

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02877

研究課題名(和文) In vivo制御を実現する新たなGPCRケモジェネティクス法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel chemogenetic tool for in vivo regulation of the target GPCR

研究代表者

清中 茂樹(Kiyonaka, Shigeki)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：90422980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動物個体で標的細胞の受容体サブタイプを人為的に活性制御するために新しい受容体ケモジェネティクス手法の開発を行った。研究のコンセプトとしては、本来のリガンド結合能を保持したままで人為的な制御能を受容体に付与し、尾静脈・経口投与などで投与可能なリガンドを用いて非侵襲的な手法により受容体サブタイプの活性を制御することである。特に本研究では、代謝型グルタミン酸受容体 mGlu1 を標的にして、薬物動態が既知な化合物を用いた GPCR 活性制御技術の開発を目指した。実際に、野生型と変異体を見分けることができる化合物変異体ペアの創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物で細胞機能を制御するケモジェネティクスは、経口・尾静脈投与で化合物を加える非侵襲的な細胞操作技術であり、標的とする細胞・組織の場所に関係なく適用できる。しかしながら、既存の技術では、細胞のどこかはわからないが、活動電位、Gタンパク質シグナルなどの細胞応答を惹起している状況である。一方、本研究で、mGlu1 を対象として、受容体本来の機能を損なうことなく、人為的な制御能を付与した新たなケモジェネティクス法の開発に成功した。今後、in vivo においても細胞種選択的に mGlu1 を制御する方法として応用展開できると期待される。

研究成果の概要(英文)：I developed a new method for receptor chemogenetics to artificially control the receptor activity in a cell-type specific manner in live animals. My research concept is to give artificial control ability to the receptor without affecting the original ligand binding properties using the designed ligand. In this research, we focused on metabotropic glutamate receptor subtype, mGlu1 to develop a technology for controlling GPCR activity using the drug whose pharmacokinetics has been characterized well. In fact, we succeeded in developing a compound which can discriminate wild-type and the mGlu1 mutant.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケモジェネティクス GPCR 代謝型グルタミン酸受容体 細胞操作

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケミカルバイオロジー研究の重要な方向性の1つは、特定の細胞機能に化学的な摂動を与えて動物個体で解析することである。その代表例が、チャンネルロドプシンを用いたオプトジェネティクスである。この手法では、標的の神経細胞にチャンネルロドプシンを発現させた後の光照射により高次脳機能を *in vivo* 制御できるが、光ファイバーを組織に埋め込む侵襲性や光が届かない組織深部には適用できないなどの問題点も存在する。それを克服する方法として、受容体ケモジェネティクスが挙げられる。化合物で細胞機能を制御するケモジェネティクスは、経口・尾静脈投与で化合物を加える非侵襲的な方法論であり、標的とする細胞・組織の場所に関係なく適用できる。実際に、GPCR やイオンチャンネルを人為的に制御する方法が世界中で活発に開発されている。光制御に比べると化合物制御の時間分解能の低さが問題点として挙げられるものの、*in vivo* 制御技術として非常に有用である。

上記の既存技術は *in vivo* 制御法として非常に有用であるが、大きな問題点が存在する。それは、発現させる人工タンパク質の局在を制御できないことである。細胞膜受容体は、神経のプレシナプス、ポストシナプスなど、各受容体サブタイプに特異的に結合する足場タンパク質や輸送タンパク質の存在により、その発現場所は厳密に制御されている。しかしながら、従来法はこの点を全く考慮していない。すなわち、既存の技術では、細胞のどこかはわからないが、活動電位、G タンパク質シグナルなどの細胞応答を惹起している状況である。

このような背景の下、我々は、受容体本来の機能を損なうことなく、人為的な制御能を付与した新たなケモジェネティクス法の開発を進めている。これまでに、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体のケモジェネティクス制御を報告した(Kiyonaka et al, *Nat. Chem.* 2016)。この方法では、リガンド結合時に起こる受容体の構造変化に着目し、その構造変化をヒスチジン変異導入と金属錯体の配位によって引き起こすことを着想した。「配位ケモジェネティクス」と名付けたこの手法では、本来のグルタミン酸結合能にほとんど影響せずに新たな金属錯体応答性を付与できた。さらに、本手法を代謝型グルタミン酸受容体 mGlu1 に適用した。mGlu1 に変異導入したノックインマウスを作成し、その脳組織(小脳スライス切片)を用いることで、運動記憶のメカニズムとも言える小脳シナプス可塑性を金属錯体で引き起こすことに成功している(Ojima et al, *Nat. Commun.* 2022)。この「配位ケモジェネティクス」は、同様の構造変化を起こす受容体に対して広く適用できるため、汎用性の高いケモジェネティクス手法と言える。しかしながら、動物個体でのケモジェネティクスへの展開を考えた際には、用いる化合物が金属錯体であるため、毒性や薬剤輸送能の低さが懸念される。そのため、動物個体に適用できる新たな方法論の開発が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、動物個体で標的細胞の受容体サブタイプを人為的に活性制御するために新しい受容体ケモジェネティクス手法の開発を行う。研究のコンセプトとしては、本来のリガンド結合能を保持したままで人為的な制御能を受容体に付与し、尾静脈・経口投与などで投与可能なリガンドを用いて非侵襲的な手法により受容体サブタイプの活性制御を行うことを目指す。本研究では、これまでに進めてきた mGlu1 を標的にして、薬物動態が既知な化合物を用いた GPCR 活性制御技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

In vivo での受容体の活性制御を可能とする新たな化学遺伝学的手法と位置付けられる細胞外ループ工学の開発研究を実践した。GPCR は、3つの細胞外ループ領域(ECL1-3)を有する。細胞外ループは、7回膜貫通(7TM)ドメインの上部に位置し、mGlu1 アステリックリガンドの結合部位の近傍に存在する。本研究では、これら細胞外ループに変異を導入することでアロステリックリガンドに対する親和性を変化させ、変異受容体選択的な活性制御を目指した。

mGlu1 においては、negative allosteric modulator(NAM)として、FITM が報告されている。FITM は、PET プローブ実験から血液脳関門(BBB)を通過できること、動物個体へ経口投与が可能であることが報告されている。また、mGlu1 との共結晶構造から、2番目の細胞外ループ(ECL2)と FITM が相互作用することがわかっている。グルタミン酸結合部位は、細胞外の大きなリガンド結合部位であるため、この部分(ECL2)に変異を加えても mGlu1 の機能は大きく変わらないことが予測される。これらの知見を基に、ECL2 に変異を加えた変異型 mGlu1 選択的に FITM の親和性を変化させることを目指した。

4. 研究成果

我々は受容体の機能を保ったまま変異体選択的な制御を目指しているため、変異型 mGlu1 が内在のリガンドであるグルタミン酸に対して野生型と同等の応答を示す必要がある。そこで、mGlu1 の細胞外ループにアミノ酸を置換し、グルタミン酸応答を評価した。変異導入箇所は、GPCR の中で広く保存され、ECL2 内のシステイン残基の C 末端側を選択した。このシステイン残基は膜貫通ドメイン 3(TM3)とジスルフィド結合を作っており、その周辺アミノ酸は変異導入

による受容体の構造変化が抑えられていると考えられる。実際に Ca^{2+} イメージングにより変異体の活性を評価したところ、ジスルフィドの直後に3つの連続するアミノ酸変異を導入した W3, Y3, R3, G3, A3, D3 のすべての変異体で野生型と同等のグルタミン酸応答を得ることができた。すなわち、mGlu1 の ECL2 に変異を加えても受容体としての機能を保ち、細胞外ループ工学の利用が可能であることが示唆された。

次に、これら mGlu1 変異体に対して FITM を処置した時の Ca^{2+} を比較した。野生型および G3 変異体が 10 nM FITM で阻害されたのに対して、D3, R3, Y3, 変異体においては、100 nM と高濃度の FITM を加えることで阻害された。W3 変異体においては、その活性を阻害するにはさらに高濃度の FITM であった。そこで、W3 変異体に関して、最も立体障害に寄与していると考えられるアミノ酸を特定するために、W2、および W1 変異体 (N747W/T748W、T748W/S749W、N747W/S749W、N747W、T748W、S749W) を評価した。2 変異体および 1 変異体においても FITM の親和性が低下することが確認された。特に、748 番目のスレオニン残基を置換した 748W を持つ変異体である 747W748W、748W749W、748W で FITM の親和性を低下させることが確認され、748W が立体障害に最も寄与していることが分かった。受容体への摂動を最小限に抑えるために、点変異のみで親和性を変えられるが期待される T748W を用いることにした。

mGlu1 T748W 変異により FITM の親和性を低下させることができることはわかったが、*in vivo* への適用を考えるとその変化量は不十分であった。そこで、FITM 側にも立体障害を加えることとした。FITM のイソプロピル基の代わりにアダマンチル基に置換した化合物 1 においては、期待した通り、WT mGlu1 を阻害したが、T748W 変異体を阻害しなかった。この結果は、当初期待した通り、立体障害の大きいアダマンチル基が 748 番目に置換したトリプトファン残基に対して立体反発が生じたためだと考えられる。しかし、化合物 1 の構造は FITM と比べてかなり異なり、既知である FITM の薬物動態を反映していないことが懸念される。そこで、より FITM と近い構造の化合物を探索することとした。

複数の化合物を合成して評価した結果、FITM の isopropylamine のアルキル鎖を 1 つ伸ばした化合物 2 は、3 μM で WT mGlu1 を阻害するが、T748W 変異体は阻害しないという望ましい結果が得られた。さらに、化合物 2 は、FITM のアルキル鎖を 1 つずつ伸ばしたのみの変化であるため、薬物動態が既知である FITM の *in vivo* での薬剤動態が利用できるかと期待される。そこで mGlu1 活性阻害の濃度依存性を評価したところ、化合物 2 は、WT mGlu1 に対しては FITM と似た濃度領域で阻害するにも関わらず、T748W 変異体に対しては高濃度領域においてもほとんど阻害しないことを見出した。この結果は、化合物 2 を用いることで、*in vivo* においても野生型 mGlu1 と T748W 変異体を見分けることができることが示唆された。今後、この組み合わせを用いて実際に *in vivo* 実験を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ojima Kento, Kakegawa Wataru, Yamasaki Tokiwa, Miura Yuta, Itoh Masayuki, Michibata Yukiko, Kubota Ryou, Doura Tomohiro, Miura Eriko, Nonaka Hiroshi, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Yuzaki Michisuke, Hamachi Itaru, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 13
2. 論文標題 Coordination chemogenetics for activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30828-0	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 Miura Yuta, Senoo Akinobu, Doura Tomohiro, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 3
2. 論文標題 Chemogenetics of cell surface receptors: beyond genetic and pharmacological approaches	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 269 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cb00195g	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 Senoo Akinobu, Yamada Yutaro, Ojima Kento, Doura Tomohiro, Hamachi Itaru, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 9
2. 論文標題 Orthogonal Activation of Metabotropic Glutamate Receptor Using Coordination Chemogenetics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Chemistry	6. 最初と最後の頁 825669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fchem.2021.825669	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 Ojima Kento, Shiraiwa Kazuki, Soga Kyohei, Doura Tomohiro, Takato Mikiko, Komatsu Kazuhiro, Yuzaki Michisuke, Hamachi Itaru, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 12
2. 論文標題 Ligand-directed two-step labeling to quantify neuronal glutamate receptor trafficking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21082-x	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 Tsai Yu-Hsuan, Doura Tomohiro, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 50
2. 論文標題 Tethering-based chemogenetic approaches for the modulation of protein function in live cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Society Reviews	6. 最初と最後の頁 7909 ~ 7923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cs00059d	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

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 清中 茂樹
2. 発表標題 薬理学ツールから創薬を指向した新奇GPCRケモジェネティクス法の開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清中 茂樹
2. 発表標題 脳機能の人為制御を目指した新たなケモジェネティクス法の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏 俊太郎、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 Extracellular Loop-Engineered Chemogenetics (eLEC) [1]: ECL2に着目したドーパミンD1受容体の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡 佑真、杓野 拓光、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 Extracellular Loop-Engineered Chemogenetics (eLEC) [2]: - 相互作用に基づく変異アデノシンA2A受容体の選択的阻害
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴畑 祐貴、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 Extracellular Loop-Engineered Chemogenetics (eLEC) [3]: アロステリックサイトに着目した代謝型グルタミン酸受容体1の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堂浦 智裕、長谷川 寛太、清中 茂樹
2. 発表標題 細胞外ループ工学によるGPCR化学遺伝学(3): アロステリックサイトに着目した代謝型グルタミン酸受容体の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 佑真、杓野 拓光、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 細胞外ループ工学によるGPCR化学遺伝学(2): ECL3に着目したアデノシン受容体の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柏 俊太郎、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 細胞外ループ工学によるGPCR化学遺伝学(1) : ECL2に着目したヒスタミン受容体の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堂浦 智裕、長谷川 寛太、清中 茂樹
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体のin vivo活性制御を指向した新たな化学遺伝学的手法の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川 寛太、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体の細胞外ループに注目した新たな化学遺伝学手法の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 変異型Gタンパク質共役型受容体	発明者 清中茂樹、堂浦智裕、長谷川寛太、柏俊太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-028956	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------