公開

研 究 終 了 報 告 書

「タンパク工学を基点としたオーファン GPCR の機能解明」

研究期間： 2021 年 10 月～2024 年 3 月
研 究 者： 横山 達士

1. 研究のねらい

脳内に発現するオーファン GPCR（G タンパク質共役受容体）は、創薬標的としてその機能解明が期待されている。しかし、オーファン GPCR の活性が、脳内情報処理にどのような影響を与えるのか、その動的な側面はこれまで全く解明されていない。この理由として、オーファン GPCR の活性操作や、生体内で GPCR 活性を高い時空間分解能で観測する手法に乏しいという技術的課題があった。

本研究では、新規開発した超高感度 cAMP センサー「cAMPinG1」を応用し、Gs タンパク質共役型 GPCR の *in vivo* 活性観測手法を開発する。cAMPinG1 をマウス脳に発現させ、二光子励起顕微鏡やファイバーフォトメトリー法により、*in vivo* cAMP イメージングを行う。また、cAMPinG1 を用いたハイスループット化合物スクリーニング系を構築し、オーファン GPCR の agonist を探索する原理を確立する。オーファンGPCRの agonist をマウス脳に投与することで受容体活性を *in vivo* で操作し、同時に下流の cAMP 動態や神経活動を cAMP センサーと Ca^{2+}センサーを用いて *in vivo* で観測することで、脳内情報処理におけるオーファン GPCR の動的な役割を解明することを目指す。

2. 研究成果

（1）概要

本 ACT-X 研究では、蛍光 cAMP センサーである「cAMPinG1」を開発し、マウス脳において cAMP の上流シグナルである Ca^{2+}や GPCR（G タンパク質共役受容体）と cAMP との関係を可視化した[成果論文 1]。まず本研究では、cAMP センサーを合理的に de novo デザインし、更に GFP ドメインのアミノ酸配列を変化させた約 250 種類のコンストラクトをスクリーニングすることで、高親和性（Kd = 180 nM）かつ高い蛍光変化率を持つ cAMPinG1 を開発した[Fig.1A] [特許 1]。更に、世界最高性能の赤色 Ca^{2+}センサーである RCaMP3 の開発にも成功した。これらの応用として、cAMPinG1（緑色）と RCaMP3（赤色）を大脳皮質視覚野に発現させ、2 色同時イメージングに

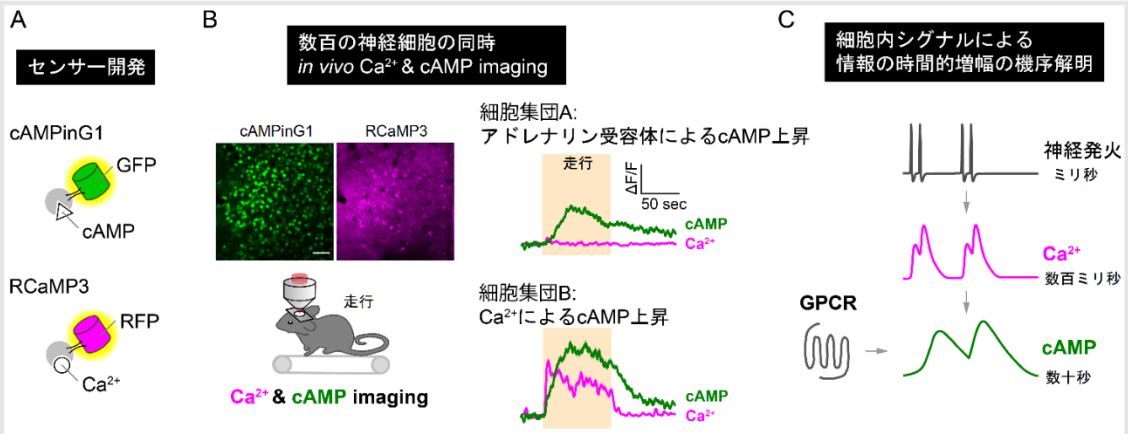

Fig.1 ACT-Xで得られた研究成果

公開

より数百の細胞に対して *in vivo* Ca^{2+} & cAMP イメージングに成功した[Fig.1B]。マウスへの走行刺激により、Ca^{2+}非依存的 cAMP 上昇を示す細胞集団 A と、Ca^{2+}上昇に後続する cAMP 上昇を示す細胞集団 B が観察された[Fig.1B]。また、阻害薬投与実験により、細胞集団 A の cAMP 上昇はノルアドレナリンとアドレナリン受容体（GPCR のーつ）に依存していることを解明した。以上より、神経細胞において、発火と Ca^{2+}シグナルがもつ情報と、GPCR シグナルが持つ情報は、cAMP シグナルとして統合され、数十秒の単位で細胞内に貯蔵されることを世界で初めて可視化した[Fig.1C]。

（2）詳細

【研究テーマ A：cAMPinG1 と RCaMP3 の開発と特徴づけ】

まず本研究では、GFP を基とした緑色 cAMP センサーを合理的に de novo デザインし、更に GFP ドメインのアミノ酸配列を変化させた約 250 種類のコンストラクトをスクリーニングすることで、cAMPinG1 を開発した。*In vitro* において cAMPinG1 は、既存の緑色 cAMP センサーである gCarvi や G-Flamp1 などに比べて、最も高い cAMP 親和性（Kd = 180 nM）と、最も高い蛍光変化率（ΔF/F0 = 1000 %）を持つことを、直接比較から示すことができた。

cAMPinG1 の特徴づけとして、既存の cAMP センサーの中で最も高性能であった G-Flamp1 を、cAMPinG1 と *in vivo* で直接比較した。子宮内電気穿孔法や AAV ベクターを用いて、cAMPinG1 か G-Flamp1 をマウス大脳の一次視覚野第 2/3 層神経細胞に発現させた。約 4 週後に、頭蓋骨を切除し、ガラス窓とヘッドプレートを取り付けた。二光子励起顕微鏡の下にマウスを固定し、二光子イメージングを行った。嫌悪刺激や強制運動に対して、cAMPinG1 は G-Flamp1 より高い蛍光変化率を示し、その性能の優位性を示すことができた。

cAMP の上流シグナルである Ca^{2+}シグナルを *in vivo* で可視化することで、cAMP 動態とその分子機序を解明するため、緑色 cAMP センサーである cAMPinG1 と赤色 Ca^{2+}センサーを併用する必要があった。しかし、既存の赤色 Ca^{2+}センサーの性能は緑色 Ca^{2+}センサーよりも低く、応用可能な実験条件は限定されることが一般に多かった。そこで本研究では、既存の赤色 Ca^{2+}センサーを改良する実験も行った。2011 年に最初の赤色 Ca^{2+}センサーである R-GECO1 が開発されてから、この R-GECO1 をテンプレートとして多数の赤色 Ca^{2+}センサーが開発されてきた。そこで、これまで R-GECO1 の性能を改善すると報告されたアミノ酸変異の中からいくつかを選び組み合わせることで、世界最高性能の赤色 Ca^{2+}センサーを開発し、「RCaMP3」と名付けた。*In vitro* において RCaMP3 は、既存の赤色 Ca^{2+}センサーである jRGECO1a や XCaMP-R に比べて、最も高い蛍光変化率（ΔF/F0 = 2600 %）を持つことを、直接比較から示すことができた。

【研究テーマ B：*in vivo* Ca^{2+} & cAMP イメージング法の確立】

マウス大脳の一次視覚野第 2/3 層神経細胞の cAMP 動態を単一細胞レベルで観察し、更にその cAMP 動態を来す分子機序を明らかにするため、RCaMP3（赤色）と cAMPinG1（緑色）をコードする AAV ベクターを作製し、マウスの一次視覚野に局所投与した。赤色と緑色の 2 色二光子イメージングにより、数百の細胞に対して同時に、*in vivo* Ca^{2+} & cAMP イメージングに成功した。マウスへの走行刺激により、Ca^{2+}非依存的 cAMP 上昇を示す細胞集団 A と、Ca^{2+}上昇に後続する cAMP 上昇を示す細胞集団 B が観察された。また、阻害薬投与実験により、細胞集団 A の cAMP 上昇はノルアドレナリンとアドレナリン受容体（GPCR のーつ）に依存していることを解

公開

明した。また、視覚刺激を用いた実験では、数百ミリ秒間持続する Ca^{2+} event の後に数十秒持続する cAMP event が観察された。チャネルロドプシンを用いて実験により、神経発火と Ca^{2+}が cAMP の上流であるという因果関係を示すことができた。以上より、これまで cAMP は GPCR の下流と解釈されることがほとんどであったが、Ca^{2+}の下流に cAMP があることを *in vivo* で世界で初めて可視化した。よって、発火により表現された情報が、Ca^{2+}シグナル、そして cAMP シグナルとして伝達される過程で数十秒の単位で細胞内に貯蔵されることを示すことができた。

【研究テーマ C：培養細胞の cAMP イメージングによるハイスループット薬剤スクリーニング系の確立】

cAMPinG1 は、488nm 励起では cAMP 結合により蛍光上昇し、405nm 励起では蛍光減少する励起スペクトルの特性をもっていた。培養哺乳類細胞である HEK293 細胞をフォルスコリンにより刺激することで細胞内 cAMP を増加させるタイムラプスイメージングを行った。488nm 励起と 405nm 励起の蛍光強度の比（488/405 比）を計算すると、蛍光変化率が 800%を超え、高い感度をもつと考えられた。

cAMPinG1 をコードしたレンチウイルスを作製し、HEK 細胞に感染させ、高効率で感染した 1 細胞を選択し、シングルクローンから安定発現株を作製した。この cAMPinG1 安定細胞株に対して 88nm 励起と 405nm 励起の蛍光強度の比（488/405 比）を測定したところ、タイムラプスではない単回のスナップショットイメージングであっても、単一細胞レベルで cAMP 濃度を定量することに成功した。またオーファン GPCR である GPR52 を含めた GPCR を cAMPinG1 安定細胞株に発現させ、同様のイメージングを行うことで、各 GPCR の基底活性や、アゴニスト・アンタゴニストによる活性の変化を測定することに成功した。

3. 今後の展開

本研究において *in vivo* で可視化した cAMP 動態が、どのような分子機序に依存するのかを解明することを目指す。例えば、本研究では、二光子 *in vivo* Ca^{2+} & cAMP イメージング法やファイバーフォトメトリー法により、cAMP の上昇や減少を観察し、その一部は Ca^{2+}やノルアドレナリン、アドレナリン受容体がその分子機序となっているかを解明したが[成果論文 1]、それ以外の大部分の cAMP 動態に関しては、分子機序は未解明である。今後は、様々な脳領域や脳機能において、どのような cAMP 動態が観察され、更にその分子機序について解明していく。また、オーファンGPCRの agonist をマウス脳に投与することで受容体活性を *in vivo* で操作し、同時に下流の cAMP 動態や神経活動を *in vivo* Ca^{2+} & cAMP イメージング法やファイバーフォトメトリー法を用いて *in vivo* で観測することで、脳内情報処理におけるオーファン GPCR の動的な役割を解明することを目指す。

更に、本研究で得た、遺伝子にコードされた蛍光センサーの開発に関する知見を活かして、RCaMP3 と cAMPinG1 を改良する。RCaMP3 と cAMPinG1 を更に高感度とすることで、Cre-loxP システムや超小型蛍光顕微鏡での使用など、より高いセンサーの感度が必要とされる実験条件への応用を目指す。

また今後、本研究で確立した培養哺乳類細胞における単一細胞レベルでの cAMP 定量法を、実際のハイスループット薬剤スクリーニング系に応用する。既に確立している cAMPinG1 の HEK 安定細胞株に、標的 GPCR を発現させ、1 千から 1 万種類以上の低分子化合物スクリーニング

を行う。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

本研究では、当初の実験計画の中で最大のボトルネックであり、また最大の新規性であった、単一細胞レベルの *in vivo* cAMP イメージングに成功し、これを論文として報告することができた[成果論文 1]。更に、当初の計画には含まれていなかった RCaMP3 の開発と応用についても成功した。加えて、観察した *in vivo* cAMP 動態の分子機序のいくつかを解明することができた。以上により、総じて本 ACT-X 研究は、当初の予想を大きく超えて良い成果を得ることができたと考えている。

培養細胞を用いたハイスループットスクリーニングについて、その原理を論文として報告することができた[成果論文 1]。ACT-X の研究期間中に RCaMP3 開発の重要性に気づき、この当初予定していなかった RCaMP3 開発実験を優先させたため、当初の計画に含んでいたハイスループットスクリーニングの施行までは遂行することができなかった。しかし、今後のハイスループットスクリーニングに必要な基盤を構築できたと考える。

【研究の進め方】

本研究の実施に必要な備品や試薬の多くを ACT-X からの研究費により購入した。特に、*in vivo* イメージングのための光学系であるファイバーフォトメトリーシステムを新規に購入することで、RCaMP3 や cAMPinG1 の *in vivo* における応用が、二光子励起顕微鏡以外でも可能であることを示すことができた。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

本研究で開発した *in vivo* Ca^{2+} & cAMP イメージング法は、新たな GPCR 研究の手法として、神経科学や分子生物学分野に貢献すると考えている。

本研究で確立したハイスループットスクリーニングの原理は、多くの GPCR にも応用可能であると考えらえる。また、近年、biased agonist や partial agonist への注目も集まっており、本研究で確立する定量性の高いアッセイ系は高い波及効果を期待できる。

5. 主な研究成果リスト

（1）代表的な論文（原著論文）発表

研究期間累積件数： 1件

1. Yokoyama T*, Manita S, Uwamori H, Tajiri M, Imayoshi I, Yagishita S, Murayama M, Kitamura K, Sakamoto M*. A multicolor suite for deciphering population coding in calcium and cAMP *in vivo*, ***Nature Methods***, DIO: 10.1038/s41592-024-02222-9, 2024 年 3 月. *: corresponding author
cAMP は、上流シグナルに Ca^{2+}と GPCR を持つ重要なセカンドメッセンジャーであるが、生体内動態は未知である。生体脳での Ca^{2+}と cAMP の動態を計測するため、本研究では高感度の緑色 cAMP センサー「cAMPinG1」と赤色 Ca^{2+}センサー「RCaMP3」を開発した。Ca^{2+}

公開

と cAMP の 2 色同時二光子イメージングにより、数百個の大脳皮質神経細胞に対して同時に、Ca^{2+}/cAMP 動態を単一細胞レベルで可視化した。アドレナリン受容体により cAMP が上昇することや、Ca^{2+}により表現された視覚情報がその下流である cAMP によっても表現されることを明らかにした。本技術は、GPCR・Ca^{2+}・cAMP 間相互作用の解明に広く貢献することが期待される。

（2）特許出願

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

1. Yokoyama et al., “高感度 cAMP プローブの開発と応用”, NEURO2022（口頭発表）, 沖縄, 2022 年 6 月 30 日.
2. Yokoyama et al., “カルシウムと cAMP による集団符号化の *in vivo* 可視化”, 第 46 回日本神経科学大会（口頭発表）, 宮城, 2023 年 8 月 3 日.