., Skiniotis Georgios, Kobilka Brian K., Garcia K. Christopher	4. 巻 8
2. 論文標題 Atypical structural snapshots of human cytomegalovirus GPCR interactions with host G proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eab15442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.ab15442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishi K.E., Kim Y.S., Fukuda M., Inoue M., Kusakizako T., Wang P.Y., Ramakrishnan C., Byrne E.F.X., Thadhani E., Paggi J.M., Matsui T.E., Yamashita K., Nagata T., Konno M., Quirin S., Lo M., Benster T., Uemura T., Liu K., Shibata M., Nomura N., Iwata S., Nureki O., Dror R.O., Inoue K., Deisseroth K., Kato H.E.	4. 巻 185
2. 論文標題 Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 672 ~ 689.e23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.01.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Kazuhiro, Kawakami Kouki, Kusakizako Tsukasa, Miyauchi Hirotake, Tomita Atsuhiko, Kobayashi Kan, Shihoya Wataru, Yamashita Keitaro, Nishizawa Tomohiro, Kato Hideaki E., Inoue Asuka, Nureki Osamu	4. 巻 82
2. 論文標題 Endogenous ligand recognition and structural transition of a human PTH receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 3468 ~ 3483.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.07.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 25件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 膜タンパク質の構造生物学 -これまでの40年、これからの20年-
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 新規イオンチャネル型ロドプシンChRmineの構造機能解析と光遺伝学ツール開発
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structure-function relationship of pump-like cation channelrhodopsins
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Biological pores found in membrane proteins
3. 学会等名 RIKEN CEMS Topical Meeting Online -Emergent Pores- (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 ポンプ様イオンチャネル型ロドプシンの研究から見えてくるもの
3. 学会等名 第2回ATIバイオ単分子研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hideaki Kato
2. 発表標題 Structural analysis of neurotensin receptor-signaling complexes
3. 学会等名 ISDD & KSSB joint symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideaki Kato
2. 発表標題 Structural and functional diversity in pump-like cation channelrhodopsins
3. 学会等名 19th International Conference on Retinal Proteins (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 タンパク質を視る・識る・創る -ロドプシンと光遺伝学-
3. 学会等名 第61回 生物物理若手の会 夏の学校 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 AlphaFold2後の構造インフォマティクス
3. 学会等名 IIBMP2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 ニューロテンシン受容体構造解析から見るclass A GPCRによるシグナル因子認識機構の多様性
3. 学会等名 第16回GPCR研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine
3. 学会等名 SFB 1078 Colloquium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 タンパク質を視る、識る、創る -光遺伝学ツールの構造生物学-
3. 学会等名 順天堂大学 DBSB seminars（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 ポンプ様イオンチャネル型ロドプシンの研究から見えてくるもの
3. 学会等名 第2回ATIバイオ単分子研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 膜タンパク質構造解析とその応用
3. 学会等名 日本学術振興会・産学協力委員会 R022量子構造生物学委員会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 創薬プロセスを加速するGPCR迅速構造解析法の開発
3. 学会等名 GPCR創薬に向けたクライオ電子顕微鏡研究の最前線（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 オキシトシン-バソプレシン受容体システムにおけるシグナルクロストークの構造基盤
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hideaki Kato
2. 発表標題 Structural basis for color tuning and K ⁺ selectivity in K ⁺ -selective channelrhodopsins
3. 学会等名 Structure, Function and Dynamics (SFD) International Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hideaki Kato
2. 発表標題 Dynamic recognition and activation of G proteins by the Neurotensin receptor 1
3. 学会等名 CUHKSZ-KIIDD Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 光駆動性K ⁺ チャネルが有するユニークなK ⁺ 選択性の分子基盤
3. 学会等名 日本再生医療学会第3回科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Dynamic recognition and activation of G proteins by the Neurotensin receptor 1
3. 学会等名 第61回 日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 イオン輸送型ロドプシンを用いた光遺伝学ツール開発における動向
3. 学会等名 第15回RRM(レチナ・リサーチ・ミーティング) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 Structural and functional diversity in pump-like cation channelrhodopsins
3. 学会等名 生理研研究会2023「クライオ電子顕微鏡とその周辺」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤英明
2. 発表標題 イオンチャネル型ロドプシンが有するK ⁺ イオン選択の仕組み
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第49回討論会(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計7件

1. 著者名 岸孝一郎、加藤英明	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学2022年7月号	

1. 著者名 加藤英明	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 CLINICAL NEUROSCIENCE 2022. Vol.40 No.8	

1. 著者名 加藤英明	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 CLINICAL NEUROSCIENCE 2022. Vol.40 No.9	

1. 著者名 加藤英明	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 CLINICAL NEUROSCIENCE 2022. Vol.40 No.11	

1. 著者名 加藤英明	4. 発行年 2022年
2. 出版社 公益社団法人日本生化学会	5. 総ページ数 7
3. 書名 生化学 Vol.94 No.6	

1. 著者名 渡部誠也, 加藤英明	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学2022年2月号	

1. 著者名 岸孝一郎、加藤英明	4. 発行年 2023年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 糖尿病・内分泌代謝科 56 (5)	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 Enhanced Light Gated Potassium Selective Channelrhodopsin	発明者 加藤英明他4名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、U.S. A. Serial No. 63/420,371	出願年 2022年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 配列抽出システム、配列抽出方法、及び配列抽出プログラム	発明者 加藤英明、松井俊貴、小島朝翔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022- 212061	出願年 2022年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 Variant Chrmine Proteins Having Accelerated Kinetics and/or Red-Shifted Spectra	発明者 加藤英明 他6名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、U.S. Serial No. 63/302,419	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>新規光駆動型イオンチャネルの構造解明と高性能分子ツールの創出 ~神経科学に光を当てる~ https://www.jst.go.jp/pr/announce/20220203/index.html 新規光駆動型イオンチャネルの構造解明と高性能分子ツールの創出 ~神経科学に光を当てる~ https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0109_00034.html 新規光駆動型イオンチャネルの構造解明と高性能分子ツールの創出 - 神経科学に光を当てる - https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-02-03 Cell 光敏感通道蛋白ChRmine&#32467;&#26500;解析 https://mp.weixin.qq.com/s/6EUseKBkJcrrLqvF2Izi6g タンパク質を「見る」「識る」「創る」で、新たな技術を創出し、生命現象を解明する https://top-researchers.com/?p=2096</p>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------