

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282238

研究課題名(和文) 化学的および進化工学的手法を駆使したCa²⁺チャネル活性制御法の開発に関する研究研究課題名(英文) Artificial activation of Ca²⁺ channel subtypes by chemical biology approach

研究代表者

清中 茂樹 (KIYONAKA, Shigeki)

京都大学・地球環境学堂・准教授

研究者番号：90422980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経における神経活動依存的な遺伝子発現の制御は、神経の発達から記憶や学習に至る神経回路構築において必須である。その分子メカニズムは、記憶等のメカニズム解明だけでなく様々な神経疾患の治療方法につながる。本研究では、その分子メカニズム解明を目指して、Ca²⁺透過性のイオンチャネルであるAMPA型グルタミン酸受容体の選択的な活性化方法の開発を目的とした。AMPA受容体においては、リガンドの結合に伴いリガンド結合部位の構造変化が大きく変わることが知られる。その構造変化に着目し、変異導入と金属錯体の組み合わせという簡便なアプローチにより、GluA2を特異的に活性化できる方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：In central nervous systems, excitatory neurotransmission is essential for our memory and learning. Glutamate, a typical excitatory neurotransmitter in animals, is recognized by glutamate receptors in synapses. Glutamate receptors are categorized into ionotropic- or metabotropic-types. These are composed of 25 subtypes, each of which has essential roles in neurotransmission and synaptic plasticity, a putative molecular mechanism of our memory. For subtype-selective activation of glutamate receptors, we here developed a novel method for selective activation of the receptor subtypes using genetic manipulation and coordination chemistry. In this method, we introduced two His mutations in the vicinity of the ligand binding pockets in glutamate receptors. These His mutations acted as an allosteric site upon complexation with a Pd complex in a bidentate coordination fashion to stabilize the active conformation of the ligand binding pockets.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：Ca²⁺チャネル グルタミン酸受容体 AMPA受容体 サブタイプ

1. 研究開始当初の背景

中枢神経における神経活動依存的な遺伝子発現の制御は、神経の発達から記憶や学習に至る神経回路構築において必須である。その分子メカニズムの解明は、記憶等のメカニズム解明だけでなく様々な神経疾患の治療方法につながるため、世界中で精力的に研究が進められている。神経活動依存的な遺伝子発現においては、グルタミン酸受容体や電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入が必須である。

電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは10種類の遺伝子群から構成される。遺伝子配列およびチャンネル機能から、3種類のチャンネルタイプにさらに分類される。遺伝子発現に関わるのは、主に Cav1 ファミリー (別名: L 型 Ca^{2+} チャンネル) だと考えられている。Cav1 ファミリーの作用薬に関しては、ジヒドロピリジン代表とした化合物群 (活性化剤および阻害剤) が知られており、Cav1 ファミリー全体の機能解明は進められてきた。しかし、Cav1.1~1.4 の各サブタイプを介した Ca^{2+} 流入がどのような遺伝子発現を制御しているか、またどのチャンネルサブタイプが神経の発達過程や回路形成を制御するかは未解明な状態である。Cav1.1~1.4 サブタイプの機能解明は、神経の発達過程を明らかにするだけでなく、新たな創薬対象の同定を意味し、神経疾患薬の開発につながる。

グルタミン酸受容体は、主に興奮性の神経伝達を担い、記憶や学習において深く関わる。機能的な特徴から、イオンチャンネル型と G タンパク質共役 (代謝) 型に大別され、約30種類の遺伝子群から構成される。特にイオンチャンネル型グルタミン酸受容体が早い神経伝達に関わることが知られている。イオンチャンネル型グルタミン酸受容体は、約20種類のサブタイプが知られており、アゴニストの種類から、AMPA 型、NMDA 型、カイニン酸型に大別される (図1)。しかし、それぞれのサブタイプを選択的に活性化できる化合物は知られていない。特に、AMPA 型受容体においては、それぞれのサブタイプ (GluA1-4) が、記憶のメカニズムとして知

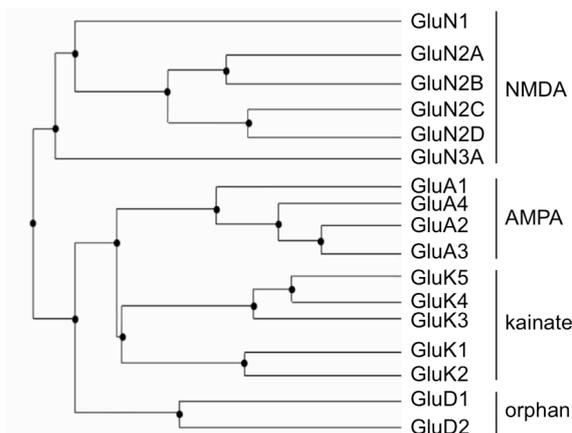


図1 イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の進化系統樹

られるシナプス可塑性に対して固有の機能を有していると考えられているが、それぞれの活性を選択的に区別できる方法は知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、神経活動依存的な遺伝子発現の制御の分子メカニズムを明らかにするために、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル各サブタイプおよび AMPA 型グルタミン酸サブタイプの選択的な人工的活性化方法の開発を目的とした。

(1) 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル各サブタイプ選択的な活性化方法の開発

化学的手法および進化工学的・遺伝子工学的な手法を組み合わせ、 Ca^{2+} チャンネルサブタイプを選択的に活性化する方法を開発する。

(2) AMPA 受容体サブタイプ選択的な活性化方法の開発

AMPA 受容体の結晶構造解析により、リガンド結合に伴い、リガンド結合部位の構造変化が大きく変わることが知られる。そこで、その構造変化を人工的に惹起することで AMPA 受容体を特異的に活性化することを目指した。

本報告書では、当初の予定以上の成果が得られた AMPA 受容体の特異的な活性化に関する研究成果に関して主に報告する。

3. 研究の方法

AMPA 受容体においては、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 (図2)。著者は、ケミカルバイオロジー的な観点に基づき、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、金属錯体を用いて、変異導入したヒスチジンに対してシス型に配位させて活性化型の構造へと惹起する戦略である

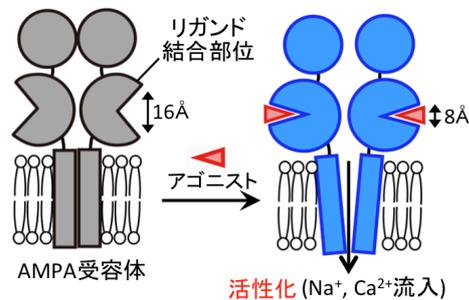
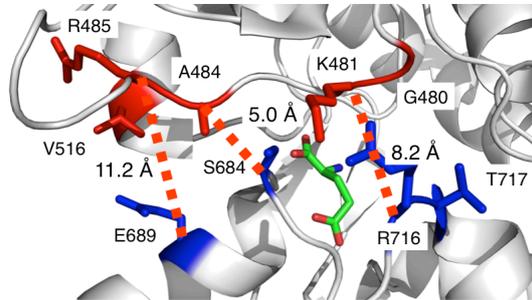


図2 AMPA受容体のアゴニストの結合に伴うリガンド結合部位の構造変化および活性化

本研究では、AMPA 受容体の中でも、シナプス可塑性と深く関与することが知られる GluA2 サブタイプを用いて、その人工的な活性化を評価した。過去に知られる結晶構造を基に、リガンド結合に伴い大きく構造変化を

起こす上領域と下領域にそれぞれヒスチジン変異を加えた変異体を計8種類作成した(図3)。その際には、Ca²⁺透過能を有するGluA2(Q)サブタイプ of cDNA に対して、Q5-site directed mutagenesis を用いて各種変異体を作成し、そのcDNA を発現ベクター(pCAGGS) に組み込んだ。



1. G480H-R716H
2. G480H-T717H
3. K481H-S684H
4. K481H-R716H
5. A484H-S684H
6. A484H-E689H
7. R485H-E689H
8. V516H-E689H

図3 作成したGluA2に対するヒスチジン変異体

GluA2 の活性化の評価に関しては、蛍光性Ca²⁺インジケータであるFura-2を用いた。各種 GluA2 受容体変異体をトランスフェクション法を用いてHEK293T細胞に過剰発現させた後に、各種金属錯体を用いて、人工的に活性化できる金属錯体と変異体のスクリーニングを行った。また、ヒット変異体および錯体の組み合わせに関しては、その活性化メカニズムについて検討した。

4. 研究成果

Ca²⁺イメージングにより添加に伴う GluA2 の活性を網羅的にスクリーニングした。本研究では、金属イオンとして、Zn²⁺、Ni²⁺、Pd²⁺ を評価した。また、金属錯体としては、Pd²⁺(en: ethylenediamine)、Pd²⁺(bpy: 2,2'-bipyridine)を用いた。活性化の評価においては、グルタミン酸に対する結合に対して金属錯化がアロステリックに働くことを期待して、わずかにGluA2を活性化できる30 μMのグルタミン酸存在下において、金属イオンおよび金属錯体の効果を検討した。各種

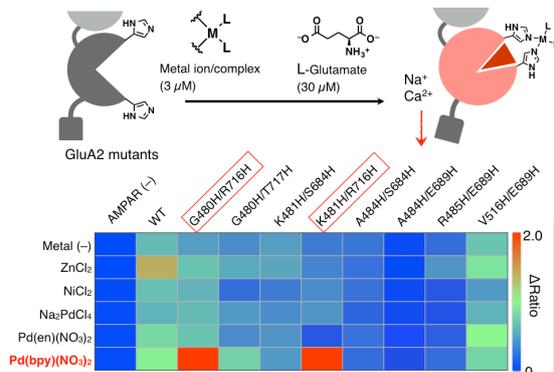


図4 金属錯体とGluA2変異体スクリーニングの結果

変異体と金属イオンによる活性化の相関に関するヒートマップを図4に示す。この結果から、2つの変異体(G480H/R716H変異体、K481H/R716H変異体)において、Pd²⁺(bpy)添加に伴う活性化を確認できた。一方で、今回の評価に使用した他の金属イオン(Zn²⁺、Ni²⁺、Pd²⁺)および金属錯体(Pd²⁺(en))においては、すべての変異体に対して活性化を全く確認できなかった。

次に、K481H/R716H変異体にフォーカスして、Pd²⁺(bpy)による活性化メカニズムを評価した。まず、30 μMグルタミン酸存在下におけるPd²⁺(bpy)錯体の濃度依存性を評価したところ、GluA2変異体におけるEC₅₀値は約2 μMであった(図5)。

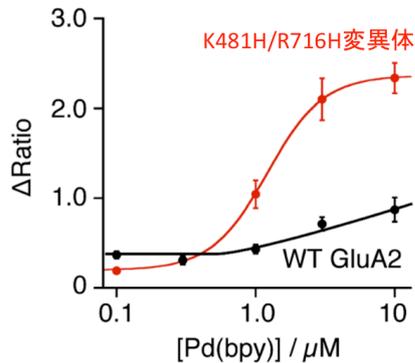


図5 GluA2変異体活性化におけるPd²⁺(bpy)濃度依存性

次に、3 μM Pd²⁺(bpy)錯体存在下におけるグルタミン酸の濃度依存性を評価した。図6に示すように、野生型(WT AMPAR)では、濃度

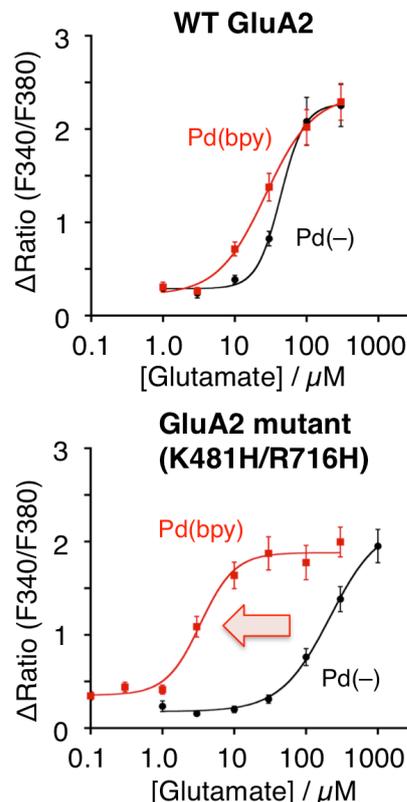


図6 GluA2変異体活性化におけるグルタミン酸濃度依存性

依存性がほとんど変わらなかったのに対して、(K481H/R716H)変異体においては、グルタミン酸濃度依存性が約60倍ほど低濃度側にシフトした。また、Pd²⁺(bpy)錯体単独の処置では、GluA2変異体を活性化することができなかった。これらの結果から、今回導入したヒスチジン変異とPd²⁺(bpy)錯体の錯化は、グルタミン酸の親和性に対する新たなアロステリック部位として機能していることが示された。

以上、本研究により、変異導入と金属錯体の組み合わせという簡便なアプローチにより、AMPA型グルタミン酸受容体のサブタイプであるGluA2を特異的に活性化できる方法が開発できた(図7)。この方法は、同様の構造変化を起こす他のイオンチャネル型受容体に対しても同様に適用できると期待されるため、今後は、他の受容体にも本手法を適用して特異的な活性化方法として確立し、神経活動依存的な遺伝子発現の制御の分子メカニズムを明らかにしていく。

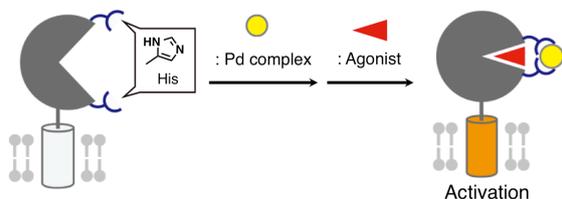


図7 金属錯体によるイオンチャネル型受容体活性化の模式図

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8件)

- ① Takada Y, Hirano M, Kiyonaka S, Ueda Y, Yamaguchi K, Nakahara K, Mori MX, Mori Y. Rab3 interacting molecule 3 mutations associated with autism alter regulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Cell Calcium*. 58, 296-306 (2015). doi: 10.1016/j.ceca.2015.06.007.
- ② Kiyonaka S, Sakaguchi R, Hamachi I, Morii T, Yoshizaki T, Mori Y. Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors. *Nature Methods* 12, 801-802 (2015). doi: 10.1038/nmeth.3548.
- ③ Sakaguchi R, Kiyonaka S, Mori Y. Fluorescent sensors reveal subcellular thermal changes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 31, 57-64 (2015). doi: 10.1016/j.copbio.2014.07.013.
- ④ Nakao A, Miki T, Shimono K, Oka H, Numata T, Kiyonaka S, Matsushita K, Ogura H, Niidome T, Noebels JL, Wakamori M, Imoto K, Mori Y. Compromised maturation of GABAergic

inhibition underlies abnormal network activity in the hippocampus of epileptic Ca²⁺ channel mutant mice, tottering. *Pflugers Arch.* 467, 737-752 (2015).

doi: 10.1007/s00424-014-1555-6.

⑤ Yamaura K, Kuwata K, Tamura T, Kioi Y, Takaoka Y, Kiyonaka S, Hamachi I. Live cell off-target identification of lapatinib using ligand-directed tosyl chemistry. *Chem. Commun.* 50, 14097-14100 (2014).

doi: 10.1039/c4cc05885b.

⑥ Miki T, Fujishima S, Komatsu K, Kuwata K, Kiyonaka S, Hamachi I. LDAI-based chemical labeling of intact membrane proteins and its pulse-chase analysis under live cell conditions. *Chem. Biol.* 21, 1013-1022 (2014).

doi: 10.1016/j.chembiol.2014.07.013.

⑦ Kozai D, Kabasawa Y, Ebert M, Kiyonaka S, Firman, Otani Y, Numata T, Takahashi N, Mori Y, Ohwada T. Transnitrosylation directs TRPA1 selectivity in N-nitrosamine activators. *Mol. Pharmacol.* 85, 175-185 (2014).

doi: 10.1124/mol.113.088864.

⑧ Kiyonaka S, Kajimoto T, Sakaguchi R, Shinmi D, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Imamura H, Yoshizaki T, Hamachi I, Morii T, Mori Y. Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. *Nature Methods* 10, 1232-1238 (2013).

doi: 10.1038/nmeth.2690.

[学会発表] (計14件)

① Neuro Chemical Biology: chemical approaches for visualization or activation of neurotransmitter receptors, Shigeki Kiyonaka, 日本化学会第96春季年会(同志社大学・京田辺キャンパス)3/24-27 (2016)

② Visualization of Native AMPA Receptors in Central Nervous Systems Using a Novel Chemical Labeling Technique, Shigeki Kiyonaka, Sho Wakayama, Michisuke Yuzaki, Itaru Hamachi, BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)(神戸ポートアイランド)12/1-4 (2015)

③ 中枢神経におけるAMPA型グルタミン酸受容体のケミカルラベルおよび動態解析、清中茂樹、若山翔、浜地格、第9回バイオ関連化学シンポジウム(熊本大学・黒髪南地区キャンパス)9/10-12 (2015)

④ On-cell Coordination Chemistry (OcCC)によるグルタミン酸受容体の選択的活性化、窪田亮、清中茂樹、浜地格、第9回バイオ関連化学シンポジウム(熊本大学・黒髪南地区キャンパス)9/10-12 (2015)

- ⑤ A novel chemical labeling technique for visualizing endogenous AMPA receptors in live neurons, Sho Wakayama, Shigeki Kiyonaka, Michisuke Yuzaki, Itaru Hamachi, 第 38 回日本神経科学大会 (神戸国際会議場・神戸国際展示場) 7/28-31 (2015)
- ⑥ 神経細胞における AMPA 型受容体のケミカルラベルおよび動態解析への展開、清中 茂樹、日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会 (東北大学・川内キャンパス) 6/10-12 (2015)
- ⑦ Chemical Biology of Neuronal Synapses(1): Dynamics of the ionotropic glutamate receptors endogenously expressed in neurons, Shigeki Kiyonaka, Sho Wakayama, Kazuhiro Komatsu, Itaru Hamachi, 日本化学会第 95 春季年会 (日本大学・船橋キャンパス) 3/26-29 (2015)
- ⑧ オルガネラ局在型サーモセンサーの開発と生体の熱産生機構の可視化、清中 茂樹、第 9 回 NIBB バイオイメージングフォーラム (岡崎コンファレンスセンター) 1/26-27 (2015)
- ⑨ 神経シナプスのケミカルバイオロジー研究、清中 茂樹、第 17 回生命化学研究会～生命化学の大海原を探る～ (三翠園) 1/8-9 (2015)
- ⑩ 神経細胞内在性 AMPA 受容体の特異的ケミカルラベルとライブイメージングへの展開、若山 翔、清中 茂樹、松田 信爾、柚崎 通介、浜地 格、第 87 回日本生化学会大会 (国立京都国際会館) 10/15-18 (2014)
- ⑪ 蛍光性温度センサーの開発と生体における熱産生機構の可視化、清中 茂樹、第 66 回日本細胞生物学会大会 (奈良県新公会堂) 6/11-13 (2014)
- ⑫ 神経伝達物質受容体のケミカルラベルを利用したリガンドセンシング、若山 翔、清中 茂樹、浜地 格、日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会 (大阪大学・豊中キャンパス) 6/11-13 (2014)
- ⑬ 神経化学生物学(1): LDAI 化学による AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) のケミカルラベル化戦略、若山 翔、清中 茂樹、松田 信爾、柚崎 道介、浜地 格、日本化学会第 94 春季年会 (名古屋大学・東山キャンパス) 3/27-30 (2014)
- ⑭ 神経細胞における内在性グルタミン酸受容体の蛍光ラベル化法の開発、若山 翔、清中 茂樹、浜地 格、第 86 回日本生化学会大会 (パシフィコ横浜) 9/11-13 (2013)

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 坂口 怜子、清中 茂樹、森泰生、細胞内熱産生機構の可視化、医学のあゆみ 252, 256-257 (2015)
- ② 清中 茂樹、坂口 怜子、森 泰生、蛍光性センサータンパク質による細胞内温度分布の可視化、生物物理 54, 253-256 (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 受容体のリガンドスクリーニングシステムの開発
 発明者: 浜地 格、清中 茂樹、若山 翔
 権利者: 京都大学
 種類: 国内特許
 番号: 特願 2014-029880
 出願年月日: 平成 26 年 2 月 19 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清中 茂樹 (KIYONAKA, Shigeki)
 京都大学・大学院地球環境学堂・准教授
 研究者番号: 90422980

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし