

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15727

研究課題名(和文) イネ科を含む被子植物におけるユニークな三量体Gタンパク質シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of plant G-protein signaling

研究代表者

福田 昌弘 (Fukuda, Masahiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・特任助教

研究者番号：80827155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：三量体Gタンパク質を介したシグナル伝達経路は、細胞外の情報を細胞内へ伝える主要なシステムの一つである。植物にも三量体Gタンパク質は保存されているが、そのシグナル制御機構は動物と大きく異なる。本研究では、クライオ電子顕微鏡解析によって植物特有の三量体Gタンパク質シグナル制御の分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。現在までに、発現や精製条件の検討の結果、均一性の高い高純度の植物由来膜タンパク質試料を高収量で得ることに成功している。クライオ電子顕微鏡を用いた画像撮影の結果、界面活性剤中で粒子同士が集まり長い凝集体構造を作っていることが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2017年にノーベル化学賞の対象となった技術であるクライオ電子顕微鏡法の台頭によって、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)とGタンパク質との複合体構造が次々に報告され、動物の三量体Gタンパク質の活性化/不活性化の分子機構が原子レベルで解明されつつある。しかし、植物のGタンパク質シグナルの分子機構はほとんど不明である。本研究ではそのような植物の膜タンパク質を介したGタンパク質シグナリングに着目し、構造生物学的研究を行った。その結果、これまでに精製の報告がない植物由来膜タンパク質の発現と精製に成功した。これは今後、植物の三量体Gタンパク質シグナル制御機構の理解を促進させると期待される。

研究成果の概要(英文)：The heterotrimeric G-protein signaling pathway is one of the major systems for transmitting extracellular information into the cell. Although trimeric G-proteins are conserved in plants, their molecular mechanisms is largely different from those in animals. We have succeeded in purification of plant membrane protein samples. Cryo-electron microscopic analyses suggested that the particles assemble to form long aggregated structure in detergent micelle.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

全ての生物は外環境に対して適切な行動をとるため、情報を細胞内へ伝える伝達システムを持つ。三量体 G タンパク質を介したシグナル伝達経路は、細胞外の情報を細胞内へ伝える主要なシステムの一つである。植物にも三量体 G タンパク質は保存されているが、そのシグナル制御機構は動物と大きく異なる。動物では、三量体 G タンパク質は平時 GDP が結合した不活性型で存在している。外部刺激を受けとった G タンパク質共役受容体 (GPCR) は GDP/GTP 交換因子 (GEF) として働き、三量体 G タンパク質の活性化、すなわち GTP 結合状態への反応を促進させる。活性化時に結合した GTP は GDP へ加水分解され、不活性型の三量体 G タンパク質に戻る。この加水分解反応は、GTPase 活性化タンパク質 (GAP) の一種である RGS により制御されている。このように、1980 年の G タンパク質の発見から 40 年近い研究の蓄積により、動物の G タンパク質シグナルについてはその大部分が判明しつつある。

しかしその一方で、植物の G タンパク質シグナルには未だ不明な点が多い。植物は GEF である GPCR を持たないため、GAP である RGS が植物の三量体 G タンパク質シグナルの主要な制御因子であると考えられてきた。しかし、イネ科を含む被子植物はその RGS さえ持たないことが判明し、そのシグナル制御を担う分子実態は長年謎であった (図 1)。

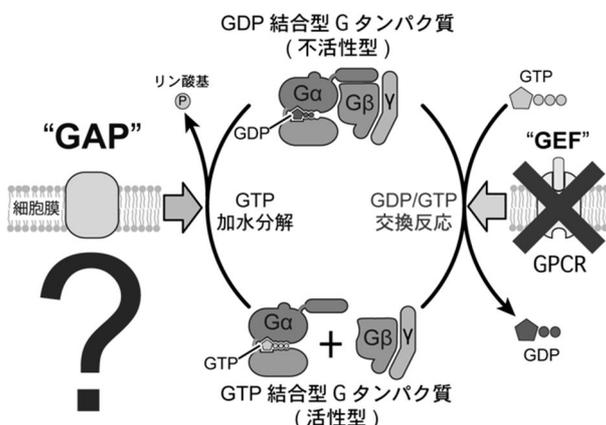


図 1. 植物の三量体 G タンパク質シグナル制御

2. 研究の目的

本研究では、近年イネ科植物から発見された植物の G タンパク質シグナリングに関わる新規な膜タンパク質を対象とした構造生物学的研究により、イネ科を含む植物の三量体 G タンパク質シグナル制御機構を解明することを目的とした。本研究は、イネ科を含む被子植物におけるユニークな三量体 G タンパク質シグナル制御機構の理解を促進させるのみならず、特にイネ科作物の品種改良につながると期待される。

3. 研究の方法

クライオ電子顕微鏡解析をはじめとした構造生物学的手法により、植物の G タンパク質シグナリングに関わる新規な膜タンパク質の分子機構を明らかとする。

4. 研究成果

本研究では、クライオ電子顕微鏡解析によって植物特有の三量体 **G** タンパク質シグナル制御の分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。現在までに、発現や精製条件の検討の結果、これまでに精製の報告がない植物由来膜タンパク質に関して、以下のように均一性の高い高純度のタンパク質試料を高収量で得ることに成功した (図 2)。また、イネ科植物由来の **G** タンパク質の高純度での精製にも成功した (図 3)。

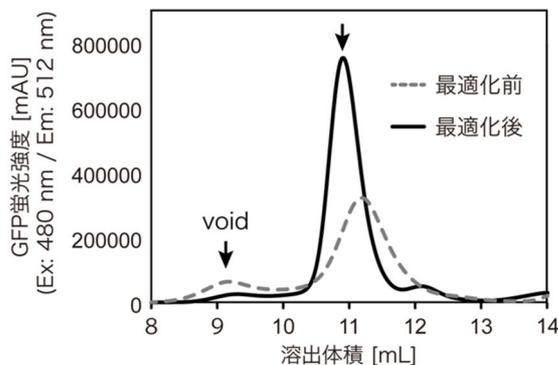


図 2. 発現や精製条件の検討の結果

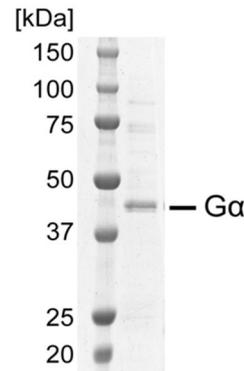


図 3. イネ科植物 **G** タンパク質の精製

この精製膜タンパク質を用いて、東京大学の所有するハイエンドクライオ電子顕微鏡を用いて画像撮影を行い (図 4)、画像処理によって 2 次元平均クラス像を作成した。しかし、界面活性剤のミセルより突出したドメインがほとんど存在せず、粒子の正確なアライメントをおこなうことができなかった。

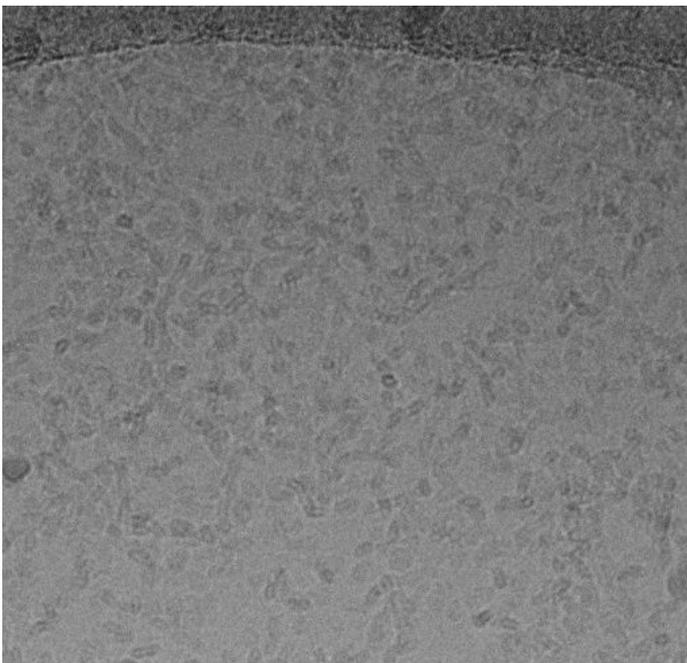


図 4. クライオ電子顕微鏡で撮影したマイクログラフ

そのため、精製タンパク質をリポソームに再構成し、これをマウスにインジェクションすることで構造認識抗体のスクリーニングを行った結果、6 種類の構造認識 **Fab** 抗体を得ることに成功した。さらに、この構造認識抗体を用いた精製タンパク質資料との複合体の形成を蛍光ゲルろかクロマトグラフィーにより確認し、強固な複合体を形成する抗体の組み合わせを同定することに成功した (図 5)。

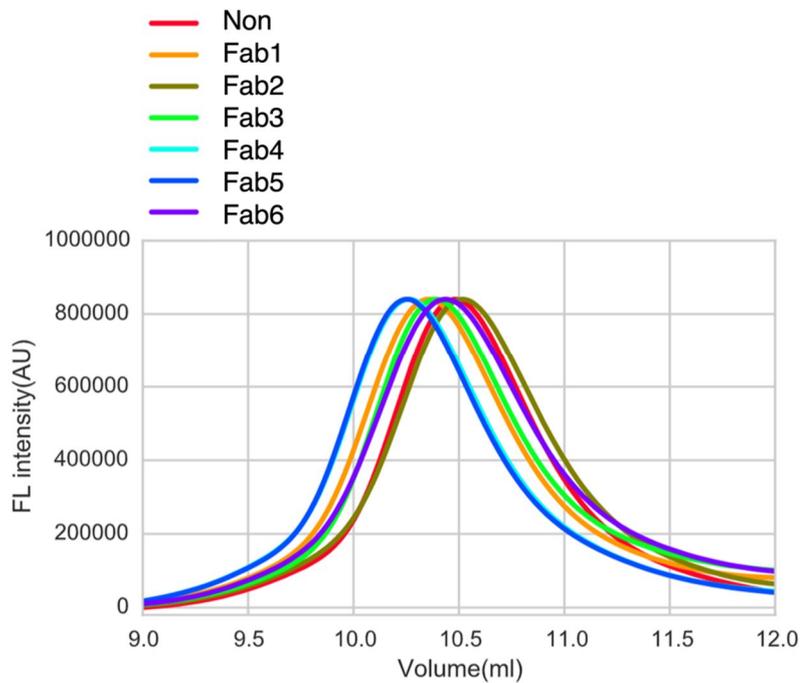


図 5. 構造認識抗体との結合実験

今後は本スクリーニングで得られた抗体との複合体での構造解析を行う。また、電子顕微鏡像中では粒子同士が非特異的に集まり長い凝集体を作っていることが観察されたが、こうした凝集体の形成を防ぐ目的で、界面活性剤ではなく脂質二重膜環境への再構成を引き続き検討する。これまで既に、**nanodisc の scaffold protein** としてよく用いられる **MSP タンパク質 5 種 (MSP1, MSP1E3, MSP1E3D1, MSP1D1, MSP2)** の精製に成功している。今後はこれら **MSP** を用いて脂質の種類や目的タンパク質との量比、界面活性剤の除去の方法の検討を行った上で、電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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

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