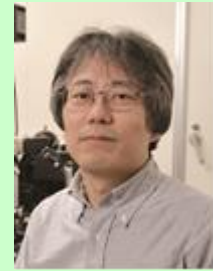


**細胞膜・膜脂質環境動態と共役した受容体機能制御の包括的理解** Comprehensive approach toward understanding cell surface receptor functions coupled with membrane structure and lipid composition

課題番号：19H05647

佐甲 靖志 (SAKO Yasushi)

理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員



研究の概要

本研究ではヒトの主要な膜受容体のほぼ全ての分子種について近傍脂質を含めた機能・構造動態の計測・解析を行い、膜の自己組織化能による機能制御機構を明らかにする。これまでに、EGF 受容体が活性化につれて自己制御的に周辺膜分子を組み替えて機能を変換することや、S1P 受容体のシグナルバイアスを運動状態変化から推定できることなどがわかってきた。

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：受容体、1分子計測、細胞内情報伝達、細胞膜

1. 研究開始当初の背景

細胞と外界を区切る細胞膜は、脂質2重層に膜蛋白質が埋めこまれた構造を持つ。外界からの信号を受け取り、処理して細胞内へ伝える上で重要な役割を果たす膜受容体を始め、膜蛋白質はいずれも膜脂質と相互作用しながら機能している。

細胞膜は2次元の流体であり、そこには数百の脂質分子種が不均一かつ動的に集合状態を変えながら存在している。膜構造や特定脂質との相互作用が膜受容体の機能を制御し、逆に膜受容体は機能発現と共に近傍の脂質・膜環境を変化させていることが予想される。遷移的に変化する膜受容体と膜脂質の相互作用から、細胞膜が動的に自己組織化し、その情報処理機能が生まれてくると考えられるが、全容も具体的詳細も明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、最新の1分子計測法などを用いてヒトの主要な膜受容体である3量体G蛋白質共役型受容体(GPCR)およびチロシンリン酸化酵素型受容体(RTK)の内、嗅覚受容体を除くほぼ全ての分子種について、近傍脂質を含めた機能・構造動態の計測・解析を行い、膜の自己組織化による機能制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

我々は細胞膜上の受容体に蛍光標識を施し、1分子ごとの運動や会合状態、さらに細胞内外の分子との相互作用を可視化計測する方法を開発してきた。1分子計測法は超解

像顕微鏡法による膜の領域構造観察や、精製した膜受容体と脂質で再構成した膜中での分子の構造変化・反応計測にも応用できる。これらの方法を使って研究を進める。

膜受容体蛋白質の中でもGPCRは、ヒトでは嗅覚受容体を除いても約300種類が知られ、最大の遺伝子群である。RTKはそれに次ぐ受容体群で約60種が知られている。本研究では、それらの近傍脂質を含めた動態・機能を比較して、情報伝達経路の分岐や経路間の選択性、異なる受容体間の相互干渉などの分子機構を膜・脂質との動的相互作用という観点から整理し、一般論への到達を目指す。主要な研究項目は以下の4つである。

- ・膜受容体の細胞膜動態の1分子計測
- ・膜脂質と受容体の空間分布の超解像可視化
- ・膜受容体の境界脂質の分析
- ・膜受容体の脂質制御の詳細解析

4. これまでの成果

細胞内における1分子計測法 (Okamoto et al 2019; Yoshizawa et al 2021) や超解像可視化法を整備し、網羅的計測の環境を整えてきた (Yanagawa et al in press)。その過程でいくつかのRTK, GPCRの詳細な計測を行い、興味ある結果を得た。以下に2つの例を挙げる。

[自己制御的な脂質膜環境変化を通じたEGF受容体の機能制御]

EGF受容体(ERBB1)は細胞運命決定に関わるRTKである。RTKは一般にリガンド結合によるチロシンリン酸化酵素活性の亢進とリン酸化した細胞質部位における分子認

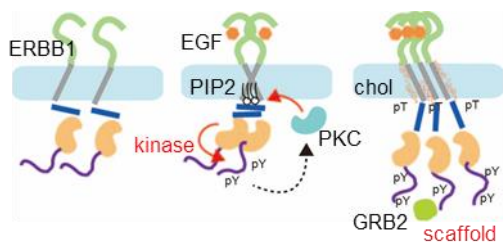
識によって機能するが、酵素機能と分子認識機能の関わりは明らかでない。

我々はナノディスク膜に再構成した ERBB1 の膜貫通・膜近傍領域ペプチドの相互作用を 1 分子計測し、酸性脂質によって安定化される 2 量体構造とコレステロールによって安定化される多量体構造を検出した。両者は異なったペプチド間相互作用を持ち、膜近傍領域のスレオニンリン酸化は多量体構造を安定化する。スレオニンをアラニン置換した全長分子と野生型の機能を比較し、スレオニンリン酸化は ERBB1 のチロシンリン酸化を阻害するが、細胞質分子 GRB2 の認識を促進することを見いだした。生細胞膜での 1 分子計測によれば、スレオニンリン酸化は ERBB1] の高次会合体形成を促進する (Maeda et al in prep)。

一方、細胞膜のコレステロールを減少させると、EGF 添加後の ERBB1 のチロシンリン酸化が促進するにも関わらず、下流反応である MAPK のリン酸化は阻害される。この時、ERBB1 の高次会合体形成も阻害されている (Hiroshima et al in prep)。

さらに PALM/STORM 法による超解像可視化計測によれば、ERBB1 と酸性脂質 PIP<sub>2</sub> の共局在は EGF 添加後に減弱するが、その反応はチロシンリン酸化 ERBB1 を認識して細胞膜へ移行する PIP<sub>2</sub> 分解酵素 PLC $\gamma$  の働きによる。細胞膜の PIP<sub>2</sub> は ERBB1 のチロシンリン酸化に影響しないにも関わらず、下流の ERK 活性化には阻害的である (Abe et al in prep)。

以上三つの研究結果は、EGFR のリン酸化酵素活性上昇が、自己の 2 量体安定化機能を持つ PIP<sub>2</sub> を除去する PLC $\gamma$  と、スレオニンリン酸化をもたらすリン酸化酵素 PKC の両者を呼び寄せることにより、自身の機能を酵素から分子認識へ能動的に変化させることを示唆している (図)。その際、ERBB1 がコレステロールに富む膜ドメインに濃縮しているというよく知られた事実が重要なのであろう。



#### [S1P 受容体の動態とシグナルバイアス]

スフィンゴシン 1 リン酸受容体(S1PR)はリンパ球の走化性や心筋の活動など種々の生理現象を制御する GPCR であり、G 蛋白質と arrestin など、異なった経路を組織特異的に活性化するバイアスアゴニストの開発が試みられている。

我々は S1P を含む 7 種の S1PR アゴニスト添加後の細胞で S1PR の細胞膜上運動を 1 分

子計測し、それぞれのアゴニストに特異的な運動状態の変化を調べた。S1PR は側方拡散係数の異なる 4 つの運動状態を持つ。2 色の同時 1 分子計測により、G 蛋白質との相互作用状態は中間的な運動状態、arrestin との相互作用状態は遅い運動状態を示す。膜蛋白質の拡散運動は膜の脂質組成に依存しており、GPCR においても膜構造と受容体活性の相関が示唆された (Yanagawa et al in prep)。この結果はまた S1PR アゴニストのバイアス活性を受容体の運動状態だけで推定できることを示しており、新しい薬効解析方法として特許申請を行った。

#### 5. 今後の計画

EGFR, S1PR のどちらにおいても、リガンド結合した受容体が、周辺膜環境を動的に組織化しながら情報処理・伝達を行っていることが示されてきた。他の GPCR やイオンチャネルにおいても類似の現象を見つけている。

本研究課題で、網羅的な受容体の 1 分子計測や超解像可視化を行う環境が整備されており、新しい境界脂質分析法も実現しつつある。今後は網羅的な比較解析を行い、受容体の機能制御機構の一般性を明らかにすると同時に、特徴的な受容体について詳細な分子機構解析を行う。

#### 6. これまでの発表論文等

Yanagawa Y, Sako Y. Total workflows of the single-molecule imaging analysis in living cells. a tutorial guidance to the measurement of the drug effects on a GPCR. *Methods Mol Biol* in press.

Yoshizawa R, Umeki N, Yamamoto A, Murata M, Sako Y. 2021. Biphasic spatiotemporal regulation of GRB2 dynamics by p52SHC for transient RAS activation. *Biophys Physicobiol* 18:1-12.

Miyagi H, Hiroshima M, Sako Y. 2020. Cell-to-cell diversification in ERBB-RAS-MAPK signal transduction that produces cell-type specific growth factor responses. *Biosystems* 19:104293 (1-10).

Sato M, Aoki-Saito H, Fukuda H, et al. 2019. Resolvin E3 attenuates allergic airway inflammation via the interleukin-23/interleukin-17A pathway. *FASEB J* 33:12750-12759.

Okamoto K, Hibino K, Sako Y. 2019. In-cell single-molecule FRET measurements reveal three conformational state changes in RAF protein. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1864:129358 (1-9).

G タンパク質共役型受容体(GPCR)の解析方法 特願 2019-152455

#### 7. ホームページ等

<http://www2.riken.jp/cell-info/>