

マルチスケールな生理作用の因数分解基盤構築

領域番号：21B209

令和3年度～令和5年度

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）

学術変革領域研究（B）

研究成果報告書

令和6年6月

領域代表者 齊藤 毅

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

はじめに

従来法に基づく創薬研究は、経験則に基づいた手探りのアプローチに依存しており、多数の分子を用いて「入力」を試行するものの、その「出力」の評価は一次元的な数値情報に止まり、神経システムを含めた多次元的な情報を有効活用できていない。一方で、近年盛んに取り沙汰される「AI/デジタル創薬」において、その成否は往々にして教師データの「質」が握っており、上述のような低次元の情報だけでは複雑な生体作用をデジタル化し、創薬関連研究に結びつけることは極めて困難である。そのため、次世代の「理論的創薬」を実現する上では、細胞内の多次元の情報に加え、シグナルのトリガーとなる分子レベルの構造情報(上流)、また個体での薬効に直結する神経回路の活性/抑制作用(下流)まで含めた、スケール横断的な情報の収集が不可欠となる。しかしながら、これらマルチスケールな情報を効率的かつ統合的に収集する手法は確立されていない。

本研究では、臨床薬物の約30%が標的とする最大のタンパク質ファミリーであるGタンパク質共役型受容体(GPCR)をモデル系として設定し、1)リガンド構造の違いに起因する受容体の僅かな構造変化が、2)結合するシグナル伝達因子タンパク質の結合安定性に影響を与え、3)これが多次元的な細胞内シグナルプロファイルを変調し、4)神経細胞を通じて個体への作用へと繋がる、一連の分子から個体レベルまでの互いにリンクされた網羅的情報セットを取得するプラットフォームを構築することを目指した。そのために、構造、有機化学、細胞、個体について独自の解析技術を持つ研究者が集結し、独自のユニークな化合物群を用いることで、オピオイド受容体における生理作用機構の解明と創薬応用に挑戦した。

研究組織

(総括班)

課題名：マルチスケールな生理作用の因数分解基盤構築の支援

課題番号：21H05111

研究代表者：齊藤 毅 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構・准教授)

研究分担者：井上 飛鳥 (東北大学薬学研究科・教授)

研究分担者：寿野 良二 (関西医科大学医学部・准教授)

研究分担者：櫻井 勝康 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構・准教授)

(計画班：A01班)

課題名：過渡的タンパク質複合体の高速構造解析プラットフォームの構築

課題番号：21H05112

研究代表者：寿野 良二 (関西医科大学医学部・准教授)

研究分担者：加藤 貴之 (大阪大学蛋白研究所・教授)

研究分担者：藤田 大士 (京都大学高等研究院・准教授)

(計画班：A02 班)

課題名：オピオイド受容体の網羅的シグナル解析による薬理経路の同定

課題番号：21H05113

研究代表者：井上 飛鳥 (東北大学薬学研究科・教授)

研究分担者：生田 達也 (東北大学薬学研究科・助教)

(計画班：A03 班)

課題名：オピオイドリガンドに対する中枢神経応答システムの生理作用特異的な分解

課題番号：21H05114

研究代表者：櫻井 勝康 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構・准教授)

(計画班：A04 班)

課題名：モルヒナン骨格を基盤とした三次元的フォーカスライブラリーの構築

課題番号：21H05115

研究代表者：斉藤 毅 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構・准教授)

研究分担者：南雲 康行 (国立研究開発法人国立がん研究センター研究所・主任研究員)

交付決定額 (配分額)

(単位：千円)

	合計	直接経費	間接経費
令和3年度	45,500	35,000	10,500
令和4年度	45,500	35,000	10,500
令和5年度	45,500	35,000	10,500
総計	136,500	105,000	31,500

研究発表

雑誌論文

- (1) Toth, A.D., Soltesz-Katona, E., Kis, K., Guti, V., Gilzer, S., Prokop, S., Boros, R., Misak, A., Balla, A., Varnai, P., Turiak, L., Acs, A., Drahos, L., **Inoue, A.**, Hunyady, L., and Turu, G. (2024) ArreSTick motif controls beta-arrestin-binding stability and extends phosphorylation-dependent beta-arrestin interactions to non-receptor proteins. *Cell Rep.* **43**, 114241. (A02 班)
- (2) Tatsumi, M., Cruz, C., Kamakura, N., Kuwabara, R., Nakamura, G., **Ikuta, T.**, Abrol, R., and **Inoue, A.** (2024) Identification of Galpha(12)-vs-Galpha(13)-coupling determinants and development of a Galpha(12/13)-coupled designer GPCR. *Sci Rep.* **14**, 11119. (A02 班)
- (3) **Suno, R.** (2024) Exploring Diverse Signaling Mechanisms of G Protein-Coupled Receptors through Structural Biology. *J Biochem.* **175**, 357-365. (A01 班)
- (4) **Sakurai, K.** (2024) Rethinking c-Fos for understanding drug action in the brain. *J Biochem.* **175**, 377-381. (A03 班)
- (5) Saito, A., Kise, R., and **Inoue, A.** (2024) Generation of Comprehensive GPCR-Transducer-Deficient Cell Lines to Dissect the Complexity of GPCR Signaling. *Pharmacol Rev.* **76**, 599-619. (A02 班)
- (6) Maeda, K., Sugai, T., Tokuda, A., Kajino, K., **Saitoh, T.**, Nagase, H., and Kutsumura, N. (2024) Design and synthesis of unique morphinan-type molecules: Their application to the search for the unexplored binding domain between opioid receptors and morphinan ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* **99**, 129611. (A04 班)
- (7) Kuramoto, R., Kise, R., Kanno, M., Kawakami, K., **Ikuta, T.**, Makita, N., and **Inoue, A.** (2024) Therapeutic potentials of nonpeptidic V2R agonists for partial cNDI-causing V2R mutants. *PLoS One.* **19**, e0303507. (A02 班)
- (8) Kise, R., and **Inoue, A.** (2024) GPCR signaling bias: an emerging framework for opioid drug development. *J Biochem.* **175**, 367-376. (A02 班)
- (9) Kajino, K., Tokuda, A., and **Saitoh, T.** (2024) Morphinan Evolution: The Impact of Advances in Biochemistry and Molecular Biology. *J Biochem.* **175**, 337-355. (A04 班)
- (10) Doi, K., Kawakami, K., **Ikuta, T.**, and **Inoue, A.** (2024) A cAMP-biosensor-based assay for measuring plasma arginine-vasopressin levels. *Sci Rep.* **14**, 9453. (A02 班)
- (11) Xu, J., Wang, Q., Hubner, H., Hu, Y., Niu, X., Wang, H., Maeda, S., **Inoue, A.**, Tao, Y., Gmeiner, P., Du, Y., Jin, C., and Kobilka, B.K. (2023) Structural and dynamic insights into supra-physiological activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nat Commun.* **14**, 376. (A02 班)
- (12) Tatsumi, M., Kishi, T., Ishida, S., Kawana, H., Uwamizu, A., Ono, Y., Kawakami, K., Aoki, J., and **Inoue, A.** (2023) Ectodomain shedding of EGFR ligands serves as an activation readout for TRP channels. *PLoS One.* **18**, e0280448. (A02 班)

- (13) **Saitoh, T.**, and Sakurai, T. (2023) The present and future of synthetic orexin receptor agonists. *Peptides*. **167**, 171051. (A04 班)
- (14) Ono, Y., Kawakami, K., Nakamura, G., Ishida, S., Aoki, J., and **Inoue, A.** (2023) Generation of Galphai knock-out HEK293 cells illuminates Galphai-coupling diversity of GPCRs. *Commun Biol*. **6**, 112. (A02, A04 班)
- (15) Liang, J., **Inoue, A.**, **Ikuta, T.**, Xia, R., Wang, N., Kawakami, K., Xu, Z., Qian, Y., Zhu, X., Zhang, A., Guo, C., Huang, Z., and He, Y. (2023) Structural basis of lysophosphatidylserine receptor GPR174 ligand recognition and activation. *Nat Commun*. **14**, 1012. (A02 班)
- (16) Iio, K., Hashimoto, K., **Nagumo, Y.**, Amezawa, M., Hasegawa, T., Yamamoto, N., Kutsumura, N., Takeuchi, K., Ishikawa, Y., Yamamoto, H., Tokuda, A., Sato, T., Uchida, Y., **Inoue, A.**, Tanimura, R., Yanagisawa, M., Nagase, H., and **Saitoh, T.** (2023) Design and Synthesis of Orexin 1 Receptor-Selective Agonists. *J Med Chem*. **66**, 5453-5464. (A02, A04 班)
- (17) Furumura, S., Ozaki, T., Sugawara, A., Morishita, Y., Tsukada, K., **Ikuta, T.**, **Inoue, A.**, and Asai, T. (2023) Identification and Functional Characterization of Fungal Chalcone Synthase and Chalcone Isomerase. *J Nat Prod*. **86**, 398-405. (A02 班)
- (18) Amezawa, M., Yamamoto, N., **Nagumo, Y.**, Kutsumura, N., Ishikawa, Y., Yanagisawa, M., Nagase, H., and **Saitoh, T.** (2023) Design and synthesis of novel orexin 2 receptor agonists with a 1,3,5-trioxazatriquinane skeleton. *Bioorg Med Chem Lett*. **82**, 129151. (A02 班)
- (19) Xu, Z., **Ikuta, T.**, Kawakami, K., Kise, R., Qian, Y., Xia, R., Sun, M.X., Zhang, A., Guo, C., Cai, X.H., Huang, Z., **Inoue, A.**, and He, Y. (2022) Structural basis of sphingosine-1-phosphate receptor 1 activation and biased agonism. *Nat Chem Biol*. **18**, 281-288. (A02 班)
- (20) **Suno, R.**, Sugita, Y., Morimoto, K., Takazaki, H., Tsujimoto, H., Hirose, M., Suno-Ikeda, C., Nomura, N., Hino, T., **Inoue, A.**, Iwasaki, K., Kato, T., Iwata, S., and Kobayashi, T. (2022) Structural insights into the G protein selectivity revealed by the human EP3-G(i) signaling complex. *Cell Rep*. **40**, 111323. (A01, A02 班)
- (21) Shibata, T., Kawakami, K., Kawana, H., Aoki, J., and **Inoue, A.** (2022) Phenotypic evaluation of constitutive GPCR/G-protein signaling in zebrafish embryos and larvae. *Biochem Biophys Res Commun*. **602**, 70-76. (A02 班)
- (22) **Saitoh, T.**, Amezawa, M., Horiuchi, J., **Nagumo, Y.**, Yamamoto, N., Kutsumura, N., Ohshita, R., Tokuda, A., Irukayama-Tomobe, Y., Ogawa, Y., Ishikawa, Y., Hasegawa, E., Sakurai, T., Uchida, Y., Sato, T., Gouda, H., Tanimura, R., Yanagisawa, M., and Nagase, H. (2022) Discovery of novel orexin receptor antagonists using a 1,3,5-trioxazatriquinane bearing multiple effective residues (TriMER) library. *Eur J Med Chem*. **240**, 114505. (A04 班)
- (23) Randolph, C.E., Dwyer, M.B., Aumiller, J.L., Dixon, A.J., **Inoue, A.**, Osei-Owusu, P., and Wedegaertner, P.B. (2022) Enhanced membrane binding of oncogenic G protein

- alphaQ209L confers resistance to inhibitor YM-254890. *J Biol Chem.* **298**, 102538. (A02 班)
- (24) Ogiso, H., **Suno, R.**, Kobayashi, T., Kawami, M., Takano, M., and Ogasawara, M. (2022) A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method to Study the Interaction between Membrane Proteins and Low-Molecular-Weight Compound Mixtures. *Molecules.* **27**, 4889. (A01 班)
- (25) Nureki, I., Kobayashi, K., Tanaka, T., Demura, K., **Inoue, A.**, Shihoya, W., and Nureki, O. (2022) Cryo-EM structures of the beta(3) adrenergic receptor bound to solabegron and isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun.* **611**, 158-164. (A02 班)
- (26) Matic, M., Singh, G., Carli, F., De Oliveira Rosa, N., Miglionico, P., Magni, L., Gutkind, J.S., Russell, R.B., **Inoue, A.**, and Raimondi, F. (2022) PRECOGx: exploring GPCR signaling mechanisms with deep protein representations. *Nucleic Acids Res.* **50**, W598-W610. (A02 班)
- (27) Kobayashi, K., Kawakami, K., Kusakizako, T., Miyauchi, H., Tomita, A., Kobayashi, K., Shihoya, W., Yamashita, K., Nishizawa, T., Kato, H.E., **Inoue, A.**, and Nureki, O. (2022) Endogenous ligand recognition and structural transition of a human PTH receptor. *Mol Cell.* **82**, 3468-3483 e3465. (A02 班)
- (28) Kawakami, K., Yanagawa, M., Hiratsuka, S., Yoshida, M., Ono, Y., Hiroshima, M., Ueda, M., Aoki, J., Sako, Y., and **Inoue, A.** (2022) Heterotrimeric Gq proteins act as a switch for GRK5/6 selectivity underlying beta-arrestin transducer bias. *Nat Commun.* **13**, 487. (A02 班)
- (29) Janetzko, J., Kise, R., Barsi-Rhyne, B., Siepe, D.H., Heydenreich, F.M., Kawakami, K., Masureel, M., Maeda, S., Garcia, K.C., von Zastrow, M., **Inoue, A.**, and Kobilka, B.K. (2022) Membrane phosphoinositides regulate GPCR-beta-arrestin complex assembly and dynamics. *Cell.* **185**, 4560-4573 e4519. (A02 班)
- (30) Iio, K., **Saitoh, T.**, Ohshita, R., Hino, T., Amezawa, M., Takayama, Y., **Nagumo, Y.**, Yamamoto, N., Kutsumura, N., Irukayama-Tomobe, Y., Ishikawa, Y., Tanimura, R., Yanagisawa, M., and Nagase, H. (2022) Discovery of orexin 2 receptor selective and dual orexin receptor agonists based on the tetralin structure: Switching of receptor selectivity by chirality on the tetralin ring. *Bioorg Med Chem Lett.* **60**, 128555. (A04 班)
- (31) Iio, K., Kutsumura, N., **Nagumo, Y.**, **Saitoh, T.**, Tokuda, A., Hashimoto, K., Yamamoto, N., Kise, R., **Inoue, A.**, Mizoguchi, H., and Nagase, H. (2022) Synthesis of unnatural morphinan compounds to induce itch-like behaviors in mice: Towards the development of MRGPRX2 selective ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* **56**, 128485. (A02, A04 班)
- (32) Hino, T., **Saitoh, T.**, **Nagumo, Y.**, Yamamoto, N., Kutsumura, N., Irukayama-Tomobe, Y., Ishikawa, Y., Tanimura, R., Yanagisawa, M., and Nagase, H. (2022) Design and synthesis of novel orexin 2 receptor agonists based on naphthalene skeleton. *Bioorg Med Chem Lett.* **59**, 128530. (A04 班)

- (33) Heo, Y., Ishimoto, N., Jeon, Y.E., Yun, J.H., Ohki, M., Anraku, Y., Sasaki, M., Kita, S., Fukuhara, H., Ikuta, T., Kawakami, K., Inoue, A., Maenaka, K., Tame, J.R.H., Lee, W., and Park, S.Y. (2022) Structure of the human galanin receptor 2 bound to galanin and Gq reveals the basis of ligand specificity and how binding affects the G-protein interface. *PLoS Biol.* **20**, e3001714. (A02 班)
- (34) Hauser, A.S., Avet, C., Normand, C., Mancini, A., Inoue, A., Bouvier, M., and Gloriam, D.E. (2022) Common coupling map advances GPCR-G protein selectivity. *Elife.* **11**, e74107. (A02 班)
- (35) El Khamlichi, C., Reverchon, F., Hervouet-Coste, N., Robin, E., Chopin, N., Deau, E., Madouri, F., Guimpied, C., Colas, C., Menuet, A., Inoue, A., Bojarski, A.J., Guillaumet, G., Suzenet, F., Reiter, E., and Morisset-Lopez, S. (2022) Serodolin, a beta-arrestin-biased ligand of 5-HT(7) receptor, attenuates pain-related behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **119**, e2118847119. (A02 班)
- (36) Dixon, A.D., Inoue, A., Robson, S.A., Culhane, K.J., Trinidad, J.C., Sivaramkrishnan, S., Bumbak, F., and Ziarek, J.J. (2022) Effect of Ligands and Transducers on the Neurotensin Receptor 1 Conformational Ensemble. *J Am Chem Soc.* **144**, 10241-10250. (A02 班)
- (37) Chen, G., Xu, J., Inoue, A., Schmidt, M.F., Bai, C., Lu, Q., Gmeiner, P., Liu, Z., and Du, Y. (2022) Activation and allosteric regulation of the orphan GPR88-Gi1 signaling complex. *Nat Commun.* **13**, 2375. (A02 班)
- (38) Baidya, M., Chaturvedi, M., Dwivedi-Agnihotri, H., Ranjan, A., Devost, D., Namkung, Y., Stepniewski, T.M., Pandey, S., Baruah, M., Panigrahi, B., Sarma, P., Yadav, M.K., Maharana, J., Banerjee, R., Kawakami, K., Inoue, A., Selent, J., Laporte, S.A., Hebert, T.E., and Shukla, A.K. (2022) Allosteric modulation of GPCR-induced beta-arrestin trafficking and signaling by a synthetic intrabody. *Nat Commun.* **13**, 4634. (A02 班)
- (39) Asada, H., Im, D., Hotta, Y., Yasuda, S., Murata, T., Suno, R., and Iwata, S. (2022) Molecular basis for anti-insomnia drug design from structure of lemborexant-bound orexin 2 receptor. *Structure.* **30**, 1582-1589 e1584. (A01 班)
- (40) Suzuki, K., Katayama, K., Sumii, Y., Nakagita, T., Suno, R., Tsujimoto, H., Iwata, S., Kobayashi, T., Shibata, N., and Kandori, H. (2021) Vibrational analysis of acetylcholine binding to the M(2) receptor. *RSC Adv.* **11**, 12559-12567. (A01 班)
- (41) Okamoto, H.H., Miyauchi, H., Inoue, A., Raimondi, F., Tsujimoto, H., Kusakizako, T., Shihoya, W., Yamashita, K., Suno, R., Nomura, N., Kobayashi, T., Iwata, S., Nishizawa, T., and Nureki, O. (2021) Cryo-EM structure of the human MT(1)-G(i) signaling complex. *Nat Struct Mol Biol.* **28**, 694-701. (A01, A02 班)

- (42) Katayama, K., Suzuki, K., Suno, R., Kise, R., Tsujimoto, H., Iwata, S., Inoue, A., Kobayashi, T., and Kandori, H. (2021) Vibrational spectroscopy analysis of ligand efficacy in human M(2) muscarinic acetylcholine receptor (M(2)R). *Commun Biol.* **4**, 1321. (A01, A02 班)

学会発表

1. 武田翔馬、須貝智也、斉藤毅，“フロー合成を用いた 1,3,5-trioxazatriquinane 骨格の迅速合成法の開発”，第 85 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、新潟大学(新潟)、2023 年 11 月 26 日 (A04 班, 口頭発表)
2. 梶野景太、谷田誠浩、南雲康行、徳田明久、沓村憲樹、川上耕季、井上飛鳥、長瀬博、斉藤毅，“ビシクロ[2.2.2]オクタン骨格を有する新規κオピオイド受容体作動薬の創製”，第 40 回メディシナルケミストリーシンポジウム、名古屋大学(愛知)、2023 年 11 月 14 日 (A02, A04 班, ポスター発表)
3. 武田翔馬、須貝智也、斉藤毅，“フロー合成を用いた 1,3,5-trioxazatriquinane 骨格の迅速合成法の開発”，第 13 回サブウェイセミナー、筑波大学(茨城)、2023 年 10 月 14 日 (A04 班, ポスター発表)
4. 橋本佳広、南雲康行、飯尾啓太、長谷川大晟、徳田明久、山元ひかり、石川有紀子、内田康雄、沓村憲樹、柳沢正史、斉藤毅、長瀬博，“新規創製選択的オレキシン 1 受容体作動薬と疼痛モデルマウスにおける治療有効性の解析”，第 53 回日本神経精神薬理学会年会、東京ドームホテル(東京)、2023 年 9 月 7 日 (A04 班, ポスター発表)
5. T. Sugai, S. Takeda, T. Saitoh, “Development of Highly Productive Synthetic Method for TriMER by Flow System”, *Flow Chemistry Asia 2023*, ホテル日航成田(千葉), Oct. 5–6, 2023 (A04 班, ポスター発表)
6. 斉藤毅、南雲康行、梶野景太、谷田誠浩、徳田明久、寿野(池田)千代、寿野良二、清水(小林)拓也、長瀬博，“鎮静作用を分離したκオピオイド受容体作動薬の創製”，第 42 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、東京理科大学(東京)、2023 年 9 月 2 日 (A01, A04 班, 招待講演)
7. 斉藤毅，“Re:ゼロから始めるメドケム研究”，第 56 回天然物化学談話会、つくば国際会議場(茨城)、2023 年 6 月 29 日 (A04 班, 招待講演)
8. 中村楽、川上耕季、生田達也、井上飛鳥，“GPCR におけるバイアスシグナル創出基点とその機構の解析”，日本薬学会第 143 年会、北海道大学(札幌)、2023 年 3 月 28 日 (A02 班, 口頭発表)
9. 武田翔馬、須貝智也、雨澤真櫻、斉藤毅，“フロー合成を用いた TriMER の効率的合成法の開発”，日本薬学会第 143 年会、北海道大学(札幌)、2023 年 3 月 28 日 (A04 班, 口頭発表)

10. 橋本佳応、南雲康行、飯尾啓太、齊藤夕貴、石川有紀子、杳村憲樹、櫻井武、柳沢正史、齊藤毅、長瀬博、“オレキシン1受容体を介する疼痛制御メカニズムの解析”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月27日 (A04班, ポスター発表)
11. 長谷川大晟、飯尾啓太、石川有紀子、杳村憲樹、柳沢正史、長瀬博、齊藤毅、“オレキシン1受容体選択的作動薬の設計と合成”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月27日 (A04班, 口頭発表)
12. 栗林利明、雨澤真櫻、岡田卓大、大下隆一郎、山本直司、南雲康行、杳村憲樹、入鹿山容子、石川有紀子、柳沢正史、長瀬博、齊藤毅、“配座制御に基づく新規テトラリン型OX2R選択的作動薬の創製”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月27日 (A04班, 口頭発表)
13. 関谷有希、坂本奈津美、石川有紀子、徳田明久、日野翼、南雲康行、杳村憲樹、柳沢正史、長瀬博、齊藤毅、“中枢移行性改善に向けた新規モルヒナン型OX1R拮抗薬の設計と合成”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月26日 (A04班, 口頭発表)
14. 徳田明久、南雲康行、齊藤毅、長瀬博、“慢性的ストレス誘発うつ様症状に対する δ オピオイド神経系の機能解析”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月27日 (A04班, 口頭発表)
15. 角本智哉、徳田明久、梶野景太、南雲康行、齊藤毅、“ δ オピオイド受容体作動薬の副作用分離を目指した新規モルヒナン誘導体の合成と評価”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月26日 (A04班, 口頭発表)
16. 寿野良二、“プロスタグランジン受容体の構造解析によるシグナル伝達機構の解明”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月26日 (A03班, 招待講演)
17. 櫻井勝康、“ON-OFFを見る -神経活動の遷移の大規模な可視化-”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月26日 (A01班, 招待講演)
18. 齊藤毅、“三次元配向制御に立脚したオレキシン受容体作動薬の創製”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月26日 (A04班, 招待講演)
19. 齊藤毅、梶野景太、谷田誠浩、徳田明久、南雲康行、長瀬博、“鎮静作用を分離した κ オピオイド受容体作動薬の創製”，日本薬学会第143年会、北海道大学(札幌)、2023年3月26日 (A04班, 招待講演)
20. K. Hashimoto, Y. Nagumo, K. Iio, Y. Saito, Y. Ishikawa, N. Kutsumura, T. Sakurai, M. Yanagisawa, T. Saitoh, H. Nagase, “Analysis of orexinergic function in chronic pain-like states”, The 11th Annual WPI-IIIIS Symposium, Univ. Tsukuba, Feb. 22, 2023 (A04班, ポスター発表)
21. K. Kajino, M. Yata, Y. Nagumo, A. Tokuda, N. Kutsumura, T. Saitoh, H. Nagase, “Design and synthesis of novel κ opioid receptor agonists with bicyclo [2.2.2] octene skeleton”, The 11th Annual WPI-IIIIS Symposium, Univ. Tsukuba, Feb. 22, 2023 (A04班, ポスター発表)

22. **A. Inoue**, “Non-canonical activation of β -arrestin and G protein”, GPCR Workshop 2023, Kona Beach Hotel, Jan. 3–6, 2023 (A02 班, 招待講演).
23. 鈴木璃子、**生田達也**、川上耕季、**井上飛鳥**, “日本人に特徴的な GPCR 遺伝子バリエーションの探索”, 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張メッセ(千葉), 2022 年 11 月 30 日–12 月 2 日 (A02 班, ポスター発表)
24. **斉藤毅**、梶野景太、谷田誠浩、徳田明久、南雲康行、長瀬博, “生理作用の因数分解: 副作用のない薬の創製を目指して”, 第 95 回日本生化学会大会, 名古屋国際会議場(愛知), 2022 年 11 月 9 日 (A04 班, 招待講演)
25. **寿野良二**, “構造生物学的技術による GPCR の多様なシグナル伝達機構の解明”, 第 95 回日本生化学会大会, 名古屋国際会議場(愛知), 2022 年 11 月 9 日 (A01 班, 招待講演)
26. **櫻井勝康**, “新規機能的コネクトーム解析法”, 第 95 回日本生化学会大会, 名古屋国際会議場(愛知), 2022 年 11 月 9 日 (A04 班, 招待講演)
27. **井上飛鳥**, “オピオイド受容体のシグナル解読とバイアス型リガンドによる自在制御”, 第 95 回日本生化学会大会, 名古屋国際会議場(愛知), 2022 年 11 月 9 日 (A04 班, 招待講演)
28. 飯尾啓太、**斉藤毅**、橋本佳広、**南雲康行**、雨澤真櫻、長谷川大晟、石川有紀子、山本直司、沓村憲樹、柳沢正史、長瀬博, “選択的オレキシン 1 受容体作動薬の設計と合成”, 第 39 回メディシナルケミストリーシンポジウム、オンライン、2022 年 11 月 23–25 日 (A04 班, ポスター発表)
29. 雨澤真櫻、**斉藤毅**、山本直司、**南雲康行**、沓村憲樹、石川有紀子、柳沢正史、長瀬博, “1,3,5-Trioxazatriquinane 骨格を用いたオレキシン受容体作動薬の創製”, 第 39 回メディシナルケミストリーシンポジウム、オンライン、2022 年 11 月 23–25 日 (A04 班, ポスター発表)
30. 梶野景太、谷田誠浩、**南雲康行**、徳田明久、沓村憲樹、**斉藤毅**、長瀬博, “立体配座規制に基づく新規 κ オピオイド受容体作動薬の創製”, 第 17 回 GPCR 研究会、筑波大学(茨城)、2022 年 11 月 18–19 日 (A04 班, 口頭/ポスター発表)
31. 雨澤真櫻、**斉藤毅**、山本直司、**南雲康行**、沓村憲樹、石川有紀子、柳沢正史、長瀬博, “TriMER 骨格を用いた GPCR リガンド探索ツールの開発”, 第 17 回 GPCR 研究会、筑波大学(茨城)、2022 年 11 月 18–19 日 (A04 班, ポスター発表)
32. **生田達也**、**井上飛鳥**, “固有振動解析によって生成した GPCR コンフォメーションの評価”, 第 17 回 GPCR 研究会、筑波大学(茨城)、2022 年 11 月 18–19 日 (A02 班, ポスター発表)
33. 桑原莉来、川上耕季、倉本律輝、**生田達也**、**井上飛鳥**, “第三の結合様式におけるアレスタチンの機能の解明”, 第 17 回 GPCR 研究会、筑波大学(茨城)、2022 年 11 月 18–19 日 (A02 班, ポスター発表)

34. 川上耕季、柳川正隆、平塚寿々音、佐甲靖志、井上飛鳥，“G α タンパク質を起点とした GRK- β アレスチン機能制御機構”，第 17 回 GPCR 研究会、筑波大学(茨城)、2022 年 11 月 18–19 日 (A02 班, ポスター発表)
35. 井上飛鳥，“細分化して見えてくる GPCR シグナル原理”，第 17 回 GPCR 研究会、筑波大学(茨城)、2022 年 11 月 18–19 日 (A02 班, 招待講演)
36. 寿野良二，“プロスタグランジン受容体シグナリング複合体から見えてきた G タンパク質選択性の分子機構”，第 17 回 GPCR 研究会、筑波大学(茨城)、2022 年 11 月 18–19 日 (A01 班, 口頭発表)
37. T. Saitoh，“Discovery of novel orexin receptor agonists carrying naphthalene skeleton”，The 15th International Symposium on Organic Reactions (ISOR-15), Taichung/Online hybrid, Nov. 6, 2022 (A04 班, 口頭発表)
38. T. Saitoh，“Discovery of orexin receptor agonists”，The 15th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides/The 1st International Society for Bioactive Peptides Meeting, Osaka International Convention Center, Oct. 31–Nov 2, 2022 (A04 班, 口頭発表)
39. 倉本律輝、生田達也、川上耕季，“ β アレスチンの新規 PIP2 結合部位”，第 60 回日本生物物理学会年会、函館アリーナ、2022 年 9 月 28–30 日 (A02 班, 口頭発表)
40. 梶野景太、谷田誠浩、南雲康行、徳田明久、沓村憲樹、斉藤毅、長瀬博，“立体配座規制に基づく新規 κ オピオイド受容体作動薬の創製”，第 41 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、オンライン、2022 年 9 月 1 日～30 日 (A04 班, 口頭発表)
41. A. Inoue，“GRK-independent arrestin activation”，FASEB SRC: The G Protein-coupled Receptor Kinases and Arrestins Conference: Key Modulators of Signal Transduction, Florida, Aug. 21–26 (A02 班, 招待講演)
42. 斉藤毅，“意識をハックする分子の創製”，第 9 回慶應有機化学若手シンポジウム、オンライン、2022 年 5 月 7 日 (A04 班, 口頭発表)
43. 斉藤毅，“分子の形に注目した創薬研究”，日本薬学会第 142 年会、オンライン、2022 年 3 月 26 日 (A04 班, 口頭発表)
44. K. Kajino, M. Yata, T. Saitoh, N. Yamamoto, Y. Nagumo, T. Hino, A. Tokuda, N. Kutsumura, H. Nagase, “Design and synthesis of novel morphinan-type κ opioid receptor agonists bearing a bicyclo[2.2.2]octane skeleton and these pharmacological activities”，The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem2021), online, Dec. 17–22, 2021 (A04 班, ポスター発表)
45. N. Sakamoto, T. Saitoh, Y. Ishikawa, A. Tokuda, T. Hino, N. Yamamoto, Y. Nagumo, N. Kutsumura, M. Yanagisawa, H. Nagase, “Design and synthesis of 17-N-fluoroalkyl nalfurafine derivatives to improve pharmacological properties”，The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem2021), online, Dec. 17–22, 2021 (A04 班, ポスター発表)

46. M. Amezawa, J. Horiuchi, **T. Saitoh**, R. Ohshita, Y. Ogawa, Y. Ishikawa, Y. Irukayama, E. Hasegawa, D. Hayakawa, Y. Watanabe, Y. Nagumo, N. Yamamoto, N. Kutsumura, H. Gouda, T. Sakurai, M. Yanagisawa, H. Nagase, “Discovery of novel orexin receptor antagonists with 1,3,5-trioxazatriquinane skeleton”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem2021), online, Dec. 17–22, 2021 (A04 班, ポスター発表)
47. K. Iio, N. Kutsumura, Y. Nagumo, **T. Saitoh**, N. Yamamoto, A. Tokuda, K. Hashimoto, H. Mizoguchi, H. Nagase, “Synthesis of unnatural morphinan compounds to induce itch like behavior in mice: Towards the development of MRGPRX2 selective ligands”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem2021), online, Dec. 17–22, 2021 (A04 班, ポスター発表)
48. K. Iio, **T. Saitoh**, R. Ohshita, T. Hino, M. Amezawa, Y. Nagumo, N. Yamamoto, Y. Ishikawa, Y. Irukayama-Tomobe, N. Kutsumura, M. Yanagisawa, H. Nagase, “Design and Synthesis of Novel Orexin Receptor Dual Agonists with Tetralin Skeleton”, The 13th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS2021), online, Nov. 29–Dec. 2, 2021 (A04 班, ポスター発表)
49. M. Amezawa, J. Horiuchi, **T. Saitoh**, R. Ohshita, Y. Ogawa, Y. Ishikawa, Y. Irukayama, E. Hasegawa, D. Hayakawa, Y. Watanabe, Y. Nagumo, N. Yamamoto, N. Kutsumura, H. Gouda, T. Sakurai, M. Yanagisawa, H. Nagase, The 13th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS2021), online, Nov. 29–Dec. 2, 2021 (A04 班, ポスター発表)
50. 寿野良二, “ヒトプロスタグランジン受容体 EP3-G タンパク質複合体の構造解析”, 第 59 回日本生物物理学会年会, オンライン, 2021 年 11 月 25 日 (A04 班, 招待講演)
51. 徳田明久、南雲康行、片山璃沙子、上田壮志、上園保仁、山本直司、斉藤毅、沓村憲樹、長瀬博, “ δ オピオイド受容体作動薬のストレス誘発うつ様症状の治療効果とその副作用発現機序の解明”, 第 40 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, オンライン, 2021 年 9 月 5 日 (A04 班, 口頭発表)
52. 橋本佳広、南雲康行、齊藤夕貴、斉藤毅、山本直司、沓村憲樹、櫻井武、長瀬博, “体性感覚神経系におけるオレキシン神経の役割”第 40 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, オンライン, 2021 年 9 月 5 日 (A04 班, 口頭発表)

図書

1. 寿野良二、清水(小林)拓也, “クライオ電子顕微鏡ハンドブック”, NTS, 427, 2023.

産業財産権

該当なし

研究成果

(総括班)

【目的】

本研究領域では、次世代の「理論的創薬」を見据えた創薬関連研究のデジタル化に変革を起こすべく、分子、細胞、個体の各スケールにおける高次元な情報を効率的に取得し、薬物創製へと結び付ける一連の統合プラットフォームの確立を目的とする。そのために、分子レベル:「タンパク質複合体の迅速構造解析技術」(A01 班 寿野・関西医大)、細胞レベル:「細胞内シグナル伝達の網羅的解析技術」(A02 班 井上・東北大)、個体レベル:「薬物刺激依存的な神経細胞群の標識技術」(A03 班 櫻井・筑波大) からなる独自性の高い分析技術を集約し、領域代表 (A04 班 斉藤・筑波大) らが保有するユニークな作用を持つリガンド群を掛け合わせることで目的の達成を目指した。総括班は、領域代表と計画班代表者3名で構成し、目的達成に向けた研究進捗管理、広く本領域の概念や成果を学協会ならびに社会に普及するための広報活動を行った。

【研究成果】

(1) 領域内コミュニケーション

オンラインコミュニケーションツールを活用し、領域内の連携、データ共有を行うためのプラットフォームを構築した。各計画班のチャンネルを用いて、研究状況の報告、サンプル授受連絡等を行うことで、円滑な進捗管理、コミュニケーションを図った。また、同ツール内において、最新論文情報の共有、論文執筆の討議、シンポジウム開催の議論を行い、シームレスな協業体制を構築した。領域全体の研究方針を討論するために、領域会議(オンライン会議5回、オンサイト会議2回)を開催し、細かな方針変更や四半期進捗はオンラインコミュニケーションツール上で随時実施した。また、アドバイザーである長瀬博筑波大学名誉教授、成田年教授には創薬としての出口戦略のディスカッションを、Brian Kobilika 教授、柳沢正史教授には研究ディスカッションをして頂いた。

(2) シンポジウム, セミナー開催

総括班でシンポジウムを企画し、2022年11月開催の第95回日本生化学会大会において領域主催シンポジウム「マルチレイヤー解析技術によるシグナル伝達-生命現象の解読」を開催した。また、本領域で注目しているGPCR研究領域に本領域をアピールするために、2022年11月開催の第17回GPCR研究会を共催した。学術変革領域(B)間の連携にも目を向け、学術変革領域(B)「糖化学ノックイン」とシンポジウムを企画し、2023年3月開催の日本薬学会第143年会において共催シンポジウム「異分野融合で切り込む! 膜タンパク質の世界」を開催した。この他にも、領域代表者は、第97回日本薬理学会年会の公募シンポジウム「心理的ストレスの感受性・抵抗性に関する神経基盤」のオーガナイザーを行った。また、本領域で取り扱うモルヒネ等のアルカロイドの化学合成に関する知見を深めるために、有機合成化学セミナーを開催し、領域内外の多くの研究者が参加した。

(3) 領域ホームページ

領域の研究成果や活動を発信するために、領域のホームページ (<https://seiri-bunkai.com/>) を作成した。ホームページには、領域の活動履歴や最新の論文情報などのニュース、領域メンバーの昇任、シンポジウム開催連絡などを掲載した。

(4) 領域特集論文

総括班で領域を広報するために、GPCR 研究におけるマルチスケールプラットフォームの紹介として、GPCR の機能理解に向けた各スケールにおける独自性の高い解析技術の最近の進展をまとめた特集号を Journal of Biochemistry 誌 JB Special Issue – Multi-scale platform for GPCR biology を企画し、斉藤 (Morphinan Evolution: The Impact of Advances in Biochemistry and Molecular Biology)、寿野 (Exploring Diverse Signaling Mechanisms of G Protein-Coupled Receptors through Structural Biology)、井上 (GPCR signaling bias: an emerging framework for opioid drug development)、櫻井 (Rethinking c-Fos for understanding drug action in the brain) がそれぞれ総説を寄稿した。2024 年 6 月時点において、うち 2 報が Journal of Biochemistry 誌の Most Read Article に選出されている。

(5) その他

研究期間内に各計画班の研究代表者 4 名が昇任した。

2023.1	A01 班代表 寿野良二	関西医科大学・医科学講座・講師 → 関西医科大学・医科学講座・准教授
2022.4	A02 班代表 井上飛鳥	東北大学大学院・薬学研究科・准教授 → 東北大学大学院・薬学研究科・教授 (現 京都大学教授)
2023.3	A03 班代表 櫻井勝康	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教 → 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授 筑波大学・医学医療系・准教授
2023.3	A01 班代表 斉藤毅	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教 → 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授 筑波大学・医学医療系・准教授

(計画班)

A01 班：過渡的タンパク質複合体の高速構造解析プラットフォームの構築

【目的】

寿野班 (A01 班) は、クライオ電子顕微鏡単粒子解析技術 (Cryo-EM SPA) を駆使して、作用の異なるリガンドと受容体、シグナル伝達因子の複合体構造を明らかとすることで作用を生み出す構造メカニズムの解明を目的とした。他の計画班との連携として、(1) 斉藤班 (A01 班) が合成したリガンドを用いた κ オピオイド受容体 (KOR)/ δ オピオイド受容体 (DOR) とシグナル伝達因子の三者複合体の構造解析を行い、シグナル伝達機構を解明する

こと、(2) ケージ技術と Cryo-EM SPA を融合した迅速構造決定プラットフォームを開発することを目指した。

【研究成果】

(1) リガンド-受容体-シグナル伝達因子複合体の構造解析とシグナル伝達機構の解明

齊藤班が合成した新規バイアス型リガンド (YNT-1612、KNT-127) と既知バランス型リガンド (U50,488H, Nalfurafine, SNC-80) を用いて、KOR/DOR と各シグナル伝達因子との複合体構造を Cryo-EM SPA により構造決定した。KOR, DOR のコンストラクトはすでに報告されている活性型 X 線結晶構造解析の報告を参考にし、C 末端には GFP-His10 を融合した。発現には昆虫細胞 Sf9 を用い、KOR-GFP および DOR-GFP と三量体 G タンパク質を共発現した。精製は Ni-NTA, GFP 抗体カラムを用いることで KOR/DOR-Gi 複合体を精製した。複合体を安定化し、Gi の N 末端に結合する scFv16 抗体を混合してゲルろ過 HPLC クロマトグラフィーによって複合体のみを分取し、10mg/ml まで濃縮して電顕サンプルとした。上述したすべてのバランス型/バイアス型リガンド結合状態の構造決定に成功した。また、これらの構造情報を元にしてリガンド結合に関わるアミノ酸について変異体を作製し、薬理的解析を行うことでバイアスドリガンドの作用機序について検証することで、KOR と DOR のシグナル選択性について明らかにし、論文投稿準備中である。

(2) ケージ技術と Cryo-EM SPA を融合した迅速構造決定プラットフォームの開発

最初に、A01 班研究分担者の藤田らの班の持つケージ技術を利用する GPCR-アレスチン複合体の調製を目指した。これまで報告されている GPCR-アレスチン複合体形成法を参考に DOR, KOR について検討した。GPCR がアレスチンと複合体を形成するためには GPCR の C 末端領域のリン酸化が必要である。この点についていくつかの方法を検討した。ひとつは、精製標品を *in vitro* で GRK キナーゼを用いてリン酸化する方法、2つ目は *in vivo* でターゲット GPCR と GRK を共発現させる方法、3つ目は GPCR の C 末端をリン酸化されるとアレスチンと強く結合する V2 の C 末端に置換する方法を検討した。この中で最も良好な結果は C 末端にリン酸化 V2 ペプチドを、Sortase を使って融合する方法であった。この方法を用いて GPCR とアレスチンの複合体を得ることに成功した。Cryo-EM で観察したところ、GPCR とアレスチンの複合体は観測されたが、構文可能構造決定には至らなかった。この理由として、GPCR とアレスチンが様々な状態を形成することが考えられた。今後はこの手法を用いて GPCR-アレスチン複合体の構造を安定化する方法を検討するとともに、藤田らのケージ技術を利用した系を確立し迅速な構造決定プラットフォームの開発を目指す。

A02 班：オピオイド受容体の網羅的シグナル解析による薬理経路の同定

【目的】

井上班 (A02 班) は、独自の GPCR シグナル解析技術を用いて、オピオイド受容体の多様な作用を生み出す細胞内シグナル伝達機構の解明を目的とした。他の計画班との連携とし

て、(1) 斉藤班 (A04 班) が合成するオピオイド受容体のリガンドを用いて培養細胞のシグナル伝達を精査し、リガンド構造に紐づくシグナル経路を同定すること、(2) 寿野班 (A01 班) が実施する単粒子クライオ電顕構造解析から、機能的に特定のシグナル伝達に重要な構造変化を同定すること、(3) 櫻井班 (A03 班) の個体レベル解析に向けて、バイアス型リガンドのシグナルの特徴を見出すことを目指した。

【研究成果】

(1) オピオイド受容体シグナル伝達評価系の確立と各種リガンドの評価

3つの主要なオピオイド受容体 (DOR、KOR、MOR) について、培養細胞レベルでの各種シグナル活性を計測する手法に取り組んだ。今後の実験において膜発現解析ができるように、N末端にシグナル配列と FLAG エピトープ配列および 15 アミノ酸フレキシブルリンカーを付加したヒトオピオイド受容体を発現するプラスミドコンスタントを作製した。リガンドとして、内因性リガンドである Met-enkephalin (DOR、MOR) と Dynorphin (KOR) を使用した。

始めに、GPCR と直接結合するトランスデューサーのレイヤーについてオピオイド受容体による応答を評価した。以前に開発した NanoBiT-G タンパク質乖離アッセイを用いて、Gs, Gi, Gq, G12 サブファミリーの活性を測定した。その結果、既存通り、3種のオピオイド受容体はいずれも Gi サブファミリーに対する活性が最も高く、試した Gi1, Gi2, Gi3, GoA, GoB, Gz をいずれも活性化することを確認した。3種類の中で、KOR は、Gs, Gq, G12 サブファミリーに対する活性が顕著に検出された。次に、アレスチン活性を評価する受容体コンストラクトとして、C末端 15 アミノ酸フレキシブルリンカーと SmBiT を融合させたプラスミドコンスタントを作製した。N末に LgBiT を融合させたアレスチンコンストラクトを共発現させ、リガンド応答による発光変化を計測した。その結果、3種のオピオイド受容体の β -arrestin1, β -arrestin2 のリクルート活性を良好に検出できた。C末端を未変更のオピオイド受容体に対するアレスチンのリクルートを計測する手法として、形質膜の係留タグを用いた bystander 法を検討した。CAAX モチーフを融合させた LgBiT と N末端に SmBiT を融合させたアレスチンを、オピオイド受容体と共発現させ、リガンド添加による発光変化を測定した。その結果、bystander 法でも 3種のオピオイド受容体に対して、アレスチンのリクルート活性を良好に計測できた。続いて、GRK によるオピオイド受容体へのリン酸化を評価する実験系を構築した。以前作製したユビキタス GRK サブタイプである GRK2/3/5/6 を四重欠損させた HEK293 細胞に、SmBiT 融合オピオイド受容体と LgBiT 融合アレスチンを発現させ、この時に 1つの GRK サブタイプを共発現させた。この細胞に対して、リガンド刺激によるアレスチンリクルート応答を計測した。その結果、DOR と MOR に関しては、GRK 四重欠損細胞においてアレスチンのリクルート応答が著減し、いずれの GRK サブタイプを導入した際にもアレスチンリクルート応答の増加が見られた。一方、KOR については、親

細胞と比べて GRK 四重欠損細胞でアレスチンリクルートの減少がわずかであり、GRK サブタイプの発現によるアレスチンリクルートの変化も少なかった。

次に、トランスデューサーが結合するシグナルタンパク質であるエフェクターのレイヤーについて、Gi とそのエフェクターであるアデニル酸シクラーゼの相互作用についてオピオイド受容体による応答を評価した。LgBiT 融合 G α i サブユニットと SmBiT 融合 ADCY5 をオピオイド受容体と共発現させ、リガンド刺激前後での発光変化を計測した。その結果、GoA を除くほとんどの Gi サブタイプについて、リガンド刺激による G α i サブユニットとアデニル酸シクラーゼの相互作用増加が観察された。続いて、改変されていない Gi のシグナル活性を評価する手法として、Gi サブファミリー欠損 HEK293 細胞に、オピオイド受容体と cAMP バイオセンサーを 1 つの Gi サブタイプと共に発現させ、フォルスコリン存在下のオピオイド受容体刺激による cAMP 蓄積抑制を測定した。その結果、親細胞で見られていた cAMP 蓄積抑制作用が Gi 欠損 HEK293 細胞では完全に消失し、Gi サブタイプを発現させることで、cAMP 蓄積抑制作用が回復した。アレスチンの構造変化やエフェクター結合活性を測定することを目的に、SmBiT 融合アレスチンと LgBiT 融合タンパク質をオピオイド受容体と共発現させ、リガンド刺激前後の発光変化を計測した。LgBiT 融合タンパク質として、アレスチンの構造認識抗体に由来し細胞内に発現させられる 2 種類のイントラボディ (IB4、IB30) とアレスチンとの結合が報告されている 5 種類のシグナル因子を用いた。 δ オピオイド受容体による検討により、シグナル因子としては SRC が再現よくリガンド依存的なアレスチンとの相互作用増加が観察された。アレスチンのドメイン間ツイストの構造変化を強く誘導することが報告されているバソプレシン V2 受容体の刺激と比較して、いずれのオピオイド受容体も IB4 と IB30 によるアレスチンの相互作用は低レベルであった。

これらの手法を用いて、斉藤班から提供されたバイアス型リガンドであるナルフラフィンや KNT-127 を始め各種オピオイド受容体リガンドの評価を行った。その結果、内因性リガンドと比べて、バイアス型リガンドのシグナルのパターンが異なることを見出した。また、斉藤班から提供されたナルフラフィンの構造アナログの G タンパク質活性とアレスチン活性を評価した。その結果、G タンパク質活性とアレスチン活性が共に増加・減少する化合物以外に、G タンパク質活性とアレスチン活性のバランスが変化する化合物を見出した。

(2) Cryo-EM SPA 結果に基づくシグナル伝達に重要な構造変化の同定

バイアス型リガンドが結合したオピオイド受容体の構造研究について、オピオイド受容体の変異体機能検証実験を行った。寿野班が構造決定した DOR の変異体実験から、G タンパク質活性とアレスチン活性に重要な受容体の構造変化を絞り込んだ。別の共同研究先が構造決定した MOR について同様に変異体実験を行い、G タンパク質活性とアレスチン活性に重要な受容体の構造変化を見出した。

A03 班：オピオイドリガンドに対する中枢神経応答システムの生理作用特異的な分解

【目的】

櫻井班 (A03 班) は、薬物刺激に伴う脳内の情報処理を担う神経回路機構を理解するために、複雑な脳システムを作り出しているヘテロな細胞集団の中から行動や生理/薬理反応に関わる特定の細胞群を同定し、その細胞群における情報処理システムを確立することを目的とした。研究開始初期において既存の手法に課題があることが判明したため、(1) CANE システムを改良し、高い特異性と効率を実現するシステムとすること、(2) CANE システムを改良し、薬物によって共通して活性化する神経細胞を一挙に同定することを目指した。

【研究成果】

(1) CANE システムの改良

薬物(中枢神経薬)の生理作用のメカニズムを明らかにするためには、その薬物によって活動する神経細胞を中心とした神経回路、機能、さらには遺伝子発現を明らかにする必要がある。そのための研究アプローチ一つは、薬物によって活性化した神経細胞のみを特異的に標識・操作する方法である。我々は、神経活動依存的な標識・操作法である CANE (Capturing Activated Neural Ensembles) システムを用いることにより、薬物によって活性化した神経細胞を特異的に標識することにした。CANE システムは、神経活動依存的に発現が誘導される Fos 遺伝子の性質を利用した技術であり、Fos の発現依存的にウイルスレセプターである TVA を発現するノックインマウス (FosTVA マウス) と、TVA レセプターに特異的に結合する変異型レンチウイルス (CANE-LV-GeneX) から構成される。CANE システムを用いて特定の薬物によって活性化する神経細胞を標識するためには、まず、FosTVA マウスに薬物を投与し、標的神経細胞を活性化させる。この際、活性化した標的神経細胞では、Fos だけでなく、TVA が発現する。したがって、この標的神経細胞の近傍に CANE-LV-GeneX を微量注入することにより、活性化した神経細胞にのみ CANE-LV-GeneX が感染し、標識することが可能となる。これまでの研究により、標的神経細胞の標識において、その標識の高い特異性 (非特異的な標識が少ない) と高効率 (活性化した神経細胞の多く) の標識を達成するための問題点が浮き彫りになった。その問題点とは以下の 3 点である。1. 純度の高い CANE-LV-GeneX が必要、2. 高力価の CANE-LV-GeneX が必要、3. 非特異的な標識を減少させる。本研究成果においては、これら 3 つの問題点を解消することができた。

1. 純度の高い CANE-LV-GeneX の作製

ウイルス作製の際に混入する煩雑物が多ければ多いほど、ウイルス注入部位の細胞死もしくは非特異的な活性化が引き起こされてしまう。これまでの研究において、煩雑物の多くはウイルス作製の際に用いる血清 (FBS) 由来である可能性があった。そのために CANE-LV-GeneX を作製する際には、低い濃度の血清でも細胞増殖などに影響を与えない細胞培養液に 2% FBS を加えた細胞培養液を用いるようにしていた。これにより、ウイルス作製の際に混入する煩雑物を減少することができたが、できるだけ煩雑物が少ないウイルスを

安定的に作製することができなかった。これは、血清のロットなどの違いによるところが大きいと推察された。そこで、血清 (FBS) 由来の煩雑物をより安定的に減少させるために、これまでは行ってこなかった血清の濾過をおこなった。その際、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターを用いた濾過と $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターを用いた濾過の二段階濾過を行った。その結果、これまでウイルス注入部位で見られたデブリ(おそらくウイルスに含まれていた煩雑物)の減少が認められた。

2. 高力価の CANE-LV-GeneX の作製

これまで高力価の CANE-LV-GeneX を作製するために、低速の遠心を長時間 (6000 G, 18 時間以上) 行ってウイルスを含んだ細胞培養液を濃縮したのちに、沈殿したウイルスを PBS で再懸濁し、さらに遠心濃縮チューブで濃縮していた。この方法で高力価のウイルスを作製することができたが、安定的に高力価のウイルスを作製することが困難であった。これまでに報告されているウイルスの作製方法を参考に、試薬、トランスフェクション方法を変更したが、いずれの場合でも高力価のウイルスを安定的に作製することはできなかった。しかし、遠心濃縮チューブを不動化することにより、これまで安定して作製できなかったウイルスを作製できるようになった。つまり、CANE-LV は遠心濃縮チューブの限外ろ過膜に吸着しやすい性質を持っていた可能性が考えられた。なお、不動化の際には 1% BSA を用いた。

3. 非特異的な標識の減少

前述のように CANE システムで活性化した神経細胞を標識するためには、標的脳領域にウイルスを微量注入する必要がある。その際、脳の傷害を極力減らすために、微細ガラスピペットを用いてウイルスを注入する。これまでの研究において、この微細ガラスピペットが通った標的脳領域までの経路や標的脳領域において、刺激非依存的な標識を認めることがあった。つまり、非特異的な標識である。この非特異的な標識が認められる場合と、認められない場合があったが、その原因はわからなかった。可能性の一つとしては、微細ガラスピペット挿入によって傷害が引き起こされた神経細胞が活性化した (Fos を発現した) 可能性が考えられた。しかし、非特異的な標識が認められる場合と認められない場合があったことから、傷害依存的な非特異的な標識の可能性は低いのではないかと考えた。その他の原因としては、ウイルス注入の際の **craniotomy** の際に認められる体液もしくは血液が微細ガラスピペットをつたわって脳内に流入し、神経細胞の非特異的な活性化を引き起こしている可能性が考えられた。そこで、体液や血液の流入を極力防ぐために、**craniotomy** を行った脳の表面に滅菌吸収性ゼラチンスポンジを貼付し、滲出する血液や体液を吸収させ固着した。その結果、非特異的なウイルス感染が劇的に減少した。したがって、これまで認められた非特異的な標識は傷害依存的よりも、**craniotomy** を行った脳表面の体液もしくは血液が流入したことによる可能性が示唆された。上記の 1~3 によって CANE システムを改良した。改良した CANE システムを検証するために、一般麻酔 (イソフルラン曝露) によって活性化する視床下部の一部の神経細胞群の標識を試みた。その結果、非特異的な標識はほと

んど認められず、一般麻酔で活性化した神経細胞を特異的かつ高効率で標識することができた。

(2) CANE システムの改変

前述のように薬物(中枢神経薬)の生理作用のメカニズムを明らかにするためには、標的となる神経細胞を中心とした神経回路、機能さらには遺伝子発現の解析が必要である。そのためには、標的神経細胞を特異的に標識する必要がある。マーカー遺伝子依存的な標識法は、神経科学の研究手法において現在でも非常に有用な手法である。しかし、ヘテロな細胞集団において、特定の行動に関わる細胞群のみに発現しているマーカー遺伝子は非常にまれである。しかし、二種類のマーカー遺伝子が共発現している細胞群を捉えることができれば、ヘテロな細胞集団の中からより特定の細胞群のみを標識することが可能となる。我々を含めた研究グループはこれまでに、二種類の異なる遺伝子が共発現する細胞群を特異的に捉えるシステムとして、シアノバクテリアで発見されたペプチドである *intein* を介したタンパク質スプライシング (Evans *et al.*, *J Biol Chem*, 2000) を利用した、*split-intein-split-Cre* システムを開発した (Wang *et al.*, *Sci. Rep.*, 2012)。この *split-intein-split-Cre* システムは、*intein* ペプチドのトランス-プロテイン-スプライシング作用を利用することにより、N 末側と C 末側に二分割した *Cre* リコンビナーゼが非常に効率よく再結合して機能的な *Cre* リコンビナーゼとして機能する。例えば、*CreN-inteinN* と *inteinC-CreC* をそれぞれ異なる遺伝子の制御化で発現させることにより、これらの遺伝子が共発現する細胞のみで *Cre* リコンビナーゼが機能する。*split-intein-split-Cre* システムは標的とする細胞群で発現している遺伝子が既知のものであれば、非常に強力なツールとなる。しかし、遺伝子発現を網羅的に解析し、共発現するマーカー遺伝子を探索する必要がある。作用機序が異なるが、その表現型(生理作用)が同一の 2 種類の薬物がある場合、その生理作用に関わる神経細胞は同一である可能性が考えられる。したがって、2 種類の異なる薬物によって共通して活性化する神経細胞を同定し、その神経細胞を中心とした神経回路、機能、遺伝子発現を解析することによって、その薬物作用の中心的な役割を担う神経システムを明らかにすることが期待できる。そのためには、2 種類の異なる薬物によって共通して活性化する神経細胞を特異的に標識する必要がある。そのために、我々は、CANE システムと *split-intein-split-Cre* システムを融合し、*Split-CANE* システムの開発を試みた。まず、*CANE-LV-CreN* と *CAN-L-CreC* を作製し、TVA および *Cre* 依存的にレポーター遺伝子である *mCherry* が発現する HEK293 細胞に感染させた。その結果、*CANE-LV-CreN*、*CANE-LV-CreC* を単独で感染させた場合には *mCherry* の発現は認められなかった。しかし、*CANE-LV-CreN* と *CANE-LV-CreC* を共感染させた細胞では *mCherry* の発現が認められた。このことから、*Split-CANE* システムは *in vitro* の実験系では機能することが確認できた。次に *Split-CANE* システムが *in vivo* の実験系でも機能するかを検証した。その際、2 種類の異なる刺激 X と Y で共通して活性化する脳領域である視床下核 (PVT) を標的とした。まず、刺激 X を与えた後に PVT に *CANE-LV-CreN* を微量注入した。これより、刺激 X で活性化した PVT の神経細胞に

CANE-LV-CreN が感染し、CreN が発現する。2-3 週間、マウスの回復を待った後に、同一のマウスに刺激 Y を与え、PVT に CANE-LV-CreC を微量注入した。これにより、刺激 Y で活性化した PVT の神経細胞に CANE-LV-CreC が感染し、CreC が発現する。刺激 X と Y で共通して活性化した PVT の神経細胞では、CreN と CreC が共発現し、Cre リコンビナーゼが機能する。共通して活性化した神経細胞を可視化するために、Cre 依存的にレポーター遺伝子である mCherry が発現するアデノ随伴ウイルスを共注入している。その結果、刺激 X と Y で共通して活性化した神経細胞で mCherry の発現が認められた。脳は外部からの多様な刺激と内部状態を絶えず統合し、認識、意思決定、学習、記憶などの高次機能を実現する複雑な情報処理機構を持っている。この情報統合のプロセスの解明は、脳の動作原理を理解する上での中心的課題であり、特定の神経細胞が異なる情報源からの入力をどのように統合し、適応的な行動や意思決定を支えているのかの理解は、新しい治療法の開発に繋がる可能性を秘めている。異なる刺激に対して共通して活性化し、複数の情報源からの入力を統合することで、特定の反応や行動を誘導する神経細胞は、脳の情報処理における「統合の枢軸」として機能し、脳の高次機能において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。したがって、そのような特定の神経細胞の機能や神経回路、さらには遺伝子発現の解析において、Split-Cre システムは強力な研究ツールとなることが期待できる。

A04 班：モルヒナン骨格を基盤とした三次元的フォーカスライブラリーの構築

【目的】

齊藤班 (A04 班) は、GPCR の生理作用に紐付くリガンドおよび受容体の構造因子を明らかとし、副作用の減弱した新たな薬物を設計することを目的とした。そのために、DOR, KOR をモデル系として設定し、(1) モルヒナン骨格の有機合成化学的な構造変換により多様なリガンド群を構築し、既知リガンドも含め各班に供給すること、(2) 合成したリガンドを *in vitro* (井上, A02 班) および *in vivo* (齊藤, A04 班) で評価し、細胞内シグナル-個体作用が紐付いた情報を収集すること、その情報と共にリガンドを構造解析 (寿野, A01 班) および神経回路検討 (櫻井, A03 班) に展開し、(3) オピオイド受容体が引き起こす作用に対して支配的な構造-シグナル-神経の多次元情報を取得することを目指した。

【研究成果】

(1) 各種誘導体の化学合成

KOR 作動薬 YNT-1612 の誘導体として、4,5-エポキシモルヒナン骨格上方へ置換基を配向させるための足掛かりとなるビシクロ[2.2.2]オクテン骨格をビシクロ[2.2.2]オクタン、オキサビシクロ[2.2.2]オクタン、アザビシクロ[2.2.2]オクタン骨格へと変換した誘導体を設計し、合成した。市販のナルトレキソン塩酸塩を出発原料とし、3 工程でテバイン誘導体を得た後、Diels-Alder 反応、エノールトリフレート化、Pd 触媒的カルボニル化反応によりビシクロ[2.2.2]オクテン骨格 A を構築し、その後誘導化することで 6 種類のビシクロ[2.2.2]オクテン

誘導体を得た。ビスクロ[2.2.2]オクテンに対して水素添加反応を行うと、アミド基が β 配向した誘導体のみ得られ、一方テバイン誘導体に対してアクリル酸エチルを Diels-Alder 反応により連結するとアミド基が α 配向した誘導体のみが得られ、誘導化により計 12 種類のビスクロ[2.2.2]オクタン誘導体を得た。また、3-メチルナルトレキソンに対し、塩基性条件下、クロロ酢酸エチルを作用させてエポキシ環を構築後、塩基を作用させることで分子内環化によりオキサビスクロ[2.2.2]オクタン骨格を構築し、その後の変換によりオキサビスクロ[2.2.2]オクタン誘導体 12 種を合成した。最後に、ナルトレキソン塩酸塩より 9 工程で合成した 14-アミノナルトレキソン誘導体に対し、塩基性条件下、クロロ酢酸エチルを作用させることで分子内環化によりアザビスクロ[2.2.2]オクタン骨格を構築し、その後の変換によりアザビスクロ[2.2.2]オクタン誘導体 12 種を合成した。

DOR 作動薬 KNT-127 の誘導体は、モルヒナン骨格水平方向へ置換基を配向させるための足掛かりとなるキノリン環を軸とした誘導体を設計し、合成した。ナルトレキソン塩酸塩を出発原料とし、メチル化、亜鉛還元、Ulmann 反応、アセタール化、Birch 還元によりモルヒナン骨格へと変換した。このものを、Troci を用いる脱シクロプロピルメチル化、還元により、誘導化の共通中間体である N-メチルモルヒナンを合成した。N-メチルモルヒナンより Friedlander キノリン合成により計 12 種の誘導体を合成した。

(2) 各種誘導体の薬理評価

合成した誘導体を用い、井上班の構築した細胞内シグナル解析にて評価することで、構造-シグナル活性相関情報を取得し、活性を示したりガンドについてはマウスを用いた薬理作用を評価することで構造-作用相関情報を取得した。特に興味深い活性を示したりガンドについて抜粋して報告する。

KOR 作動薬 YNT-1612 および YNT-1612 のビスクロ[2.2.2]オクテン骨格をビスクロ[2.2.2]オクタンへと還元することでアミド側鎖の配向を変化させた YNT-1623, YNT-1624 の各種シグナルを、内因性リガンドである Dynorphin A および副作用として鎮静作用を示す Nalfurafine と比較した。その結果、Gai シグナルでは YNT-1612, 1623 はフルアゴニストに近い活性を示し、YNT-1624 は中程度の部分作動活性を示した一方、 β アレスチン 2 シグナルでは YNT-1612, 1623 は非常に弱い部分活性を示すに留まり、YNT-1624 においては β アレスチン 2 シグナルを全く示さなかった。

続いて、このようなアミド側鎖の配向の変化に伴う細胞内シグナルの違いがマウス個体の応答にどのような影響を及ぼすかを調べるために、酢酸ライジング法による鎮痛作用評価およびローターロード法による鎮静作用評価を実施し、Nalfurafine と比較した。その結果、Nalfurafine は鎮痛作用と鎮静作用の間の therapeutic window が狭く、分離比 (鎮静 ED_{50} /鎮痛 ED_{50}) は 3 倍程度であった一方で、YNT-1623 では約 410 倍、YNT-1612 では 850 倍と therapeutic window が拡大された。さらに、YNT-1624 では高用量においても全く鎮静作用を示さなかった。

(3) オピオイド受容体が引き起こす作用に対して支配的な構造-シグナル-神経の多次元情報の取得

これら細胞一単位での一貫した実験結果から、KOR 作動薬が示す副作用 (鎮静作用) は β アレスチン 2 シグナルに関係している可能性が強く示唆された。この違いをもたらす構造的要因については、寿野班 (A01 班) と共に Cryo-EM SPA を用いた構造解析を、また神経回路的な検討は櫻井班 (A03 班) と協力して実施している。