

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05113

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文) Identification of pharmacologically relevant signaling pathways at opioid receptors

研究代表者

井上 飛鳥 (Inoue, Asuka)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：50525813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 25,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、3つの主要なオピオイド受容体サブタイプ(δ 、 κ 、 μ)とそのバイアス型リガンド(特定のシグナル経路を選択的に活性化する作動薬)について、細胞内シグナル伝達の特徴を探索した。オピオイド受容体が直接結合するシグナル因子である3つのトランスデューサー(三量体Gタンパク質、アレステイン、GPCRキナーゼ)について、個々のトランスデューサーのサブタイプの活性化を計測した。その結果、3つオピオイド受容体に共通するシグナル特性と、個別のシグナル特性を見出した。また、構造研究グループとの共同研究を通じて、バイアス型リガンドがシグナルの偏りを誘導するオピオイド受容体の構造基盤を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オピオイド受容体は鎮痛薬の重要な標的タンパク質であるが、副作用の機序は不明な点が多い。本研究を通じて、オピオイド受容体は、多様な細胞内シグナル伝達経路を誘導することを見出した。さらに、特定のシグナル伝達を誘導するバイアス型リガンドがオピオイド受容体を活性化する構造基盤を見出した。これらの研究成果は、薬効と副作用を切り分けたオピオイド受容体作動薬の合理的な開発論の構築に寄与する。

研究成果の概要(英文)：This project explored the intracellular signaling characteristics of the three major opioid receptor subtypes (delta, kappa and mu) and their biased ligands (agonists that selectively activate specific signaling pathways). For three transducers (trimeric G protein, arrestin and GPCR kinase), which are signaling factors to which the opioid receptor directly binds, the activation of individual transducer subtypes was measured. As a result, common and individual signaling properties were found for the three opioid receptors. Through collaboration with the Structural Research Group, the structural basis of the opioid receptors, in which biased ligands induce a bias in signaling, was elucidated.

研究分野：シグナル伝達学

キーワード：GPCR オピオイド

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オピオイド受容体を代表とする G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の研究が進む中で、従来のシグナル伝達モデルでは説明のつかない課題に直面してきた。これまでの典型的なモデルでは、受容体はオンとオフの 2 状態であり、オン状態の受容体は固有のシグナル伝達を介して細胞応答を誘導する。GPCR の下流経路として、G タンパク質経路以外にも β アレスチン経路が存在し、これがオピオイド鎮痛薬の副作用に関与することが示唆されてきた。単純なオンオフ 2 状態ではなく、特定の経路を選択的に活性化する受容体の活性状態が存在することが示され、これを薬理的に誘導するバイアス型リガンドの開発が進んだが、期待に反して副作用の低減には至らなかった。

井上らは独自に開発した網羅的シグナル解析技術を用い、これまでに多くの GPCR について各種シグナル経路を測定してきた。この中で、個々の GPCR が種々のシグナル経路を活性化することができること、リガンドの化学構造の違いによりシグナルプロファイルが大きく変化することを明らかにした。これらの知見は、膜受容体と細胞・個体応答の関係が既存のモデルより遥かに高次元のシグナルバランスの上に成り立っており、副作用も単一のシグナル経路ではなく複数シグナルのバランス崩壊に由来するという新たなモデルが提示される。この複雑なシステムの全体像解明には、分子から個体に至る各階層の網羅的で関連した情報の収集が不可欠と考えられたが、これを可能とする既存技術は存在しなかった。

そこで本研究領域において、オピオイド受容体をモデルとして「生理作用の因数分解」に取り組むべく、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た。

2. 研究の目的

本研究領域の計画班である井上班 (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。計画班との連携として、(1) 齊藤班 (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。

3. 研究の方法

シグナル評価は、NanoBiT assay を用いた。オピオイド受容体やシグナル因子 (G タンパク質、 β アレスチン、GRK など) にそれぞれ NanoLuc 分割ルシフェラーゼの断片である LgBiT または SmBiT を融合させた発現プラスミドを作製した。HEK293 細胞、エフェクター欠損 HEK293 細胞を培養ディッシュに播種し、NanoBiT センサープラスミドをトランスフェクションにより導入した。24 時間培養後、トランスフェクションした HEK293 細胞を培養ディッシュから剥がして、96 ウェルプレートに播種し、NanoBiT 発光基質であるセレンテラジンを添加し、2 時間室温で静置した。その後、発光プレートリーダーでベースライン発光カウントを計測した後に、希釈系列を振ったリガンドを添加し、継時的に発光変化を計測した。一定時間後 (典型的には 5 分後または 10 分後) の発光変化をプロットして、シグモイド曲線から E_{max} や EC_{50} などのパラメーターを算出した。

4. 研究成果

3 つの主要なオピオイド受容体 (δ サブタイプ、 κ サブタイプ、 μ サブタイプ) 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 (δ オピオイド受容体、 μ オピオイド受容体) と Dynorphin (κ オピオイド受容体) 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、 κ オピオイド受容体は、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 末端を未改変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、 δ オピオイド受容体と μ オピオイド受容体に関しては、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 (図 1)。一方、 κ オピオイド受容体については、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。

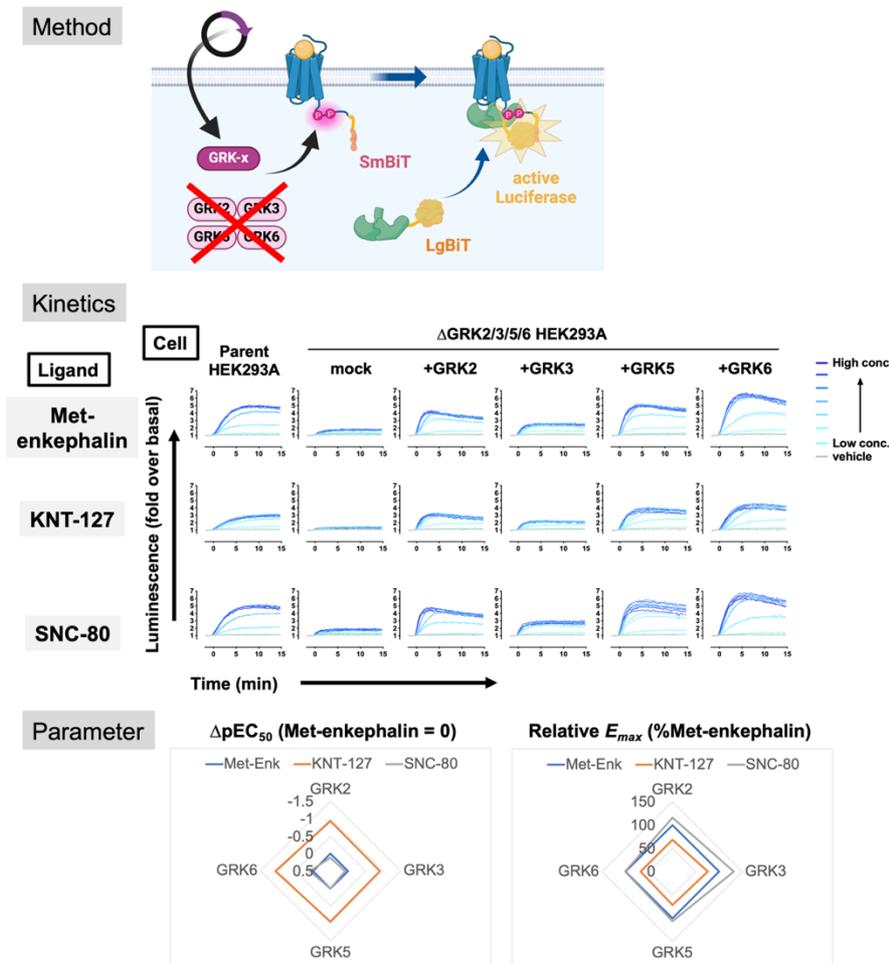


図 1 δ オピオイド受容体の GRK サブタイプ選択性

内因性リガンド Met-enkephalin、斉藤班が合成したバイアス型リガンド KNT-127、バランス型リガンド SNC-80 を用いて、 δ オピオイド受容体の GRK サブタイプ選択性を模式図に示す実験系により解析した。実験結果を、アレスチン会合のカイネティクスと応答曲線から得られたパラメーターをレーダーチャート表示した。その結果、KNT-127 と SNC-80 で GRK サブタイプ選択性はほぼ Met-enkephalin と近い挙動を示したが、KNT-127 においてやや GRK3 を好むことがわかった。

次に、トランスド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、 G_i 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_{ai} 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 G_i サブタイプについて、リガンド刺激による G_{ai} 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 G_i のシグナル活性を評価する手法として、 G_i 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 G_i サブタイプと共に発現させ、フォー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 G_i 欠損 HEK293 細胞では完全に消失し、 G_i 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 (図 2)。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においても 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。

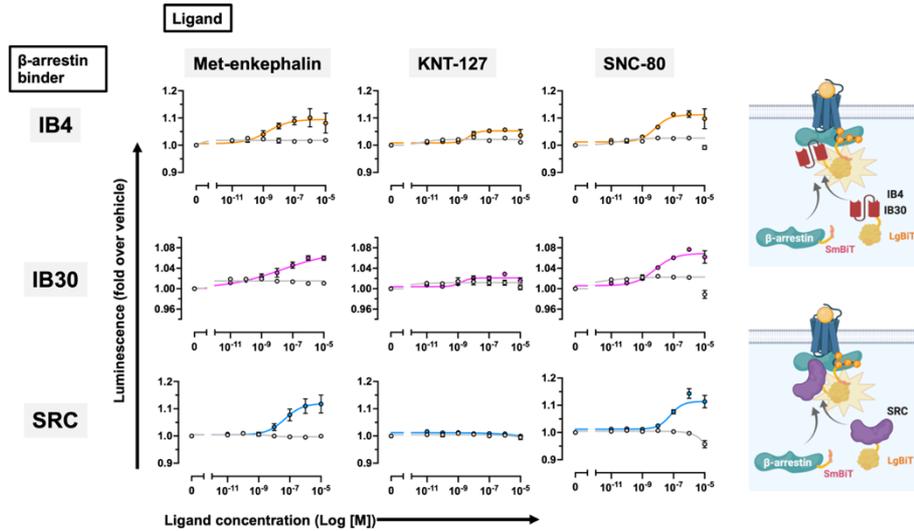


図2 δ オピオイド受容体によるアレスチンの構造変化
内因性リガンドMet-enkephalin、斉藤班が合成したバイアス型リガンドKNT-127、バランス型リガンドSNC-80を用いて、 δ オピオイド受容体によるアレスチンの構造変化作用を、構造認識イントラボディセンサーIB4とIB30およびアレスチンエフェクター分子のSRCを用いて解析した。その結果、SNC-80はMet-enkephalinと同等のアレスチンバインダーの応答を示したが、KNT-127はこれらのアレスチンバインダーの応答はほぼ見られなかった。

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(図3)。

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 δ オピオイド受容体の変異体実験から、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(図4)。別の共同研究先が構造決定した μ オピオイド受容体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(図5)。

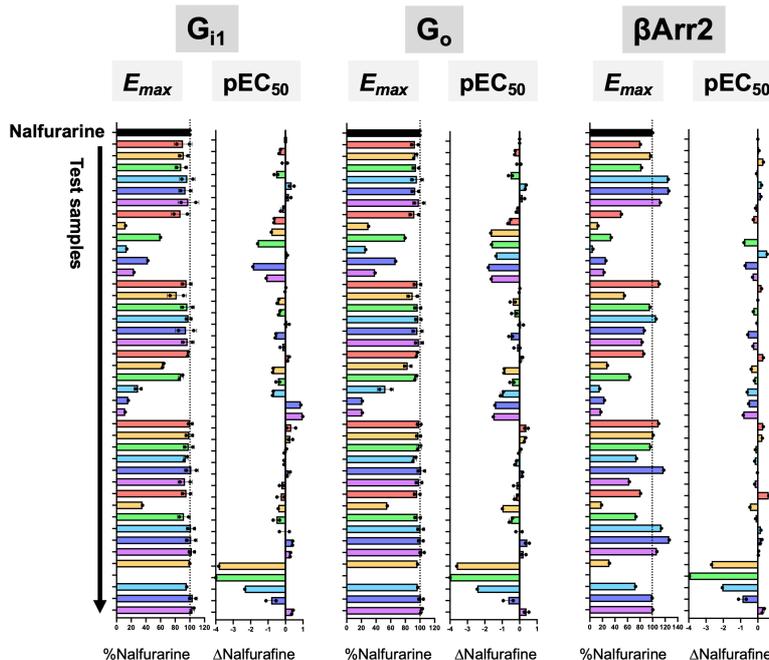


図3 κ オピオイド受容体によるシグナル活性測定
斉藤班が合成した各種ナルフラフィン構造アナログについて、 κ オピオイド受容体のGタンパク質活性(G₁₁とG₀)およびアレスチン活性を測定した。Gタンパク質とアレスチンに対して、フルアゴニスト活性・パーシャルアゴニスト活性、Gタンパク質とアレスチンのバランス活性・バイアス活性を評価でき、これらの活性が化合物の種類によりさまざまであることがわかった。

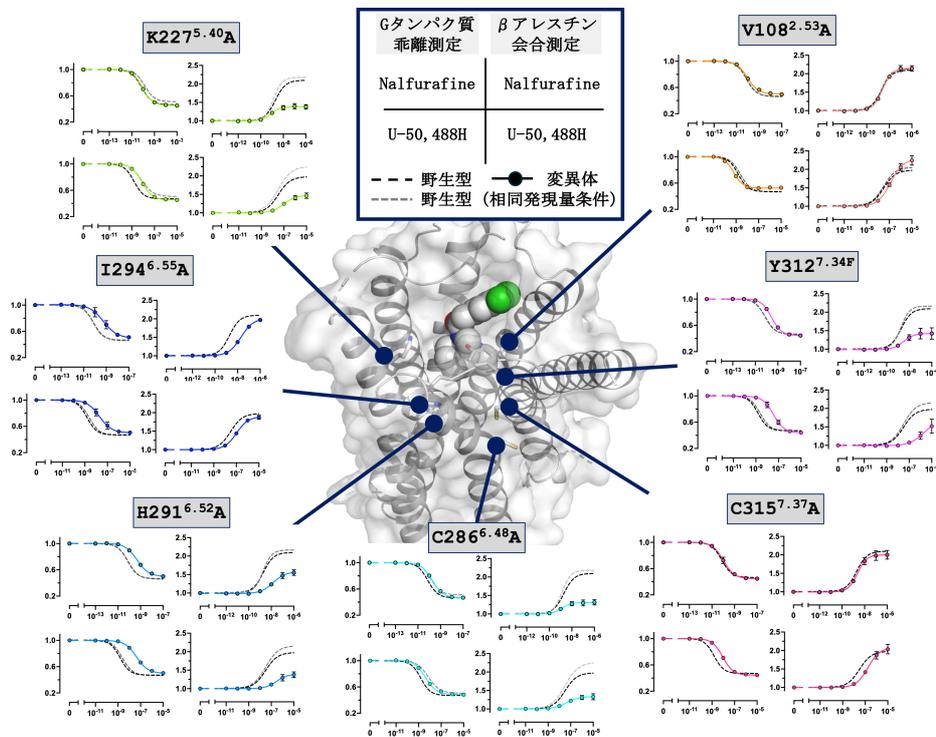


図4 κ オピオイド受容体のバイアス認識の構造基盤

寿野班が構造決定したNalfurafine (バイアス型リガンド) 結合型とU-50,488H (バランス型リガンド) 結合型 κ オピオイド受容体の変異体解析を実施した。 κ オピオイド受容体のリガンドポケット部位を細胞外側から眺めた構造を示した。Nalfurafine (上段) とU-50,488H (下段) に対するGタンパク質活性 (左) と β アレスチン活性 (右) について、変異体ごとにリガンド変化パターンが異なり、これらからバイアス型リガンドの構造基盤を推定した。変異体の括弧内はGPCRの膜貫通部位の相同部位であるBW番号を示す。

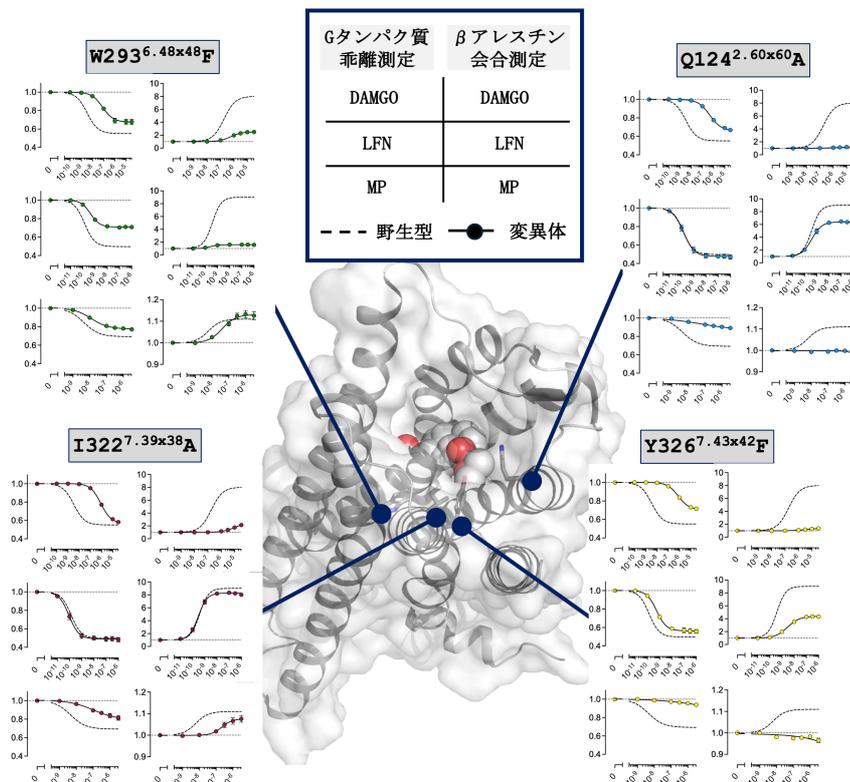


図5 μ オピオイド受容体のバイアス認識の構造基盤

共同研究により構造決定したLFN (アレスチンバイアス型リガンド: PDB ID 7H2H) 結合型とMP (Gタンパク質バイアス型リガンド: PDB ID 7H2G) 結合型 μ オピオイド受容体の変異体解析を実施した。 μ オピオイド受容体のリガンドポケット部位を細胞外側から眺めた構造を示した。バランス型リガンドDAMGO (上段) およびLFN (中段) とMP (下段) に対するGタンパク質活性 (左側) と β アレスチン活性 (右側) について、変異体ごとにリガンド変化パターンが異なり、これらからバイアス型リガンドの構造基盤を推定した。変異体の括弧内はGPCRの膜貫通部位の相同部位であるGeneric BW番号を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計27件（うち査読付論文 27件 / うち国際共著 15件 / うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Shibata Takeaki, Kawakami Kouki, Kawana Hiroki, Aoki Junken, Inoue Asuka	4. 巻 602
2. 論文標題 Phenotypic evaluation of constitutive GPCR/G-protein signaling in zebrafish embryos and larvae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 70 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.02.098	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 -
1. 著者名 Hauser Alexander S, Avet Charlotte, Normand Claire, Mancini Arturo, Inoue Asuka, Bouvier Michel, Gloriam David E	4. 巻 11
2. 論文標題 Common coupling map advances GPCR-G protein selectivity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e74107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.74107	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 Chen Geng, Xu Jun, Inoue Asuka, Schmidt Maximilian F., Bai Chen, Lu Qiuyuan, Gmeiner Peter, Liu Zheng, Du Yang	4. 巻 13
2. 論文標題 Activation and allosteric regulation of the orphan GPR88-Gi1 signaling complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30081-5	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 Nureki Ikko, Kobayashi Kazuhiro, Tanaka Tatsuki, Demura Kanae, Inoue Asuka, Shihoya Wataru, Nureki Osamu	4. 巻 611
2. 論文標題 Cryo-EM structures of the 3 adrenergic receptor bound to solabegron and isoproterenol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 158 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.065	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 -

1. 著者名 El Khamlichi Chayma, Reverchon Flora, Hervouet-Coste Nadege, Robin Elodie, Chopin Nicolas, Deau Emmanuel, Madouri Fahima, Guimpied Cyril, Colas Cyril, Menuet Arnaud, Inoue Asuka, Bojarski Andrzej J., Guillaumet Gerald, Suzenet Franck, Reiter Eric, Morisset-Lopez Severine	4. 巻 119
2. 論文標題 Serodolin, a -arrestin-biased ligand of 5-HT7 receptor, attenuates pain-related behaviors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2118847119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2118847119	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 Dixon Austin D., Inoue Asuka, Robson Scott A., Culhane Kelly J., Trinidad Jonathan C., Sivaramakrishnan Sivaraj, Bumbak Fabian, Ziarek Joshua J.	4. 巻 144
2. 論文標題 Effect of Ligands and Transducers on the Neurotensin Receptor 1 Conformational Ensemble	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 10241 ~ 10250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c00828	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 Matic Marin, Singh Gurdeep, Carli Francesco, De Oliveira Rosa Natalia, Miglionico Pasquale, Magni Lorenzo, Gutkind J Silvio, Russell Robert B, Inoue Asuka, Raimondi Francesco	4. 巻 50
2. 論文標題 PRECOGx: exploring GPCR signaling mechanisms with deep protein representations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 W598 ~ W610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac426	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 Heo Yunseok, Ishimoto Naito, Jeon Ye-Eun, Yun Ji-Hye, Ohki Mio, Anraku Yuki, Sasaki Mina, Kita Shunsuke, Fukuhara Hideo, Ikuta Tatsuya, Kawakami Kouki, Inoue Asuka, Maenaka Katsumi, Tame Jeremy R. H., Lee Weontae, Park Sam-Yong	4. 巻 20
2. 論文標題 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	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3001714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001714	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 Kobayashi Kazuhiro, Kawakami Kouki, Kusakizako Tsukasa, Miyauchi Hirotake, Tomita Atsuhiko, Kobayashi Kan, Shihoya Wataru, Yamashita Keitaro, Nishizawa Tomohiro, Kato Hideaki E., Inoue Asuka, Nureki Osamu	4. 巻 82
2. 論文標題 Endogenous ligand recognition and structural transition of a human PTH receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 3468 ~ 3483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.07.003	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 Baidya Mithu, Chaturvedi Madhu, Dwivedi-Agnihotri Hemlata, Ranjan Ashutosh, Devost Dominic, Namkung Yoon, Stepniewski Tomasz Maciej, Pandey Shubhi, Baruah Minakshi, Panigrahi Bhanupriya, Sarma Parishmita, Yadav Manish K., Maharana Jagannath, Banerjee Ramanuj, Kawakami Kouki, Inoue Asuka, et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Allosteric modulation of GPCR-induced β -arrestin trafficking and signaling by a synthetic intrabody	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32386-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 該当する

1. 著者名 Suno Ryoji, Sugita Yukihiko, Morimoto Kazushi, Takazaki Hiroko, Tsujimoto Hirokazu, Hirose Mika, Suno-Ikeda Chiyo, Nomura Norimichi, Hino Tomoya, Inoue Asuka, Iwasaki Kenji, Kato Takayuki, Iwata So, Kobayashi Takuya	4. 巻 40
2. 論文標題 Structural insights into the G protein selectivity revealed by the human EP3-Gi signaling complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111323 ~ 111323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111323	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 Randolph Clinita E., Dwyer Morgan B., Aumiller Jenna L., Dixon Alethia J., Inoue Asuka, Osei-Owusu Patrick, Wedegaertner Philip B.	4. 巻 298
2. 論文標題 Enhanced membrane binding of oncogenic G protein $q\alpha 209L$ confers resistance to inhibitor YM-254890	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102538 ~ 102538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102538	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 Janetzko John, Kise Ryoji, Barsi-Rhyne Benjamin, Siepe Dirk H., Heydenreich Franziska M., Kawakami Kouki, Masureel Matthieu, Maeda Shoji, Garcia K. Christopher, von Zastrow Mark, Inoue Asuka, Kobilka Brian K.	4. 巻 185
2. 論文標題 Membrane phosphoinositides regulate GPCR- -arrestin complex assembly and dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 4560 ~ 4573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.10.018	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 Tatsumi Manae, Kishi Takayuki, Ishida Satoru, Kawana Hiroki, Uwamizu Akiharu, Ono Yuki, Kawakami Kouki, Aoki Junken, Inoue Asuka	4. 巻 18
2. 論文標題 Ectodomain shedding of EGFR ligands serves as an activation readout for TRP channels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0280448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0280448	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 Xu Jun, Wang Qinggong, Hubner Harald, Hu Yunfei, Niu Xiaogang, Wang Haoqing, Maeda Shoji, Inoue Asuka, Tao Yuyong, Gmeiner Peter, Du Yang, Jin Changwen, Kobilka Brian K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural and dynamic insights into supra-physiological activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35726-z	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 Ono Yuki, Kawakami Kouki, Nakamura Gaku, Ishida Satoru, Aoki Junken, Inoue Asuka	4. 巻 6
2. 論文標題 Generation of G _i knock-out HEK293 cells illuminates G _i -coupling diversity of GPCRs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04465-2	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 Liang Jiale, Inoue Asuka, Ikuta Tatsuya, Xia Ruixue, Wang Na, Kawakami Kouki, Xu Zhenmei, Qian Yu, Zhu Xinyan, Zhang Anqi, Guo Changyou, Huang Zhiwei, He Yuanzheng	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural basis of lysophosphatidylserine receptor GPR174 ligand recognition and activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-36575-0	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 該当する

1. 著者名 Furumura Sho, Ozaki Taro, Sugawara Akihiro, Morishita Yohei, Tsukada Kento, Ikuta Tatsuya, Inoue Asuka, Asai Teigo	4. 巻 86
2. 論文標題 Identification and Functional Characterization of Fungal Chalcone Synthase and Chalcone Isomerase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 398 ~ 405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.2c01027	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 Katayama Kota, Suzuki Kohei, Suno Ryoji, Kise Ryoji, Tsujimoto Hirokazu, Iwata So, Inoue Asuka, Kobayashi Takuya, Kandori Hideki	4. 巻 4
2. 論文標題 Vibrational spectroscopy analysis of ligand efficacy in human M2 muscarinic acetylcholine receptor (M2R)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02836-1	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 -

1. 著者名 Xu Zhenmei, Ikuta Tatsuya, Kawakami Kouki, Kise Ryoji, Qian Yu, Xia Ruixue, Sun Ming-Xia, Zhang Anqi, Guo Changyou, Cai Xue-Hui, Huang Zhiwei, Inoue Asuka, He Yuanzheng	4. 巻 18
2. 論文標題 Structural basis of sphingosine-1-phosphate receptor 1 activation and biased agonism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 281 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-021-00930-3	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 Iio Keita, Kutsumura Noriki, Nagumo Yasuyuki, Saitoh Tsuyoshi, Tokuda Akihisa, Hashimoto Kao, Yamamoto Naoshi, Kise Ryoji, Inoue Asuka, Mizoguchi Hirokazu, Nagase Hiroshi	4. 巻 56
2. 論文標題 Synthesis of unnatural morphinan compounds to induce itch-like behaviors in mice: Towards the development of MRGPRX2 selective ligands	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128485 ~ 128485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.128485	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 -

1. 著者名 Kawakami Kouki, Yanagawa Masataka, Hiratsuka Suzune, Yoshida Misaki, Ono Yuki, Hiroshima Michio, Ueda Masahiro, Aoki Junken, Sako Yasushi, Inoue Asuka	4. 巻 13
2. 論文標題 Heterotrimeric Gq proteins act as a switch for GRK5/6 selectivity underlying -arrestin transducer bias	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28056-7	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 Doi Kosuke, Kawakami Kouki, Ikuta Tatsuya, Inoue Asuka	4. 巻 14
2. 論文標題 A cAMP-biosensor-based assay for measuring plasma arginine-vasopressin levels	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-60035-4	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 Saito Ayaki, Kise Ryoji, Inoue Asuka	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of comprehensive GPCR-transducer-deficient cell lines to dissect complexity of GPCR signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pharmacological Reviews	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/pharmrev.124.001186	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 -

1. 著者名 Kuramoto Ritsuki, Kise Ryoji, Kanno Mayu, Kawakami Kouki, Ikuta Tatsuya, Makita Noriko, Inoue Asuka	4. 巻 19
2. 論文標題 Therapeutic potentials of nonpeptidic V2R agonists for partial cND1-causing V2R mutants	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0303507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0303507	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 Tatsumi Manae, Cruz Christian, Kamakura Nozomi, Kuwabara Riku, Nakamura Gaku, Ikuta Tatsuya, Abrol Ravinder, Inoue Asuka	4. 巻 14
2. 論文標題 Identification of G ₁₂ -vs-G ₁₃ -coupling determinants and development of a G _{12/13} -coupled designer GPCR	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-61506-4	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 Toth Andras Devid, Soltesz-Katona Eszter, Kis Katalin, Guti Viktor, Gilzer Sharon, Prokop Susanne, Boros Roxana, Misak Adam, Balla Andras, Varnai Peter, Turiak Lilla, Acs Andras, Drahos Laszlo, Inoue Asuka, Hunyady Laszlo, Turu Gabor	4. 巻 43
2. 論文標題 ArreSTick motif controls β -arrestin-binding stability and extends phosphorylation-dependent β -arrestin interactions to non-receptor proteins	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 114241 ~ 114241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2024.114241	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

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 倉本律輝、生田達也、川上耕季
2. 発表標題 アレステチンの新規PIP2結合部位
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Asuka Inoue
2. 発表標題 GRK-independent arrestin activation
3. 学会等名 FASEB SRC: The G Protein-coupled Receptor Kinases and Arrestins Conference: Key Modulators of Signal Transduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上飛鳥
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生田達也、井上飛鳥
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第17回 GPCR研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原莉来、川上耕季、倉本律輝、生田達也、井上飛鳥
2. 発表標題 第三の結合様式におけるアレスチンの機能の解明
3. 学会等名 第17回 GPCR研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上耕季、柳川正隆、平塚寿々音、佐甲靖志、井上飛鳥
2. 発表標題 G タンパク質を起点としたGRK- アレスチン機能制御機構
3. 学会等名 第17回 GPCR研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生田達也、井上飛鳥
2. 発表標題 固有振動解析によるGPCRの多様なリガンドポケットの生成
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木璃子、生田達也、川上耕季、井上飛鳥
2. 発表標題 日本人に特徴的なGPCR遺伝子バリエーションの探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Asuka Inoue
2. 発表標題 Non-canonical activation of β -arrestin and G protein
3. 学会等名 GPCR Workshop 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 楽、川上 耕季、生田 達也、井上 飛鳥
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上飛鳥
2. 発表標題 細分化して見えてくるGPCRシグナル原理
3. 学会等名 第17回 GPCR研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学分子細胞生化学分野ホームページ http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/2020/index.html</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
研究分担者	生田 達也 (Tatsuya Ikuta) (80894815)	東北大学・薬学研究科・助教 (11301)	

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