

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07333

研究課題名(和文) GPCRダイマーのシグナル生成モデル：生細胞1分子観察法による検討

研究課題名(英文) Dimerization-induced signal generation of GPCR: Single molecule observation in live cells

研究代表者

笠井 倫志 (Kasai, Rinshi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：20447949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞膜上で動的なダイマーを形成することが明らかになってきたが、一方で、意義や機能、特にシグナル生成との関連は不明であった。GPCRの動的ダイマーの意義を解明するため、細胞内・二色同時・蛍光1分子観察法を用いて研究を行った。その結果、ダイマーが、リガンドに依存せず生じる、GPCRの弱いシグナル、“構成的活性”(GPCRの性質の一つ)の源になっていることが分かった。さらに、ダイマー形成を安定化することで細胞内Caシグナルが誘導されることから、ダイマー形成自体が受容体のシグナル生成を制御し、リガンド刺激と協調してシグナルを生じらしいことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、長年未解明であった、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の一過的なダイマー形成の意義の一端が明らかになった。すなわち、一過的なダイマーを形成することで、リガンド結合に依存しないGPCRの弱いシグナル活性を生じること、ダイマー形成が安定化することで、シグナルを生じること、また、リガンド結合とダイマー形成が組み合わさることでシグナル生成を行うらしいことがはじめて明らかになった。本発見によって、GPCRのシグナル制御に関連する、創薬等に新しい概念がもたらされると考えられる。

研究成果の概要(英文)：G-protein coupled receptors (GPCRs) constitute the largest receptor family. Recently, it has been found that some species of class A-GPCRs form transient dimers in the plasma membrane. However, the function and significance of dimerization of GPCR remain unclear. By employing dual-color single fluorescent-molecule observation technique in live cells, we succeeded in directly observing trimeric G-protein recruitment to both GPCR monomer and dimer at a 30 Hz. We also found that inverse agonists inhibit G-protein recruitment only to dimer, suggesting that the transient dimer generates the constitutive activity of GPCR (a weak signaling activity that does not depend on ligand binding). Moreover, it was also found that dimerization of GPCR itself has a signaling activity because cytosolic calcium concentration was elevated by artificially inducing GPCR dimerization. These results suggest that both dimerization and ligand binding cooperate to generate biological signals in live cells.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞内1分子計測 Gタンパク質共役型受容体 ダイマー形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に属する受容体は、ヒトでは約800種類ほどあることが知られており、創薬の主要な標的分子にもなっている。この20年、会合体形成と機能が盛んに議論されていたが、私を含むいくつかの研究グループによって、GPCRは動的なダイマー・モノマー平衡下にあることが分かってきた。特に私の研究では、GPCRの一つ、フォルミルペプチド受容体を用いて、世界で初めてモノマー・ホモダイマーの平衡(平衡定数、オフレート、オンレート)を決定した。その後、他のGPCRでも、動的なホモ・ヘテロダイマーを形成することを示し、(1)一過的なダイマー形成はGPCRに普遍的な性質の一つであるらしいことを明らかにした。さらに、(2)活性化によって、ダイマー寿命は最大約2倍長くなること、(3)ホモダイマーが、GPCRの特徴であるリガンド非存在下での弱いシグナル活性(構成的活性、恒常的活性、基礎活性とも略)の源であることも分かってきた。これらを基に、リガンド添加後は、一過的ダイマーの長寿命化によって構成的活性が増し、シグナル生成に大きく貢献するという仮説を立てた。しかし、最近私は、リガンド添加後のシグナルは野生型と同等に生じるが、ホモダイマー寿命が変化しない変異体を発見したことから、リガンドシグナル生成において、ダイマーの長寿命化の影響は限定的であることが分かった。即ち、寿命変化だけでは刺激後のシグナル機能を完全には説明できず、ダイマーの機能や意義は、刺激前後で大きく異なる可能性があることが分かった。これは、ダイマー形成とリガンド結合が協同して多様な機能が生じる、という受容体の新しい活性化モデルの構築が必要であることを示唆している。

### 2. 研究の目的

一過的なダイマー形成によってGPCRが生じる構成的活性と、リガンド結合が協同的に組み合わせることで多様な機能が生じる、という作業仮説を検証し、GPCRの活性化機構と、ダイマー形成の制御の仕組みの理解を目指す。特に、リガンド添加後に形成される長寿命ダイマーの生物学的意義を理解することを目指す。

### 3. 研究の方法

細胞内蛍光1分子観察法を用いて、GPCRの一過的なダイマー形成を直接可視化し、ダイマーの生成解離のダイナミクスを調べる。さらに、二色同時蛍光1分子観察も組み合わせ、GPCRヘリクルートしてくる分子がGPCRと結合解離する様子を直接捉え、ダイマーやモノマーに分けて、シグナル分子との分子間相互作用を観察し、結合の時間や頻度を詳しく調べて研究を行う。GPCRの活性化を可視化するイメージングプローブを作製し、ダイマー形成と受容体の活性化の同時可視化を目指す。また、分子操作技術によってダイマー形成を人工的に誘導することで、リガンドシグナルと受容体の活性化の関連を調べる。

### 4. 研究成果

(1) GPCRの一般的な性質として、活性化によって一過的なダイマー形成がやや安定化することが示唆された

細胞内蛍光1分子観察によって、ドーパミンD2受容体や2アドレナリン受容体は細胞膜上で一過的なダイマー形成をするらしいことが分かった。リガンドやアゴニスト添加によって受容体を刺激すると、どちらもダイマー寿命は約50%長くなることが分かったことから、受容体が活性化することで、ダイマーがやや安定化することが分かった。2つのGPCRで共通して見られた現象であるので、こうした性質はGPCRの一般的な性質である可能性が示唆された(引用文献、 )

(2) ダイマー形成したGPCRだけを1分子観察するプローブの作製に成功した

ダイマーを形成するGPCRだけを1分子観察して調べるために、BiFC(Bimolecular Fluorescence Complementation)法によって受容体をラベルした。BiFC法では、まず、YFPなどの蛍光蛋白質を、蛍光性を持たない2つの蛋白質部分、BiFC\_NとBiFC\_Cに分けておき、それぞれ目的のタンパク質にタグとして結合させる。目的のタンパク質同士が結合するなどして、距離が数ナノメートル以下に近づくと、2つの無蛍光の蛋白質部分が蛍光蛋白質として再構成し、蛍光を生じるので、この蛍光を捉えることで目的のタンパク質の相互作用を確かめる方法である(引用文献)。親タンパク質としてYFPを用いると、退色が早いことが分かったので、代わりに、蛍光性タンパク質CoralHueを用いた。

この方法を用いて、β2アドレナリン受容体(β2AR)というGPCRをラベルしたところ、C末にタグを導入した場合にはBiFC由来の蛍光を観察する事ができた。即ち、ダイマーを形成するβ2ARだけをラベルする事に成功した。一方で、N末にBiFCタグを導入した場合には、再構成したBiFC由来の蛍光を捉えられなかったことから、β2ARダイマーは、C末同士が近く、N末同士は離れている可能性が示唆された(投稿準備中)

(3) GPCRの活性化を1分子レベルで直接捉えることに成功した

GPCRの活性化を直接捉えるため、活性化したβ2ARの細胞質部分の構造を認識する抗体様小分子、ナノボディを用いて調べた(Rasmussen, 2011)。ナノボディの分子量は通常のIgG抗体の1/10程度と小さいうえ、得られている結晶構造解析画像から、GPCRにナノボディが結合しても

GPCR の側方に張り出さないためダイマー形成を阻害しないと考えられる。蛍光 1 分子観察によって、 $\beta 2AR$  を発現している細胞では、リガンド刺激後に、蛍光ラベルしたナノボディが細胞質から細胞膜に多くリクルートしてくる様子を捉えることができた。すなわち、GPCR の活性化を 1 分子レベルで直接捉えることに成功した（投稿準備中）。

(4) ダイマーを構成する GPCR は刺激前でもある割合で活性化しているらしいことがわかった  
(1)で開発した GPCR ダイマーの目印である BiFC と、(2)で開発した活性化した受容体を可視化する蛍光ナノボディを、細胞内で二色同時蛍光 1 分子観察を行った。その結果、刺激前であっても、GPCR ダイマーにリクルートしてくるナノボディが観察されたことから、割合は不明であるものの、GPCR ダイマーを構成する分子の一部はリガンド刺激前にすでに活性化していることが分かった。また、リガンド刺激によって、ダイマーにリクルートしてくるナノボディの割合が約 3 倍に増えたことが分かったことから、リガンド刺激後、ダイマーを形成する受容体が実際に活性化したことを直接確認する事もできた。これらの結果は、GPCR の構成的活性がダイマーから生じるとする（引用文献）従来私の研究から得られた結果と矛盾しないことを示している（投稿準備中）。

(5) GPCR を生細胞中で人工的にダイマー化することに成功した  
GPCR を人工的にダイマー化するため、FKBP タグ蛋白質と関連タンパク質、およびそのリガンドを中心に複数の方法を検討した。GPCR の中でタグを導入する場所も(2)を考慮して検討した。はじめに、FKBP/FRB/rapamycin システムを用いた。すなわち、FKBP と FRB は、rapamycin(および rapamycin アナログ)存在下でのみ、1:1 で結合する分子複合体を形成することが知られているため、これを用いて人工的に GPCR をダイマー化することを試みた。FKBP および FRB を GPCR の C 末側に結合させた改変受容体、 $\beta 2AR$ -FKBP と、 $\beta 2AR$ -FRB をそれぞれ作製した。また、これら 2 つの改変受容体を、同じ細胞に効率的に共発現させるためには、2A ペプチドという自己切断型ペプチド配列を介して、一つの発現ベクター中に組み込んだ。これら 2 つの改変受容体を発現した細胞を用いて、rapamycin アナログ添加による人工安定ダイマーの誘導が可能かどうか、蛍光 1 分子観察法を用いて調べた。その結果、野生型 $\beta 2AR$  では観察されなかった、輝点の蛍光強度が二段階に段階的に減少し退色する様子を捉えることができた。これは 2 つの蛍光色素が色素の退色寿命まで離れなかったことを意味しており、野生型のダイマーよりも少なくとも数倍安定なダイマーを人工的に誘導できたことを示している。しかし、発現効率やダイマー生成効率をさらに向上させるため、別の方法も試すことにした。

そこで、次に、変異 FKBP 同士が、リガンド添加によってホモダイマー化する現象を用いることにした。受容体の C 末にタグ蛋白質をラベルした $\beta 2AR$ -FKBP\_F36V を作製し、細胞に発現させた。蛍光 1 分子観察下で、ホモダイマー化リガンド、AP20187 を加えたところ、この方法でも、輝点の蛍光強度が二段階に段階的に減少し退色する、人工的な安定ダイマーの形成を誘導することができた。安定度は、FKBP/FRB/rapamycin で生じたダイマーと大きな違いは見られなかった。以降の研究は FKBP\_F36V/AP20187 を用いることにした。

(6) GPCR の人工なダイマー形成によって、細胞内シグナルを誘導することに成功した  
(4)で作製した、人工ダイマーの形成が誘導可能な GPCR、 $\beta 2AR$ -FKBP\_F36V を発現した細胞にカルシウム指示薬 Fluo4-AM を加え、ダイマー形成によるシグナル生成の有無を調べた。その結果、ダイマー化リガンドを加えると、細胞内のカルシウム濃度が一過的に上昇する様子を捉えることができた。すなわち、GPCR のダイマー化によっても細胞内のシグナルが生成されることが初めて示された（引用文献）。GPCR のダイマー・オリゴマー形成によって細胞内カルシウム動員などのシグナルが生成されることは、抗体を用いた方法で過去にも示されているが（CCR2, Rodríguez-Frade, 1999）今回の研究では先行研究とは異なる GPCR を用いて、厳密にダイマー形成だけを誘導することによってシグナルが生じることが示された。これらの研究から、GPCR のシグナル生成にオリゴマー、特にダイマー形成が共通して関連する可能性が示唆された。

(7) まとめと今後の展望  
本研究の結果、蛍光 1 分子観察によって、2 つの GPCR の一過的なホモダイマー形成を捉えることができた。特に、受容体の活性化に伴って一過的なダイマーがやや安定化することから、ダイマー形成と機能の関連が強く示唆された（引用文献）。過去の文献と併せて考えることで、一過的なダイマー形成や、活性化に伴う一過的なダイマーの安定化は、GPCR の一般的な性質である可能性が示唆された（引用文献、）。また、新規に開発した、活性化した GPCR の構造変化を捉える活性化モニタープローブとダイマーモニタープローブを使って、直接確認することができた。これは、リガンド結合に依存しない GPCR のシグナル活性、構成的活性が GPCR の一過的なダイマーから生じるらしいという、過去の私の研究で得られた知見を支持するが、矛盾しない。また、この際、ダイマー形成する

GPCR では、N 末同士が遠く、C 末同士が近い可能性があるという新しい知見を得た。GPCR のダイマー界面はいくつか報告されているため(O'Dowd 2012; Jastrzebska 2017; Dijkman 2018)、実際の GPCR ダイマー形成は複数の相互作用が組み合わさって複雑に制御されていると考えられる。今後、複数のダイマー界面や相互作用が、どのように用いられ制御されているか解明する必要があると考えられる(投稿準備中)。

次に、GPCR のダイマーの人工的な誘導に世界で初めて成功した。特に、蛍光 1 分子観察で直接確認しながら、人工ダイマー形成を生細胞中で捉えた例はない。この人工ダイマー化技術を用いて、GPCR のダイマー化だけで細胞内にシグナルが生成されることを示すことができた。種の異なる GPCR でもダイマー形成によるシグナル生成が見られることから、ダイマー形成によるシグナル生成は GPCR に共通した機能である可能性も示唆された(引用文献)。

私の過去の研究から、リガンド結合した GPCR は、一過的に形成するダイマーがやや安定化することがわかっていたが、ダイマー形成が安定化することで活性化するのか、活性化することでダイマー形成が安定化するのか、区別できなかった。しかし、本研究では、ダイマー形成を人工的に誘導することでシグナルが生じることが分かったので、ダイマー形成が安定化することで受容体が活性化することが支持されたと考えている。すなわち、リガンドが結合した GPCR は、リガンド結合によるシグナル生成と、ダイマー形成によるシグナルが協調して働くことが分かった。本研究で得られた結果を含め、論文として投稿中である(引用文献)。

また、人工安定ダイマーから生じるシグナルは、GPCR の一過的ダイマーから生じる構成的活性が強められたシグナルとも考えられるので、野生型 GPCR が生じる一過的なダイマー形成は構成的活性が暴走しないよう制御する仕組みである可能性も示唆された。

今後は、リガンド結合によるシグナルとダイマー形成によるシグナルがどのように使い分けられているかを詳しく調べることや、クラス C の GPCR ように安定ダイマーを定常的に形成する GPCR を調べることで、ダイマー形成の意義の普遍性を明らかにする。特に、クラス C の GPCR のような安定ダイマーの性質を調べるためには、長時間蛍光 1 分子観察法を用いることも検討する(引用文献)。

本研究で得られた、生細胞中では、リガンド刺激とダイマー形成が組み合わさることでシグナル生成を行っているらしいという知見は、GPCR の新しいシグナル生成モデルとなる可能性がある。

#### <引用文献>

Kasai, R.S., Fujiwara T.K., and Kusumi, A. (2020). Metastable GPCR dimers trigger the basal signal by recruiting G-proteins. bioRxiv DOI: 10.1101/2020.02.10.929588.

Tsunoyama, T.A., Watanabe, Y., Goto, J., Naito, K., Kasai, R.S., Suzuki, K.G.N., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2018). Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function. *Nat. Chem. Biol.* 14, 497-506.

Kasai, R.S., Ito, S.V., Awane, R.M., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2018). The Class-A GPCR Dopamine D2 Receptor Forms Transient Dimers Stabilized by Agonists: Detection by Single-Molecule Tracking. *Cell. Biochem. Biophys.* 76, 29-37.

Kasai, R.S., Suzuki, K.G., Prossnitz, E.R., Koyama-Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2011). Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J. Cell Biol.* 192, 463-480.

## 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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kusumi Akihiro, Fujiwara Takahiro K., Tsunoyama Taka A., Kasai Rinshi S., Liu An An, Hirosawa Koichiro M., Kinoshita Masanao, Matsumori Nobuaki, Komura Naoko, Ando Hiromune, Suzuki Kenichi G. N.	4. 巻 21
2. 論文標題 Defining raft domains in the plasma membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Traffic	6. 最初と最後の頁 106 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tra.12718	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 Tsunoyama TA, Watanabe Y, Goto J, Naito K, Kasai RS, Suzuki KGN, Fujiwara TK, Kusumi A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 497 ~ 506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-018-0032-5	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 Kasai RS, Ito SV, Awane RM, Fujiwara TK, Kusumi A.	4. 巻 76
2. 論文標題 The Class-A GPCR Dopamine D2 Receptor Forms Transient Dimers Stabilized by Agonists: Detection by Single-Molecule Tracking	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12013-017-0829-y	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 Nemoto YL, Morris, RJ, Hijikata H, Tsunoyama TA, Shibata ACE, Kasai RS, Kusumi A, Fujiwara TK	4. 巻 75
2. 論文標題 Dynamic Meso-Scale Anchorage of GPI-Anchored Receptors in the Plasma Membrane: Prion Protein vs. Thy1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 399 ~ 412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12013-017-0808-3	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 Makino A, ..., Kasai RS (13/31), ..., Kobayashi T, Greimel P, Kobayashi T	4. 巻 31
2. 論文標題 A novel sphingomyelin/cholesterol domain-specific probe reveals the dynamics of the membrane domains during virus release and in Niemann-Pick type C	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1301 ~ 1322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201500075R	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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 笠井倫志
2. 発表標題 蛍光1分子観察法による膜分子の動態観察と機能の解明: G蛋白質共役型受容体の動的なモノマー・ダイマー変換
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会 (2020) コラボレーション企画・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笠井倫志
2. 発表標題 Examining the transiently formed GPCR dimer: An approach by single fluorescent molecule observation in living cells
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会 年回 シンポジウム発表 および ポスター発表
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kasai RS
2. 発表標題 Transient dimer formation of G-protein coupled receptor: single fluorescent molecule imaging in live cells
3. 学会等名 The 3rd Biosignal Research Center International Symposium "Modulation of GPCR signaling by membrane heterogeneity and molecular clustering" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笠井倫志
2. 発表標題 Gタンパク質共役型受容体の動的なダイマー形成：蛍光1分子観察法による解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第184回例会 若手シンポジウム “化学と生物のマリアージュ：若手研究者による生化学研究の新機軸”（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kasai RS, Fujiwara TK, Kusumi A
2. 発表標題 Transient dimers of GPCRs are responsible for triggering GPCRs' basic constitutive signals - A finding by the two-color single fluorescent-molecule tracking in living cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor meeting: Single Biomolecules (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kasai RS
2. 発表標題 Spontaneous activation in a transient GPCR dimer before ligation as revealed by dual-channel single fluorescent molecule imaging
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会 年回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kasai RS, Inoue A, Fujiwara TK, Kusumi A
2. 発表標題 -arrestin independent mechanism is involved in the temporal trapping of diffusing GPCR on cell surface
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会 年回
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----