

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03290

研究課題名(和文)細胞膜受容体サブタイプ特異的な新規アロステリック活性化方法の開発

研究課題名(英文) Development of novel methods for allosteric activation of receptor subtypes on cell surface

研究代表者

清中 茂樹 (Kiyonaka, Shigeki)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90422980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞機能の自在な制御は、生命化学研究において極めて重要な研究技術の1つとして位置づけられる。著者らは、これまでに、中枢神経の神経伝達で重要な役割を担うイオンチャネル型受容体の一種であるAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA受容体)に関して、人為的に活性制御する方法を開発した。この方法は、リガンド結合部位を有する他のタンパク質への適用拡大が期待された。本研究では、著者らの方法をGタンパク質共役型受容体(GPCR)を活性化できる方法論へと発展させる事に成功し、また神経細胞における標的受容体の人為的な活性化にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、我々の開発した受容体の人為的な活性化法が、イオンチャネル型受容体だけでなくGタンパク質共役型受容体も含めた幅広いタンパク質に対して拡張できる可能性を示した。また、この手法が神経細胞においても適用できることも確認した。この結果は、我々の方法論が、脳などの複雑な生体組織において狙った細胞の標的受容体を人為的に活性制御してその機能解明を行えるという、新たな方法論になり得ることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Development of new techniques for artificial regulation of specific cells in our body is one of essential technologies in life science researches. We have recently reported a new method for artificial activation of ion-channel-type glutamate receptors using coordination chemistry in live cells. In this method, two histidine mutations were introduced near the ligand-binding domain. Addition of Pd(bpy) complex, which coordinates to the histidine residues in a bidentate fashion, lead to stabilize the active conformation of the receptors for allosteric activation. Here, we successfully expanded our method for artificial regulation of G-protein coupled receptors (GPCRs). This means that our method is useful for artificial regulation of many kinds of receptors in live cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：グルタミン酸受容体 ケミカルバイオロジー アロステリック活性化 サブタイプ 細胞膜受容体

1. 研究開始当初の背景

細胞機能の自在な制御は、生命化学研究において極めて重要な研究技術の1つとして位置づけられる。神経科学分野においては、Deisseroth らにより提唱されたオプトジェネティクス (ref.1)が、神経回路・機能解明において不可欠な技術になりつつある。オプトジェネティクスでは、チャンネルロドプシンと呼ばれる光刺激で活性化される古細菌由来のイオンチャネルタンパク質を神経細胞に発現させることで、光を当てる任意のタイミングで神経活動の人工的な制御が可能となる。一方、Hahn らは、光吸収によって構造が変化する”LOV ドメイン”を用いることで、低分子量 GTPase ファミリー(Rac1)の光活性制御に成功している(ref.2)。これらの方法論は、細胞機能を時間・空間分解能で活性制御できるという点で、非常に強力なアプローチである。しかしながら、オプトジェネティクスは細胞膜電位の制御に限定される。また、LOV ドメインを用いた方法も、活性制御に成功している事例は少なく、拡張性という面で問題を抱えている。

このような背景のもと、著者らは、化学的なアプローチにより時間・空間的な細胞内機能制御を目指した研究を開始した。その際には、中枢神経の神経伝達で重要な役割を担うイオンチャネル型受容体的一种である AMPA 型グルタミン酸受容体 (以下、AMPA 受容体と省略) に着目した。AMPA 受容体では、アゴニストの結合に伴いリガンド結合部位の構造変化が起こることが知られる(ref.3)。著者らは、このような構造変化を人工的に惹起することを発案した。具体的には、リガンド結合に伴い構造変化が大きく起こる部位 (2ヶ所) にヒスチジンの変異導入を行い、平面四配位構造をとる Pd 錯体を用いて、変異導入したヒスチジンに対して cis 型に配位させて活性化型の構造へと誘起する戦略である。実際に、AMPA 受容体に導入した配位サイトは新たなアロステリックサイトとして機能して、Pd 錯体添加による AMPA 受容体の人工的な活性化に成功した。この方法は、構造変化が既知な他の受容体の活性制御に対しても、同様に適用できることが期待される。

2. 研究の目的

著者らが新たに開発した受容体活性化方法は、リガンド結合部位を有する他のタンパク質への適用拡大が期待され、幅広い受容体タンパク質に対する選択的な活性制御方法になり得る。そこで、本研究では、G タンパク質共役型受容体(GPCR)を活性化できる方法論へと発展させる。GPCR の中でも、class C に属する GPCR は AMPA 受容体と同様に細胞外にリガンド結合部位を有し、リガンド結合部位の構造変化により活性化される。そこで、class C GPCR の金属錯体による活性制御について検討する。

また、複数の細胞が存在する脳組織での適用を目指して、受容体の直行的な活性化、あるいは神経細胞での適用を検討する。

3. 研究の方法

(1) AMPA 受容体以外の受容体活性化に関しては、主に GPCR に着目して適用拡大を行い、本方法論の一般性を示すことを目的とした。本研究では、GPCR の中でも AMPA 受容体と同様に細胞外にリガンド結合部位を有する class C GPCR の活性化を検討した。class C GPCR の代表例として、代謝型グルタミン酸受容体(mGlu)や GABA_B 受容体などが知られ、リガンド結合に伴うリガンド結合部位の大きな構造変化が結晶構造解析で明らかにされている(図 1A)。著者らの戦略では、その結晶構造情報を基に、リガンド結合部位の構造変化を金属錯体で惹起させて受容体を活性化させる(図 1B)。mGluR に関しては、7種類のサブタイプが知られるが、mGlu1 に関しては、グルタミン酸有無の X 線結晶構造解析が報告されている。そこで、本研究では mGlu1 サブタイプに着目し、その構造を元に金属錯体で活性化させるために、リガンド結合部位表面付近で、かつ大きく構造変化するアミノ酸残基を選んでヒスチジン変異導入を行い、金属錯体による活性化について検討した。

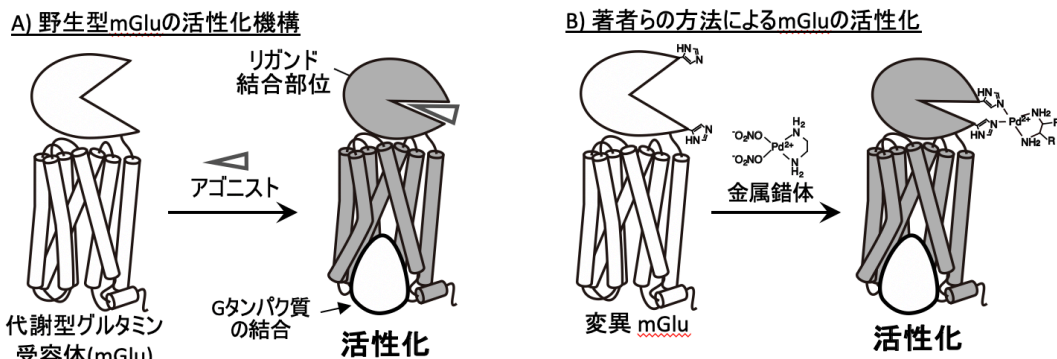


図1 金属錯体によるclass C GPCR(代謝型グルタミン酸受容体(mGlu))の人工的な活性化

(2) 脳組織には、神経細胞（ニューロン）だけでなく、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどの非ニューロン（グリア細胞）が存在する。また、mGlu はニューロンだけでなく複数種類のグリア細胞にも発現しており、細胞種選択的な活性制御方法が求められている。これまでの AMPA 受容体の人為的なアロステリック活性化に関しては、Pd(bpy)錯体を用いた際に活性化を実現していた。一方、ヒスチジンの変異位置の違いによっては、他の金属錯体あるいは金属イオンで活性化できる可能性が考えられる。そこで、他の金属錯体による活性制御についても検討した。その際には、デザインしたヒスチジン変異体ライブラリーに対して、複数の金属イオンおよび金属錯体に対する活性化するクリーニングを行い、新たな変異体および金属錯体の組み合わせの開発を行なった。

(3) mGlu には、同じアゴニストで活性化される受容体サブタイプが7種類同定されているが、神経細胞には複数種類のサブタイプが発現している。また、細胞内下流シグナルはサブタイプにより異なるが、その生理機能解明は不十分な状態である。そこで、mGluR に対して本手法を適用して、神経細胞内で特定の受容体サブタイプを活性化する方法へと発展させた。

(4) これまではモデル細胞（HEK293 細胞）を用いた受容体機能制御の検討を行ってきたが、グルタミン酸受容体が機能している神経細胞において、この人為的な活性化方法が適用できるかについて評価した。その際には、すでに HEK293 細胞における人為的な活性化制御に成功していた AMPA 受容体変異体および Pd(bpy)錯体を用いて、培養神経細胞における活性制御および下流の転写因子の活性化制御に関して評価した。

4. 研究成果

(1) 前述した通り、X 線結晶構造解析結果により、mGlu1 はグルタミン酸結合に伴いリガンド結合部位の構造が大きく変化することが知られる。そこでその構造解析結果を基に、図 2A に

示すリガンド結合に伴って大きく構造変化するアミノ酸部位にフォーカスして、リガンド結合部位の上下のアミノ酸にヒスチジン変異を加えた8種類のダブル変異体を作成した。その8種類に関して、蛍光性 Ca^{2+} 指示薬である Fura2 を用いてライブイメージングで受容体の活性化を評価したところ、3つの変異体において Pd(bpy) の添加で活性化することを見出した (図 2B)。以前の AMPA 受容体の人為的な活性化時においては、Pd(bpy) はポジティブアロステリックモジュレーターとして振る舞ったが、Pd(bpy) 単独では mGlu1 変異体を活性化できなかった。興味深いことに、Pd(bpy) のみで人為的な活性化に成功した (図 2C)。

このことは Pd(bpy) が mGlu1 変異体に対してポジティブアロステリックアゴニストとして機能することを意味する。

(2) 他の金属イオンおよび金属錯体で活性化される変異体を探索するために、上記で作成した8種類の変異体に対して、異なる7種類の金属イオンおよび金属錯体に対する活性化スクリーニングを行った。その結果、Pd(bpy) で選択的に活性化される変異体、および Pd^{2+}

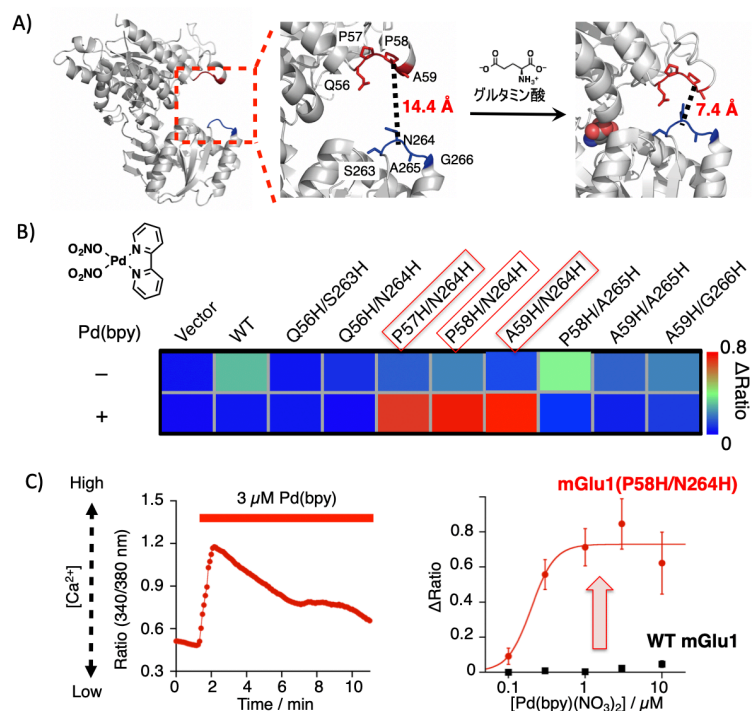


図2 mGlu1のPd(bpy)による活性化スクリーニングおよび活性化の評価

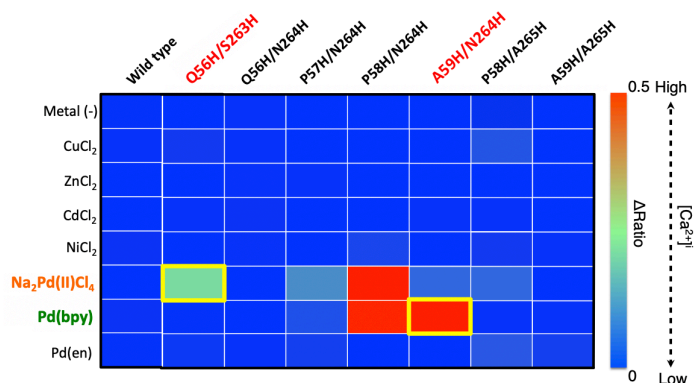


図3 異なる金属イオンおよび金属錯体を用いた直接的な活性化を目指した活性化スクリーニングおよび活性化の評価

で選択的に活性化される変異体を見いだすことに成功した (図 3)。この結果は、それぞれの変異体を発現させる場所を変えることで、同じ受容体を異なる場所 (細胞) で直交的に活性化できることを意味する。

(3) mGlu には mGlu1 - mGlu7 の 7 種類の受容体サブタイプが知られるが、mGlu1 と mGlu5 の相同性は特に高く、選択的なアゴニストが知られていない。一方、著者らの研究アプローチに関しては、相同性が高さ故に mGlu1 で設計した変異導入をそのまま mGlu5 に適用できることが期待される (図 4 A)。実際に、変異体を作成して活性化を評価したところ、Pd(bpy)による mGlu5 の活性化にも成功した。興味深いことに、mGlu1 が一過的 Ca²⁺レスポンスを示したのに対し、mGlu5 はオシラトリーなレスポンスを示し (図 4 B)、受容体機能解明にも適用できると期待される。

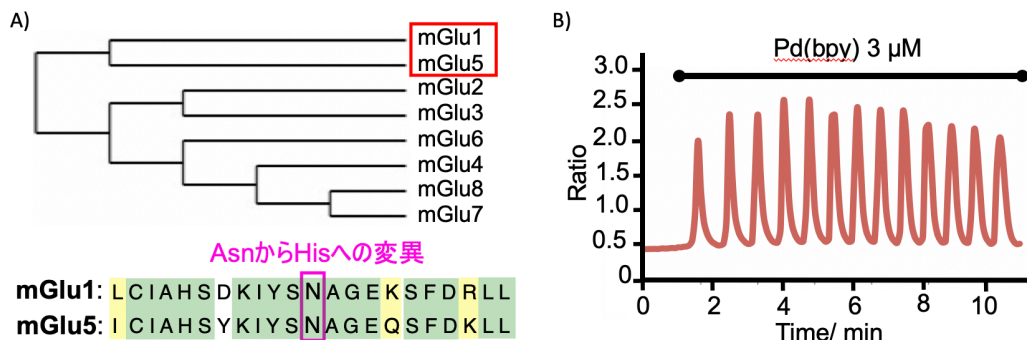


図4 (A) mGluの進化系統樹および遺伝子の相同性に基づく変異体デザイン、(B) mGlu5のPd(bpy)による活性化

(4) 著者らの方法論の脳神経系への適用性を示すために、Pd(bpy)による活性化に関する知見があった AMPA 受容体変異体 (GluA2 KR) を培養神経細胞に発現させて Pd(bpy)による細胞選択的な AMPA 受容体の活性制御を検討した。Fura2 を用いた Ca²⁺イメージングで活性化を確認したところ、AMPA 受容体変異体(GluA2 KR)が導入された細胞においてのみ、Pd(bpy)添加によりアロステリックに活性化されることを確認した。次に、AMPA 受容体の下流シグナルである転写制御因子の 1 つである CREB のリン酸化について評価したところ、GluA2 KR を導入した細胞においてのみ、CREB の強いリン酸化が確認できた (図 5)。この結果は、我々の方法を用いることで、狙った神経細胞のグルタミン酸受容体の活性を人為的に制御できることを示す結果と言える。

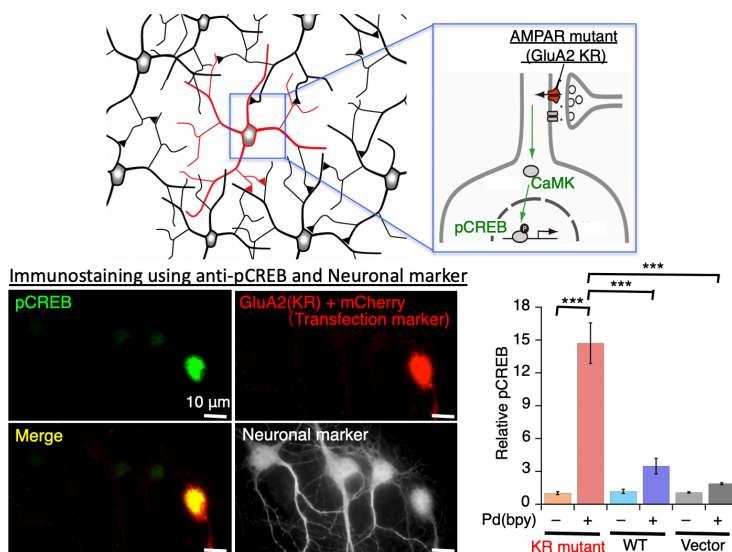


図5 海馬培養神経細胞におけるAMPA受容体(AMPA)の人為的な活性化および遺伝子導入した細胞選択的なCREBリン酸化

<引用文献>

- ① Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263-1268 (2005).
- ② Wu YI, Frey D, Lungu OI, Jaehrig A, Schlichting I, Kuhlman B, Hahn KM. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature*, **461**, 104-108 (2009).
- ③ Armstrong N, Gouaux E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*, **28**, 165-181 (2000).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Sakamoto S., Kiyonaka S., Hamachi I. Construction of ligand assay systems by protein-based semisynthetic biosensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **50**, 10-18 (2019). doi:

10.1016/j.cbpa.2019.02.011.

- ② Kubota R., Nomura W., Iwasaka T., Ojima K., Kiyonaka S., Hamachi I. Chemogenetic Approach Using Ni(II) Complex-Agonist Conjugates Allows Selective Activation of Class A G-Protein-Coupled Receptors. *ACS Cent. Sci.*, **4**, 1211-1221 (2018). doi: 10.1021/acscentsci.8b00390.
- ③ Wakayama S., Kiyonaka S., Arai I., Kakegawa W., Matsuda S., Ibata K., Nemoto L.Y., Kusumi A., Yuzaki M., Hamachi I. Chemical labeling for visualizing native AMPA receptors in live neurons. *Nature Commun.*, **8**, 14850 (2017). doi: 10.1038/ncomms14850.
- ④ Kiyonaka S., Kubota R., Michibata Y., Sakakura M., Takahashi H., Numata T., Inoue R., Yuzaki M., Hamachi I. Allosteric activation of membrane-bound glutamate receptors using coordination chemistry within living cells. *Nature Chem.*, **8**, 958-967 (2016). doi: 10.1038/nchem.2554.

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① Kento Ojima, Wataru Kakegawa, Yukiko Michibata, Ryou Kubota, Michisuke Yuzaki, Shigeki Kiyonaka, Itaru Hamachi, Coordination chemogenetics for allosteric activation of endogenous GPCR-type glutamate receptors, 日本化学会第 99 春季年会, 2019
- ② 清中 茂樹, 新たな GPCR 活性制御法:配位ケモジェネティクス, 第 48 回日本心臓血管動物質学会, 2019
- ③ 清中 茂樹, 配位ケモジェネティクスによるグルタミン酸受容体サブタイプ特異的な活性制御, 第 16 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム, 2018
- ④ Shigeki Kiyonaka, Chemogenetic Approach for Allosteric Activation of Neurotransmitter Receptors on Living Cells, High Throughput Chemistry & Chemical Biology, Gordon Research Conference, 2017
- ⑤ Shigeki Kiyonaka, Novel chemical-biological technologies for elucidating physiological roles of neurotransmitter receptors, 第 60 回日本神経化学大会, 2017
- ⑥ Shigeki Kiyonaka, Coordination chemical genetics of receptors for artificially regulating minority events, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017
- ⑦ Shigeki Kiyonaka, Novel Chemical Approach for Allosteric Activation of Glutamate Receptors on Live Cells, 第 21 回 iCeMS 国際シンポジウム「Emerging Science for Unlocking Cell's Secrets」, 2016
- ⑧ Shigeki Kiyonaka, Sho Wakayama, Itaru Arai, Wataru Kakegawa, Michisuke Yuzaki, Itaru Hamachi, Visualization of native AMPA receptors in live neurons by a novel chemical approach, The 47th NIPS International Symposium "Decoding Synapses", 2016
- ⑨ 窪田 亮、道簾 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

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

浜地研究室ホームページ (<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/>)

清中研究室ホームページ (<https://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/life1/index.html>)

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。