

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06318

研究課題名(和文)細胞表層配位化学による膜タンパク質の機能プログラミング

研究課題名(英文)Functional programming of membrane-bound receptors by On-cell Coordination Chemistry

研究代表者

窪田 亮 (Kubota, Ryou)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：00753146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞は膜表面に存在する膜タンパク質受容体により外部刺激を感知し、その性質・機能を適応させる。しかしながら、膜タンパク質受容体の三次元構造は非常に類似しているため、生細胞においてそれらの生理機能の詳細を明らかとすることは未だ困難である。本研究では、標的膜タンパク質受容体の活性を人工的に制御するための手法として、錯体化学と遺伝子工学を組み合わせたケモジェネティック的方法論(OcCC: On-cell Coordination Chemistry)を開発した。OcCCを用いることで生細胞上において神経細胞に存在するグルタミン酸受容体や薬物標的として重要なclass A GPCRの活性制御に成功した。

研究成果の概要(英文)：Membrane-bound receptors in living cells mediate signal transductions by receiving extracellular signals. Despite their biological importance, it is still quite difficult to unveil their functions due to their similar and complicated three-dimensional structures and activation mechanisms. Here we have developed novel chemogenetic approaches, called On-cell Coordination Chemistry (OcCC) in order to artificially control the functions of membrane-bound receptors. We successfully demonstrated that OcCC enabled to control the activities of two types of neurotransmitter receptors, ionchannel type and GPCR type glutamate receptors, in live neurons. Also, we achieved the artificial activation of class A GPCRs by coordination anchor method.

研究分野：錯体化学、超分子化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：金属錯体 化学遺伝学 GPCR リガンド作動性イオンチャネル 遺伝子工学

### 1. 研究開始当初の背景

生命の最小単位である細胞は、外部からの刺激(神経伝達物質・ホルモン・サイトカイン)を、細胞膜表面に存在する膜タンパク質受容体により感知し、その性質・機能を適応させる。細胞膜表面には、リガンド作動性イオンチャネルや G タンパク質共役受容体が存在し、細胞内外の多様なシグナル伝達を高度に制御している。生細胞・組織レベルにおいて、膜タンパク質の活性・機能を人工的に制御することができれば、細胞機能の解明や自在制御に役立つと期待される。しかしながら、膜タンパク質受容体には、三次元構造が類似した多様なサブファミリー・サブタイプが存在する。膜タンパク質受容体を制御できるリガンド(アゴニスト・アンタゴニスト)では、それらサブファミリー・サブタイプを区別することは困難である。

そうした背景のもと、狙った膜タンパク質受容体のみを選択的に活性化する方法として、化学遺伝学(Chemogenetics)が開発されてきた。Chemogeneticsでは、標的膜タンパク質に人工分子に対するスイッチを遺伝子工学を用いて導入する方法論である。この方法論は、可溶性の酵素に対しては多様な方法が開発されたが、三次元構造・メカニズムがより複雑な膜タンパク質受容体に適用した例は少なく、どの手法も欠点を有している。そこで本研究では、生細胞環境下で膜タンパク質受容体を合理的・簡便に制御可能な chemogenetics 手法を開発することを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、生細胞の膜表面に存在する膜タンパク質受容体の活性を、人工的な化学物質により制御することを目指した。そのための基本化学技術として、金属錯体化学を採用した。金属錯体が示す配位結合は、可逆的な非共有結合の中でも最も強く、かつ剛直な幾何構造を示すことから、デザイン性にすぐれている。またタンパク質を構成するアミノ酸には、His・Glu・Asp・Cys・Met といった金属配位性官能基を有する残基が多い。また近年の構造解析技術(結晶構造解析・単粒子解析)の発展により、金属配位性アミノ酸の導入箇所を一残基レベルでデザインすることも可能である。具体的には、(1)金属イオン・錯体との配位結合形成により膜タンパク質受容体の活性化構造の安定化・誘起する手法(On-cell Coordination Chemistry) (図 1)、(2)配位結合により膜受容体-リガンドの相互作用を強める手法(Coordination anchor)、の二つの方法論を開発した。

### 3. 研究の方法

金属錯体化学を用いて、膜タンパク質受容体の活性制御を実現するため、金属錯体・遺伝子工学が持つ高い構造多様性(金属中心・リガンド・金属配位性アミノ酸残基の種類)

を利用し、膜受容体の活性を制御できる Hit pair をスクリーニングから発見する方法論を採用した。具体的には、遺伝子工学により金属配位性アミノ酸を位置選択的に導入した変異型膜受容体をコードする発現プラスミドを多種類構築し、それをモデル哺乳類細胞に強制発現させたのち、金属イオン・錯体に添加した際の細胞応答を蛍光変化として読み取る実験系を採用した。蛍光変化を読み出す際には、蛍光顕微鏡により高感度・ハイスループットに実験できるようにした。得られた Hit pair は、NMR 測定や蛍光スペクトル測定により、配位結合形成や構造変化が進行していることを確認した。さらに、活性制御を行う場として、モデル細胞から実際に膜受容体が機能する初代神経細胞に変更し、開発した手法がより実践的な場で機能するかを蛍光イメージングにより評価した。さらに細胞内部にシグナル伝達が起こっていることを確認するため、蛍光免疫染色により確認した。

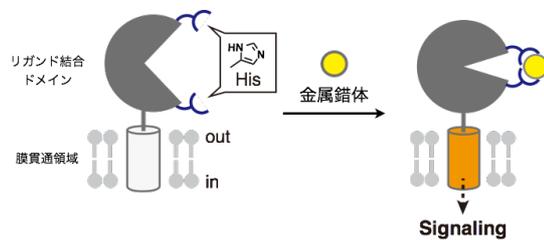


図 1. OcCC の模式図

### 4. 研究成果

膜タンパク質受容体の活性制御を達成する手法として、以下に示すように大きく二種類の方法論の開発に成功した。

#### (1) On-cell Coordination Chemistry によるグルタミン酸受容体の活性制御

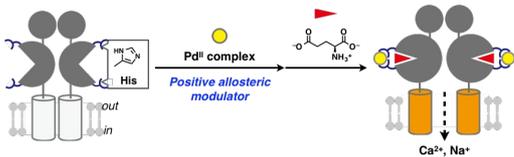
金属錯体化学を用いて、膜タンパク質受容体の活性制御を実現するため、我々はまずじめに神経細胞に存在するグルタミン酸受容体に着目した。グルタミン酸受容体は、神経細胞において興奮性シグナル伝達を司り、記憶・学習に關与する重要な受容体である。前述の通り、グルタミン酸受容体は、イオンチャネル型と GPCR 型に大別され、サブファミリーやサブタイプが合計 26 種類存在するが、その詳細機能は未だ不明である。そのため、グルタミン酸受容体を最初の標的とした。グルタミン酸受容体の立体構造は、グルタミン酸(リガンド)が結合するリガンド結合ドメインと膜貫通領域に分類される。グルタミン酸受容体の活性化時には、リガンド結合ドメインが閉じる運動を示すことが示唆されており、その閉じる運動を金属錯体で誘起することで、その活性を制御できると期待した(図 2)。

実際、イオンチャネル型グルタミン酸受容体(iGluR)を標的として、リガンド結合ドメインに対して His を二ヶ所変異導入した変異

型 iGluR を結晶構造を基にデザイン・構築した。さらに構築した変異型 iGluR をモデル細胞である HEK293T 細胞に強制発現させたのち、様々な金属イオン・錯体存在下での活性を細胞内 Ca 濃度変化としてモニタリングした。その結果、ある種の変異型 iGluR が Pd(bpy) (bpy: ピピリジン) 存在下において、活性化を示すことが明らかとなった。そのメカニズムの詳細を調べてみると、Pd(bpy) 存在下においてグルタミン酸の親和性が上昇していることが判明し、導入した His がアロステリックサイト、Pd(bpy) がポジティブアロステリックモジュレータとして機能することが判明した。

同様の手法を、異なるファミリーである GPCR 型グルタミン酸受容体(mGluR)にも適用できることも判明した。mGluR の活性メカニズムは、iGluR とほぼ同様であり、リガンド結合ドメインが閉じる運動が起こることで進行する。そこで iGluR と同様にリガンド結合ドメインに His 変異を二つ導入した変異型 mGluR を構築し、モデル細胞における活性を蛍光 Ca イメージングにより評価した。その結果、mGluR では iGluR とは異なり、Pd(bpy) のみで活性化することが明らかとなった。すなわち、mGluR では Pd(bpy) がアロステリックアゴニストとして機能することが判明した。

Ion-channel-type glutamate receptor



GPCR-type glutamate receptor

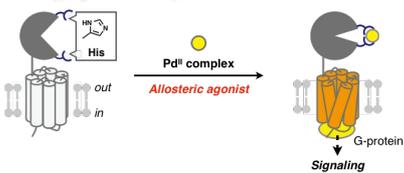


図 2. OcCC によるイオンチャネル型・GPCR 型グルタミン酸受容体の活性化

さらに、本手法が内在性グルタミン酸受容体が存在する培養神経細胞に適用できることを明らかとした(図 3)。上記のスクリーニングにより発見した変異型 iGluR を神経細胞に発現させたのち、そのグルタミン酸応答を Pd(bpy) 存在下において蛍光 Ca イメージングにより評価した。その結果、変異型 iGluR のみを発現させた神経細胞から応答が観測され、変異型 iGluR のみを選択的に活性化できていることが判明した(図 4)。

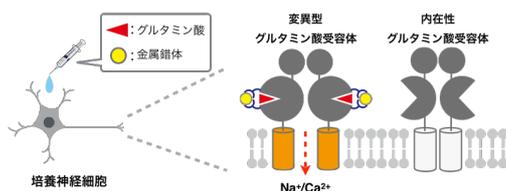


図 3. OcCC による変異型グルタミン酸受容体の選択的活性化

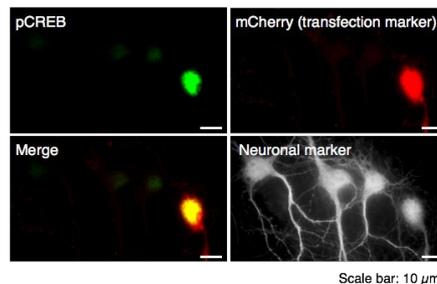
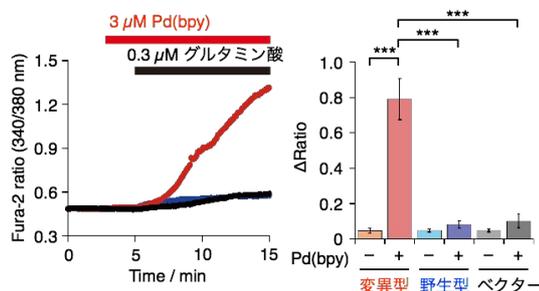


図 4. 培養神経細胞における変異型グルタミン酸受容体の選択的活性化。上：蛍光 Ca イメージング、下：蛍光免疫染色

## (2) Class A GPCR 制御に向けた新しい配位化学的アプローチの開発

Class A GPCR は、GPCR の中でも最大のファミリーを形成し、市販薬の約半数が標的とする生物学・薬学の観点から極めて重要な膜受容体である。しかしながら、class A GPCR を本来の機能を保持したまま、活性を制御する chemogenetic な手法は極めて少ない。また class A GPCR は、その構造のほとんどが細胞膜内に存在するため、構造設計性を考慮すると非常にチャレンジングな標的と言える。そこで本研究では、金属錯体化学により class A GPCR を制御する「Coordination anchor」法を開発した。Coordination anchor 法では、class A GPCR に変異導入した His tag と金属錯体を付与したアゴニスト間の相互作用を配位結合により強化することで、His tag 導入した変異型 GPCR のみを選択的に活性化する戦略である。実際、三次元構造が最も調べられているアドレナリン受容体に本 coordination anchor 法を適用したところ、配位結合により約 100 倍親和性が上昇したことが明らかとなった。また本手法は、他の class A GPCR であるムスカリン性アセチルコリン受容体にも適用可能であり、その適用範囲が広いことも確認できた。現在、coordination anchor 法が内在性受容体が存在する細胞・組織において使用可能かを熱意研究中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

Shigeki Kiyonaka, Ryou Kubota, Yukiko Michibata, Masayoshi Sakakura, Hideo Takahashi, Tomohiro Numata, Ryuji Inoue, Michisuke Yuzaki, Itaru Hamachi  
Allosteric activation of membrane-bound glutamate receptors using coordination chemistry within living cells  
Nature Chem. 査読有, 8, 958-967 (2016)

Shoji Onogi, Hajime Shigemitsu, Tatsuyuki Yoshii, Tatsuya Tanida, Masato Ikeda, Ryou Kubota, Itaru Hamachi  
In situ real-time imaging of self-sorted supramolecular nanofibres  
Nature Chem. 査読有, 8, 743-752 (2016)

Shohei Tashiro, Hirotaka Yonezawa, Ryou Kubota, Tsutomu Umeki, Mitsuhiko Shionoya  
Non-covalent immobilisation of p-toluenesulfonic acid in a porous molecular crystal for size-specific acid-catalysed reactions  
Chem. Commun. 査読有, 52, 7657-7660 (2016)

Ryou Kubota, Shohei Tashiro, Mitsuhiko Shionoya  
Chiral Metal-Macrocyclic Frameworks: supramolecular chirality induction and helicity inversion of the helical metal-macrocyclic structures  
Chem. Sci. 査読有, 7, 2217-2221 (2016)

Ryou Kubota, Itaru Hamachi  
Protein recognition using synthetic small-molecular binders toward optical sensing in vitro and in live cells  
Chem. Soc. Rev. 査読有, 44, 4454-4471 (2015)

〔学会発表〕(計27件)

Ryou Kubota, Wataru Nomura, Itaru Hamachi  
Metallo-chemical genetics (2) : Selective activation of adrenoceptors by metal complex-agonist conjugates  
日本化学会第97春季年会、2017年3月19-19日、慶應義塾大学(神奈川)

Ryou Kubota  
Designer Coordination Chemistry Enables Precise Control of Multi-component Self-assembly and Protein Functions  
AsCA2016、2016年12月4-7日、Hanoi (Viet Nam)

Ryou Kubota, Itaru Hamachi  
A Coordination Chemogenetic Approach for Selective Activation of Neurotransmitter

Receptors in Living Cells  
ACBC2016、2016年11月28日-12月1日、Kaohsiung (Taiwan)

Ryou Kubota  
金属錯体化学による神経伝達物質受容体の人工制御  
「細胞を創る」研究会9.0、2016年11月21-22日、早稲田大学(東京)

窪田 亮、道籙 友紀子、清中 茂樹、浜地 格  
グルタミン酸受容体の選択的活性化を可能とする錯体化学的アプローチ  
第10回バイオ関連化学シンポジウム、2016年9月7-9日、石川県立音楽堂(石川)

窪田 亮、清中 茂樹、浜地 格  
細胞表層配位化学による膜受容体の人工活性化  
生体機能関連化学部会若手の会第28回サマースクール、2016年7月15-16日、西浦温泉ホテル たつき(愛知)

Ryou Kubota, Shigeki Kiyonaka, Itaru Hamachi  
Membrane Receptor Engineering by On-Cell Coordination Chemistry(1):Mechanistic Study on Allosteric Activation of Ionotropic Glutamate Receptors  
日本化学会第96春季年会、2016年3月24-27日、同志社大学(京都)

Ryou Kubota  
Allosteric Activation of Glutamate Receptors by On-cell Coordination Chemistry (Occc)  
The 5th International Kyoto Symposium on Organic Nanostructures and Molecular Technology、2015年11月5日、京都大学(京都)

窪田 亮、清中 茂樹、浜地 格  
On-cell Coordination Chemistry (Occc)によるグルタミン酸受容体の選択的活性化  
第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015年9月10-12日、熊本大学(熊本)

Ryou Kubota  
Allosteric Activation of Ionotropic Glutamate Receptors by On-cell Coordination Chemistry  
“Metals in Biology” in Wako - 生体内金属元素の機能解明 -、2015年6月16-17日、理化学研究所(埼玉)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/index.php?members%2Fkubota>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

窪田 亮 (KUBOTA, Ryou)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号： 00753146