

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14333

研究課題名(和文)細胞内シグナルネットワークを解読するMetallo-chemogenetics

研究課題名(英文)Metallo-chemogenetics to decode intracellular signaling networks

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本若手研究では、細胞膜表面に存在するGタンパク質共役受容体(GPCR)の人工的活性化手法の開発を行った。細胞外領域にHis tagを導入した標的GPCRとHis tagと相互作用するNi錯体を共有結合的に連結したアゴニストの二点相互作用を利用することで、標的GPCRの選択的な活性化に成功した。また超分子ダブルネットワーク(SDN)ヒドロゲルの新たな機能化手法であるpost-assembly fabricationの開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCRは細胞内シグナル伝達を担い、様々な生物学的役割および疾病に関与する。そのため狙ったGPCRを受容体さらには細胞選択的に活性化することができれば、基礎科学のみならず創薬にも直結する。本若手研究で開発した手法は、His tagを持つ標的受容体のみを活性化できることから、これまで区別困難であったGPCRの生物学的機能の解明に貢献できると期待される。また開発した刺激応答性SDNヒドロゲルは体内における薬物放出担体としての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I developed an artificial activation method for G protein-coupled receptors (GPCRs) on the cell surface. The selective activation of targeted GPCRs was achieved by use of a bivalent interaction between a His-tagged target GPCR and a Ni complex-agonist conjugate. We also succeeded in developing a new functionalization method for supramolecular double-network hydrogels, called post-assembly fabrication.

研究分野：超分子化学

キーワード：超分子化学 リアル 金属錯体 Gタンパク質共役受容体 ケモジェネティクス 細胞 ヒドロゲル ソフトマテ

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内シグナル伝達は、受容体・酵素・タンパク質間相互作用を基本要素とする複雑なネットワークである。その機能解析には各要素の人工制御が必須であるが、有機化合物を利用する薬理学では生細胞内における選択性が充分ではない。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手法として、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い。特に市販薬の半分程度が標的としている class A G タンパク質共役受容体(GPCR)については、その三次元構造が非常にコンパクトであり、複雑な活性化メカニズム(構造変換)を示すことから、Chemogenetic な活性制御方法は開発されていなかった。そこで本研究では、生細胞環境下で class A GPCR 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、申請者が以前開発した On-cell Coordination Chemistry (OcCC)を参考に新たな class A GPCR の活性制御法の開発を目指した。OcCC では、膜受容体の活性化時に起こる構造変換を配位結合により安定化することでアロステリックに活性制御することが可能である。具体的には膜タンパク質表面に金属配位性を持つ His 残基を遺伝子工学により導入し、His への親和性が高い Pd 錯体を細胞へ作用させることで、活性化構造を惹起する。実際、OcCC によりイオンチャネル型及び class C GPCR 型グルタミン酸受容体の活性制御に成功した。OcCC は非常に有用な方法ではあるが、活性構造変換が複雑で未解明な部分が多い class A GPCR への適用は困難と予想された。そこで本研究では、OcCC で明らかとなった金属錯体を持つ構造設計性とハンドリングの容易さを活用することで、class A GPCR の新たな活性化手法を構築することを目指した。

### 3. 研究の方法

Class A GPCR の Chemogenetics を開発するにあたり、His tag-NiNTA 相互作用に着目した。His tag-NiNTA ペアはタンパク質精製や化学修飾に使用される相互作用ペアである。そこで、遺伝子工学により His tag を導入した標的 class A GPCR と NiNTA を共有結合的に連結したアゴニスト(metal-agonist conjugate: MAC)間の二点相互作用により標的 class A GPCR を選択的に活性化する Coordination tethering 法を考案した。初めの標的として  $\beta_2$ -アドレナリン受容体を選択し、N 末端部位の異なる位置に His4 tag を挿入した変異体を 4 種類作成した。一方で MAC については、アゴニスト-NiNTA 間のリンカー長を変えた 3 種類の化合物を合成した。作成した変異体・MAC を用いて、蛍光  $Ca^{2+}$  インジケータを用いた focused screening を行うことで、EC50 値が減少する変異体-MAC ペアを探索した。また Coordination tethering の一般性を確認するため、class A GPCR の中でも  $\beta_2$ -アドレナリン受容体とは構造類似性が低いムスカリン性アセチルコリン受容体(M1R)についても活性制御を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) Coordination tethering による $\beta_2$ -アドレナリン受容体の活性制御

$\beta_2$ -アドレナリン受容体の設計は、アゴニスト結合部位からの距離を検討するために、N 末端部位を四分分割した位置に His tag を挿入した。一方で MAC は、アゴニスト部位としてフェニルエフリンを選択した。結晶構造解析からフェニルエフリンのアミン部位が細胞外領域に向いていることが判明したため、アミン部位からリンカー及び NiNTA 部位を連結する分子デザインとした。またリンカー長の異なる 3 種類の MAC を合成した。HEK293T 細胞を用いた蛍光 Ca イメージングの結果、1.19H4 変異体と MAC( $\beta_2$ AR, O4)が顕著な活性上昇を示すことが判明した。より詳細な濃度依存性評価の結果、NiNTA-His tag の相互作用により EC50 値が約 100 倍減少することが明らかとなった。同様の活性化手法は、 $\beta_1$ -もしくは  $\beta_3$ -アドレナリン受容体でも適用可能であることを明らかとした。

#### (2) Coordination tethering によるムスカリン性アセチルコリン受容体の活性制御

続いて Coordination tethering の一般性を確認するため、ムスカリン性アセチルコリン受容体での活性制御を試みた。His tag の挿入位置は、 $\beta_2$ -アドレナリン受容体と同じ位置に挿入した。また MAC は、ムスカリン性アセチルコリン受容体のアゴニストであるイペルオキソに対して、MAC( $\beta_2$ AR, O4)と同じリンカー長を持つ MAC(M1R)を設計・合成した。 $\beta_2$ -アドレナリン受容体と同じように、CHO 細胞を用いた蛍光 Ca イメージングにより、野生型受容体に比べて変異型受容体の EC50 値が 16 倍低濃度シフトすることが判明した。以上の結果から、Coordination tethering が class A GPCR に適用できる汎用性の高い chemogenetics であることが明らかとなった。

ムスカリン性アセチルコリン受容体はグリア細胞においてグリオトランスミッターを放出することで神経機能を制御している。そこで coordination tethering が初代グリア細胞でも機能するかを評価した。その結果、変異型 M1R を強制発現させたグリア細胞に対して MAC(M1R)を作用させたところ Ca 応答が観測された。一方で、野生型を発現させたグリア細胞では応答が観察されなかった。このことから、Coordination tethering が初代グリア細胞においても適用できることを明らかとした。

以上から、本研究で開発した Coordination tethering は幅広い class A GPCR に適用できる汎用性の高い手法であることを明らかとした。今後は coordination tethering が動物個体に適用できるかどうかを検討する予定である。

### (3) Self-sorting 超分子ダブルネットワークゲルの刺激応答特性の付与

Coordination tethering 研究とは別に、2種類の独立した超分子ファイバーからなる超分子ダブルネットワークゲルの高次機能化を行った。これまでに self-sorting 現象を利用することで、刺激応答性超分子ファイバーを互いに混ぜることなく独立に自己集合させ、それぞれの刺激応答性を互いに干渉させることなく発揮させることに成功した。Self-sorting 現象は非常に有力ではあるが、超分子ファイバーを形成するゲル化剤の分子設計が限られており、導入可能な刺激応答性に限りがあるのが欠点であった。そこで本研究では刺激応答性を拡張するため、Self-sorting 超分子ダブルネットワーク(SDN)ゲル構築後に機能化を行う post-assembly fabrication 法を開発した。この手法により、SDN ゲルに酵素・ATP 応答性を付与することに成功した。またこの応答性を利用することで、タンパク質医薬品として有望である抗体の制御徐放に成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ryou Kubota, Keisuke Nakamura, Shogo Torigoe, Itaru Hamachi	4. 巻 9
2. 論文標題 The Power of Confocal Scanning Laser Microscopy in Supramolecular Chemistry: In Situ Real-time Imaging of Stimuli-responsive Multicomponent Supramolecular Hydrogels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemistryOpen	6. 最初と最後の頁 67-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/open.201900328	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 -
1. 著者名 Tanaka Wataru, Shigemitsu Hajime, Fujisaku Takahiro, Kubota Ryou, Minami Saori, Urayama Kenji, Hamachi Itaru	4. 巻 141
2. 論文標題 Post-assembly Fabrication of a Functional Multicomponent Supramolecular Hydrogel Based on a Self-Sorting Double Network	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 4997 ~ 5004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b00715	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 該当する
1. 著者名 Kubota Ryou, Kiyonaka Shigeki, Hamachi Itaru	4. 巻 622
2. 論文標題 On-cell coordination chemistry: Chemogenetic activation of membrane-bound glutamate receptors in living cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 411-430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2019.02.033	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 該当する
1. 著者名 Kubota Ryou, Nomura Wataru, Iwasaka Takuma, Ojima Kento, Kiyonaka Shigeki, Hamachi Itaru	4. 巻 4
2. 論文標題 Chemogenetic Approach Using Ni(II) Complex?Agonist Conjugates Allows Selective Activation of Class A G-Protein-Coupled Receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1211 ~ 1221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.8b00390	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 Kubota Ryou, Liu Shuang, Shigemitsu Hajime, Nakamura Keisuke, Tanaka Wataru, Ikeda Masato, Hamachi Itaru	4. 巻 29
2. 論文標題 Imaging-Based Study on Control Factors over Self-Sorting of Supramolecular Nanofibers Formed from Peptide- and Lipid-type Hydrogelators	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 2058 ~ 2067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.8b00260	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22件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ryou Kubota
2. 発表標題 Life-inspired multicomponent supramolecular hydrogels
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長尾 和俊、窪田 亮、田中 航、浜地 格
2. 発表標題 超分子ファイバーの核形成制御によって作り分けられるself-sorting構造
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐田 圭、中村 圭佑、窪田 亮、濱地 格
2. 発表標題 超分子・高分子複合ゲルの開発とその特性
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Protein responsive protein release of supramolecular / covalent polymer hydrogel composite
2. 発表標題 Keisuke NAKAMURA, Ryo KUBOTA, Hajime SHIGEMITSU, Tomonobu MATSUZAKI, Saori MINAMI, Kenji URAYAMA, ItaruHAMACHI
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高分子型リガンド指向性化学による腫瘍内でのin vivoケミカルラベル
2. 発表標題 鳥越 祥吾、窪田 亮、羽木 慎一郎、池田 燎亮、浜地 格
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryou Kubota
2. 発表標題 Adaptive supramolecular double network hydrogels formed by self-sorting self-assembly
3. 学会等名 SPIRITS international symposium Shaping self-assembled mesoscale (bio)materials with microengineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田 亮、中村 圭佑、重光 孟、南 沙央理、浦山 健治、浜地 格
2. 発表標題 超分子と高分子の複合化による新奇刺激応答性ヒドロゲルの創製
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 圭佑、重光 孟、窪田 亮、松崎 友伸、南 沙央理、浦山 健治、浜地 格
2. 発表標題 超分子・高分子ハイブリッドゲルのタンパク質応答機能
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長尾 和俊、窪田 亮、田中 航、浜地 格
2. 発表標題 動的共有結合を用いた超分子ナノファイバーの In Situ Self-sorting 制御
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田 亮、重光 孟、田中 航、藤咲 貴大、浜地 格
2. 発表標題 超分子ダブルネットワークヒドロゲル:self- sorting現象による機能統合化
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 超分子ダブルネットワークヒドロゲル (1) : Post-functionalizationによる機能拡張
2. 発表標題 田中 航、重光 孟、窪田 亮、南 沙央理、浦山 健治、浜地 格
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 超分子ダブルネットワークヒドロゲル (2): 動的共有結合を用いたSelf-Sorting
2. 発表標題 長尾 和俊、田中 航、松村 亮太郎、窪田 亮、浜地 格
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 超分子ダブルネットワークヒドロゲル (3): 高分子との複合化
2. 発表標題 中村 圭祐、重光 孟、松崎 友伸、窪田 亮、浜地 格
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高分子リガンド指向性化学 (1): ラベル化剤設計と反応性評価
2. 発表標題 金谷 拓、鳥越 祥吾、窪田 亮、浜地 格
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高分子リガンド指向性化学 (2): in vivoでの膜タンパク質化学修飾
2. 発表標題 鳥越 祥吾、金谷 拓、窪田 亮、浜地 格
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Life-inspired self-sorting supramolecular hydrogels
2. 発表標題 Ryou Kubota
3. 学会等名 Kyoto Winter School 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Coordination Chemogenetics: 金属錯体で細胞機能を制御する
2. 発表標題 窪田 亮
3. 学会等名 錯体化学会若手の会 夏の学校2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Self-sorting現象を鍵とする超分子ダブルネットワークヒドロゲルの創製と高機能化
2. 発表標題 窪田 亮、重光 孟、田中 航、藤咲 貴大、浜地 格
3. 学会等名 第67回高分子討論会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 リアルタイム観察による Self-sorting 型超分子ファイバーの動態評価
2. 発表標題 田中 航・重光 孟・窪田 亮・浜地 格
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 タンパク質に応答する多成分系超分子ヒドロゲルの構築
2. 発表標題 中村 圭佑、重光 孟、松崎 友伸、窪田 亮、浜地 格
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高分子型リガンド指向性化学による膜蛋白質のin vivoケミカルラベリング
2. 発表標題 鳥越 祥吾、窪田 亮、羽木 慎一郎、池田 燎亮、浜地 格
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学 浜地研究室における論文成果リスト  <a href="http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/index.php?members%2Fkubota">http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/index.php?members%2Fkubota</a>          研究者本人が研究成果をまとめているwebページ  <a href="https://rkubota-chem.jimdofree.com/">https://rkubota-chem.jimdofree.com/</a></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