

機関番号： 63905

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008 ~ 2010

課題番号： 20590224

研究課題名 (和文) 一分子観察による G 蛋白質活性化過程の定量的解析

研究課題名 (英文) Quantitative analyses of G protein activation by the single molecule imaging

研究代表者

立山 充博 (TATEYAMA MICHIMIRO)

生理学研究所・分子生理研究系・准教授

研究者番号： 30276472

研究成果の概要 (和文) : 細胞間シグナル伝達に重要な役割を担う G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) のシグナリング初期過程について FRET 解析を行った。GPCR および G 蛋白質各サブユニットに蛍光蛋白質を付加し、細胞膜上で起こる反応を記録したところ、ロドプシン型に分類される Gq 共役型受容体については、リガンド結合による活性化、GPCR と G 蛋白質と共役および G 蛋白質の活性化について、それぞれ FRET 変化としてとらえることに成功した。

研究成果の概要 (英文) : G protein coupled receptors (GPCR) play important roles in the inter-cellular signaling and their initial signaling processes were investigated by FRET. FRET values between the fluorescent proteins tethered to the receptors and subunits of GPCRs were measured in living cells. As for the family A Gq coupled receptors, agonist-induced receptor activation, the coupling between receptor and G proteins and the activation of G proteins were detected as ligand-induced FRET changes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：分子・細胞生理学、FRET

## 1. 研究開始当初の背景

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、重要なシグナル伝達分子の一つである。一般的に、GPCR は特定の G protein を活性化し細胞内へ情報を伝達する。これに対し、代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) は、発現環境に依存して複数の G 蛋白質 (Gs、Gq、Gi/o) と共役し複数のシグナル伝達経路を活性化することが知られていた。研究代表者は細胞内カルシウム濃度変動・細胞内 cAMP 濃度変動・Gi 依存性カリウム電流などの記録により mGluR1 の多様なシグナ

ル伝達を確認し、さらに、その制御因子を見出していた。複雑な GPCR のシグナル伝達様式を解明するために、受容体と各種 G protein との相互作用を直接的に捉え、定量的に解析する新たな手法が求められていた。

## 2. 研究の目的

mGluR1 と各 G 蛋白質との機能的相互作用を一分子観察により可視化し、結合親和性について定量的解析を行うことが、本研究の目的であった。

### 3. 研究の方法

mGluR1 と各 G 蛋白質を蛍光蛋白質・蛍光物質にて標識し、全反射照明下にてそれぞれの挙動を同時記録する。二種類の膜蛋白が、同一点に比較的長く共局在することを2分子の結合と定義して、2分子の会合・解離について解析を行う。そのためには、蛍光標識受容体や蛍光標識 G protein がそれぞれ機能的に会合しなければならない。そこで、まず、細胞膜レベルでの FRET 解析を先に行い、標識蛋白質の機能的会合について調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) mGluR1 と G protein の FRET 実験

mGluR1 の細胞内領域に蛍光蛋白質(FP)を付加したコンストラクトは有しており、その機能的特徴も把握していた。そこで、新たに、各 G 蛋白質サブユニットに FP を付加したコンストラクト (Gαq-CFP, YFP-Gβ) を作製し、作用薬投与時の FRET 変化を全反射照明下にて測定した。

#### ① Gq 蛋白質活性化に関する FRET 実験

Gq protein の活性化を Gαq-CFP と YFP-Gβ 間での FRET 変化として記録した。

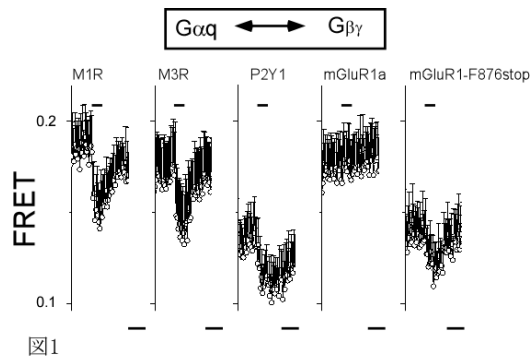


図1

ムスカリン受容体 1 型 (M1R)、ムスカリン受容体 3 型 (M3R)、代謝型プリン受容体 1 型 (P2Y1) は Gq 共役型受容体でありロドプシンファミリーに分類される受容体であるが、これら受容体を作用薬にて活性化した時に Gαq-CFP と YFP-Gβ 間での FRET 減少がみられた (図 1、左 3 列)。即ち、受容体刺激時に起こる Gq protein の活性化を FRET 変化としてとらえることに成功した。このコンストラクトでは、FP は Gαq サブユニットの α ヘリックス BC 間ループに挿入されている。他のループや C 末端に FP を付加したコンストラクトでは、図 1 のような FRET 変化は検出できなかったことから、BC 間ループに FP を挿入したコンストラクトを用いて実験を行った。

ロドプシンファミリーとは異なる GPCR ファミリーに属する mGlu1 においては、全長型 mGluR1a で FRET 減少を起こさず、C 末端欠

損型 mGluR1(mGluR1-F876stop)で FRET 減少を起こすという結果を得た (右 2 列)。これらの結果は、蛍光蛋白質付加 Gq サブユニットと mGluR1a の会合に対して mGluR1a の長い C 末端領域が阻害的に働くことを示唆するものである。これは、C 末端領域が多様な G protein との共役に影響を与えるという、これまでの我々の知見に一致するものであった。

#### ② 受容体と Gβ の会合に関する FRET 実験

次に、受容体と Gq サブユニットの会合を receptor-YFP と CFP-Gβ 間での FRET 変化として検出する実験を行った。

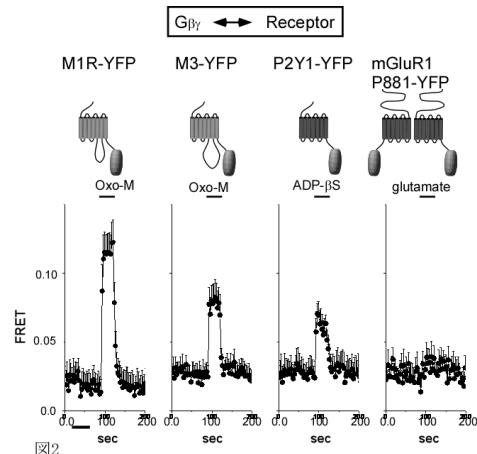


図2

ロドプシンファミリーの Gq 共役型受容体の C 末端に YFP を付加した受容体 (M1R-YFP, M3R-YFP, P2Y1-YFP) と GαqGβ2 サブユニットおよび CFP-Gβ1 を共発現させて、FRET 実験を行った。作用薬投与に伴う FRET 増加がみられ、この FRET 増加は作用薬の除去により消失した (図 2)。また、Gαq サブユニット不在時には FRET 増加が見られなかったことから、FRET 増加は Gq protein と受容体の会合を示すと考えられた。一方、C 末端を短くした mGluR1 に YFP を付加したコンストラクト (mGluR1-P881-YFP) では、作用薬投与による FRET 増加が見られなかった。この結果は、FP の立体障害効果の差異を反映するものと考えられた。即ち、ロドプシタイプ受容体と mGluR1 では Gq protein との会合状態に差異があるということを示唆する。

以上の結果から、C 末端に蛍光蛋白質を付加した mGluR1 と蛍光標識 G protein サブユニットは会合しないということが明らかとなった。この点においてはネガティブな結果であるが、Gq protein と Gq 共役型受容体の FRET 解析において、複数種の受容体を用いた体系的な研究は、本研究が初めてのものであり GPCR の活性化機構の解明に大いに資するものであると考えられる。現在、ロドプシン型受容体と Gq 蛋白質の会合解離に関する FRET 解析を、さらに進めているところである。

## (2) mGluR1による G protein 活性化機構の多様性についての研究

mGluR1 は 2 量体で構成されたため、2 つのグルタミン酸結合部位と 2 つの G protein 結合部位を有する。さらに、mGluR1 は、グルタミン酸と結合していないサブユニットを介して Gq 経路を活性化する (trans-activation) ことが知られている。そこで、mGluR1 の C 末端に YFP をつけるのではなく、2 番目の細胞内ループに付加したコンストラクト (i2-YFP) と CFP-Gβ との FRET 実験を行う目的のもとに、野生型 G 蛋白質との機能的会合を調べた。

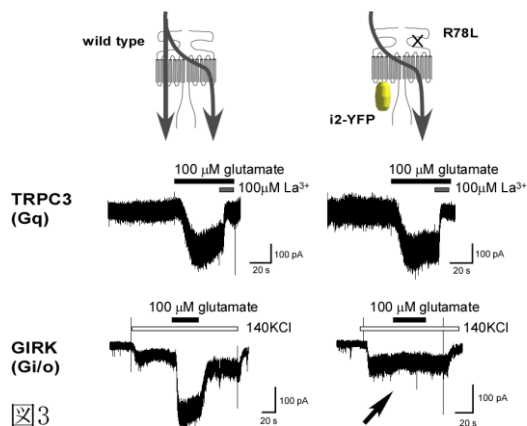


図3

Trans-activation を確かめるため、グルタミン酸結合不全変異体 (R78L-mGluR1) と G protein との共役を阻害する i2-YFP を共発現し、その機能解析を行った。まず、Gq 経路下流に位置する TRPC3 チャンネルがグルタミン酸投与により活性化されることを見出し (図 3 右中段)、i2-YFP サブユニットが 2 量体に含まれていても野生型 Gq 蛋白質と会合できることを確認した。一方、野生型 mGluR1 は Gi/o 経路下流の GIRK チャンネルを活性化したが (図 3 左下段)、R78L-mGluR1 と i2-YFP のヘテロ 2 量体では、GIRK 電流の活性化が見られなかった (図 3 右下段)。これらの結果は、2 量体型受容体活性化機構の多様性を示すとともに、受容体活性化機構の違いにより活性化されるシグナル伝達経路も異なることを示すものである。多様な活性化機構とシグナル伝達経路との対応について、更に詳細に解析し報告した (発表論文 1)。

これら機能解析から、i2-YFP と野生型 mGluR1 のヘテロ 2 量体が Gq protein と共役出来ることが明らかとなったので (図 3 右中段)、i2-YFP と CFP-Gβ 間での FRET 解析を行った。GaqGγ2 サブユニットを今日発現させた条件でも、グルタミン酸投与時に有意な FRET 変化は検出されなかった。これは、mGluR1 の C 末端に YFP を付加した場合と同じ結果であった。

上記 (1) と (2) の結果は、mGluR1 に付

加した蛍光蛋白質が蛍光標識 Gq サブユニットとの共役を阻害する可能性を示している。これは、蛍光蛋白質を付加した mGluR1 と蛍光標識 Gq サブユニットの共局在を一分子観察により記録することが不可能であることを意味する。即ち、蛍光蛋白質による mGluR1 の標識法は、本研究の当初の目的に適していないことが明らかとなった。しかしながら、ロドプシンファミリー受容体と Gq protein 会合の FRET 解析は、GPCR の機能解明に大きく寄与するものと思われる。

## (3) Gi/o protein と受容体の FRET 実験

我々は、mGluR1 が Gi/o protein と共役することを報告している。そこで、mGluR1 と Gi/o protein の共役を FRET で捉えることを考え、まず、Gi/o 共役型受容体と Gi/o protein の FRET 解析を行った。

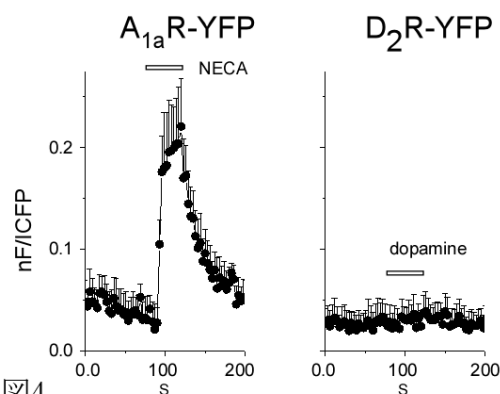


図4

ロドプシンファミリーの Gi/o 共役型受容体であるアデノシン受容体 1a 型 (A1aR) とドパミン受容体 2 型 (D2R) を用いて実験を行った。それぞれの受容体 C 末端に YFP を付加し、CFP-Gβ サブユニットとの FRET 解析を行った。実験には、野生型 Gi1Gγ2 サブユニットを共発現させた。Gq 共役型受容体と同様に、A1aR-YFP では作用薬投与時の FRET 増加、作用薬除去による FRET 増加の消失を確認した (図 4 左)。これに対し、D2R-YFP では作用薬投与時の FRET 増加が見られなかった。この結果から、同一ファミリーに属する受容体であっても Gi/o protein との共役様式は異なることが示唆された。

次に、mGluR1 と同じファミリーに属する Gi/o 共役型受容体 GABA<sub>B</sub> 受容体でも同様な実験を行った。GABA<sub>B</sub> 受容体は GABA 結合サブユニット GB1 と Gi/o 共役サブユニット GB2 からなるヘテロ 2 量体である。そこで、Gi/o と会合しない GB1 サブユニットの細胞内領域に FP を付加したコンストラクトを作成した。GB1-FP と野生型 GB2 のヘテロ 2 量体に作用薬を投与すると Gi/o 下流の GIRK チャンネルが活性化した。この結果は、このヘテロ 2 量体が trans-activation により Gi/o protein と会合することを示している。しかしながら、

GB1-FP と CFP-Gβサブユニット間の FRET は作用薬投与により変化しなかった。これらの結果は、mGluR1 と Gq protein の機能解析および FRET 解析で得られた結果と同様である。我々は、GABA<sub>B</sub> 受容体の FRET 解析から、作用薬の結合による GABA<sub>B</sub> 受容体活性化様式は、ロドプシンファミリー受容体よりも mGluR1 に近いということも報告している（発表論文 2、3）。以上の結果から示唆される、「ファミリーの差異により受容体活性化機構および G protein 会合様式に差異が生ずると」という可能性は、GPCR の構造機能相関を考える上でも興味深く、新たな研究テーマとしてのシーズとなりうるものと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- 1) Tateyama, M. & Kubo, Y. The intra-molecular activation mechanisms of the dimeric metabotropic glutamate receptor 1 differ depending on the type of G proteins. *Neuropharmacol.* 査読有 in press
- 2) 久保義弘、立山充博 (2010) G 蛋白質共役型受容体の構造変化の全反射照明下 FRET 法による解析 医学の歩み、査読無し 233 巻第 9 号、P.699-703 医歯薬出版株式会社
- 3) Matsushita, S., Nakata, H., Kubo, Y. & Tateyama, M. Ligand-induced rearrangements of the GABA<sub>B</sub> receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 査読有 285: 10291-10299, 2010.
- 4) Gleitsman KR, Tateyama, M. & Kubo, Y. Structural rearrangements of the motor protein prestin revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 査読有 297: C290-298, 2009.
- 5) Tateyama, M. & Kubo, Y. Regulatory role of C-terminus in the G protein coupling of the metabotropic glutamate receptor 1. *J. Neurochem.* 査読有 107: 1036-1046, 2008.

〔学会発表〕（計 8 件）

- 1) 立山充博、松下真一、久保 義弘 Ligand-induced structural rearrangements of G protein coupled receptors revealed by FRET analysis 第 84 回日本薬理学会年会、横浜（2011 年 3 月 22 日）
- 2) 立山充博、久保 義弘 代謝型グルタミン酸受容体の多様なシグナリングの調節機構 シンポジウム「グルタミン酸受容体の新側面」第 32 回日本神経科学大会、名古屋（2009 年 9 月 16 日）

〔図書〕（計 1 件）

Kubo, Y. & Tateyama M., Springer, Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology 3rd Edition, Structural rearrangement and functional relation of the metabotropic glutamate receptor, 2009, 334-359

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

立山 充博 (Michihiro Tateyama)  
生理学研究所・分子生理研究系・准教授  
研究者番号：30276472

##### (2) 連携研究者

久保 義弘 (Kubo Yoshihiro)  
生理学研究所・分子生理研究系・教授  
研究者番号：80211887