

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840055

研究課題名(和文)Gタンパク質共役型受容体のヘテロ多量体配置転換の解析

研究課題名(英文)Single-molecule imaging analysis of oligomerization of GPCRs

研究代表者

柳川 正隆 (Yanagawa, Masataka)

国立研究開発法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・研究員

研究者番号：70609792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：創薬の主要な標的となるGタンパク質共役型受容体(GPCR)が二量体化を通じて機能調節を行うことが様々な受容体で報告されてきたが、生細胞においてGPCRの高次多量体化の役割は明らかでない。本研究では、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)とセロトニン受容体(5HTR)をモデルとして1分子計測・FRET解析を行った。生細胞における1分子計測の結果、mGluRが活性化すると拡散の遅い高次多量体が増えることが明らかになった。また、この高次多量体はクラスリン被覆小胞への集積と関連することが判明した。さらに、FRET計測から、mGluRが活性化すると5HTRとのヘテロ多量体が解離する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptors (GPCRs) are major drug targets. It has been reported that various GPCRs form dimers regulating their functions. However, a role of higher-order oligomerization of GPCRs in living cell is unclear. Here, we performed single-molecule imaging and FRET analysis of metabotropic glutamate receptor (mGluR) and serotonin receptor (5HTR) as model GPCRs. Single-molecule imaging analysis in living cell demonstrated that the fraction of the immobile higher-order oligomer of mGluRs, which is related to the recruitment of receptors into clathrin-coated pits, increased upon activation. The FRET analysis suggested that a dissociation of mGluR/5HTR hetero-oligomer occurs upon activation of mGluR.

研究分野：生物物理学

キーワード：GPCR 代謝型グルタミン酸受容体 セロトニン受容体 1分子イメージング 多量体化 FRET

## 1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、7 回膜貫通構造を特徴とする膜タンパク質であり、刺激を受けて三量体 G タンパク質を介した細胞内シグナル伝達系を駆動する。近年、様々な GPCR が二量体・多量体を形成し、単量体では成しえない高度な機能調節を行っている事例が報告されている。例えば、我々の前頭葉の神経細胞において、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)はセロトニン受容体(5HTR)とヘテロ多量体を形成して存在する。一方の受容体の活性化が他方の受容体のリガンドに対する親和性を変えるなど、両受容体は互いに活性を調節し、神経細胞における Gi と Gq の活性化の割合を調節している。この Gi と Gq の活性化の適正なバランスを崩す薬は幻覚剤として作用し、また、種々の要因によりバランスが乱れることで統合失調症が発症する。逆に、このバランスを整える薬は統合失調症の治療薬として作用する。多量体化によるリガンドの親和性の変化を利用することで、単量体には作用しない低濃度の薬の複合投薬が有効になり、副作用の少ない統合失調症の治療が期待されている。これを一例として、現時点で 140 種を超える GPCR の二量体・多量体が報告されており、新たな創薬のコンセプトとして注目されている。

しかしながら、生細胞における GPCR の二量体・多量体化の実態は不明な点が多い。従来のバルクにおける生化学的な計測では、二量体と高次多量体を区別することは難しく、GPCR が生細胞中でどの程度安定に高次多量体を形成するのかが不明である。また、GPCR が二量体・多量体化により機能調節を受けるメカニズムとして、インターフェース領域を介した相互作用が予想されるが、GPCR が何通りの二量体・多量体配置をとるのか、また、それぞれの配置が G タンパク質活性化能とどのように関わるのかが不明である。

## 2. 研究の目的

(1)本研究では、上述の mGluR および 5HTR をモデル受容体として、GPCR が生細胞中でどの程度の高次多量体を安定に形成するのか、また、高次多量体を形成する場合、どのような生理機能と関連しているのかを解明することを第一の目的とする。

(2)さらに、mGluR および 5HTR のヘテロ多量体のどのような構造変化が機能調節につながるのかを解析することで、GPCR の多量体配置と機能の関連を解明することを第二の目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず mGluR・5HTR のそれぞれに蛍光標識をするため、HaloTag・SNAP-tag・CLIP-tag および GFP を C 末端に融合した cDNA を作成した。

上記の cDNA を HEK293 細胞にトランスフェクションし、HaloTag TMR ligand で HaloTag を標識、全反射蛍光顕微鏡により受容体分子の生細胞膜上での動態を観察した。mGluR については当初構築した cDNA で 1 分子計測が問題なくできたため、様々なリガンド条件下で計測を行い、各受容体分子の輝点を追跡、多量体サイズ分布・拡散係数を解析した。さらに、mGluR の高次多量体の生理機能を調べるため、GFP 標識したクラスリン軽鎖を mGluR と共発現した細胞において 2 色同時 1 分子イメージングを行った。5HTR については当初膜局在が観察されなかったため、シグナルペプチド配列・リンカー領域について検討を行い、1 分子計測を可能にした。

さらに、mGluR については 1 分子動態と機能の関連を解析するために、1 分子イメージングと同リガンド条件下でリガンド結合能および G タンパク質活性化能を定量した。リガンド結合能および G タンパク質活性化能は  $[^3\text{H}]$ -LY341495 結合実験および  $[^{35}\text{S}]$ -GTP S 結合実験でそれぞれ定量した。

また、mGluR と 5HTR のヘテロ多量体の構造変化を検出する FRET センサーの構築を行った。mGluR と 5HTR の細胞質ループ領域に対して GFP/Halo/SNAP/CLIP-tag を挿入した変異体を作製し、様々な組み合わせで共発現・蛍光標識を検討した。その結果、mGluR/5HTR の細胞質第 3 ループ領域に CLIP-tag/SNAP-tag をそれぞれ融合した共発現膜試料について FRET が観察されたため、リガンド依存的な FRET 効率の変化を蛍光分光高度計により定量した。

## 4. 研究成果

本研究では、生細胞における mGluR の 1 分子動態解析において大きな進展が得られた。様々なリガンド条件下で生細胞膜中の mGluR を全反射蛍光顕微鏡により 1 分子計測し、多量体サイズ・拡散係数の分布を比較したところ、受容体の活性と相関して、遅く拡散する分子の割合が増えることが明らかになった。また、遅く拡散する分子は 4 量体以上の高次多量体を多く含むことが明らかになった。

さらに、mGluR とクラスリンの 2 色同時 1 分子イメージングにより、上記の高次多量体形成はクラスリン被覆ピットへの取り込みと関連していることが判明した。クラスリン被覆ピットへの集積は GPCR 一般に共通したエンドサイトーシスの機構であり、1 分子動態を指標とした薬効評価が他の受容体でも可能であることが示唆された。

そこで、5HTR についてもアゴニスト依存的な 1 分子動態が同様に変化するかを検証した。その結果、5HTR についても mGluR と同様、活性化に伴い拡散が有意に遅くなることが明らかになった。今後、より多くの GPCR で一般性を検証していく必要があるが、1 分子動態を指標にした GPCR の活性推定は化合物スクリーニングの新規手法となり得るため、「G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の活性評価方法」として特許出願を行った。

従来の化合物スクリーニングは、GPCR の下流の cAMP や  $Ca^{2+}$  の濃度変化といった細胞応答を計測するものがほとんどであり、下流のシグナルが複数ある受容体や、下流が未知のオーファン受容体では単一手法での薬効評価が困難である。一方、本手法を用いれば、GPCR 分子自体のふるまいを見て薬効評価できるため、下流が未知の場合や、複数ある場合でも単一の計測で評価が可能であると考えられる。

さらに、*in vitro* における mGluR と 5HTR の FRET 解析からは、mGluR のアゴニスト刺激依存的に、FRET 効率の低下が認められた。これは mGluR が活性化した際に、mGluR と 5HTR のヘテロ多量体において膜貫通領域間の距離が離れる (ヘテロ多量体が解離する) ことを示す結果であった。

同 FRET プローブを生細胞に共発現させて、1 分子 FRET 計測も試みたが、ほとんどの受容体が内膜系に発現してしまい、解析に足るデータは得られなかった。今後、5HTR・mGluR の双方の C 末端領域を異なる色素で蛍光標識して、2 色同時 1 分子計測を行うことで、リガンド依存的なヘテロ多量体の乖離を直接観察できないかを検討したい。

## 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 3 件)

Keiichi Kojima, Yuki Matsutani, Takahiro Yamashita, Masataka Yanagawa, Yasushi Imamoto, Yumiko Yamano, Akimori Wada, Osamu Hisatomi, Kanto Nishikawa, Keisuke Sakurai, Yoshinori Shichida

“Adaptation of cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation”  
Proceedings of the National Academy of Sciences, 査読有, 2017, vol. 114, no. 21, 5437-5442,  
DOI: 10.1073/pnas.1620010114

Ryo Yoshizawa, Nobuhisa Umeki, Masataka Yanagawa, Masayuki Murata,

Yasushi Sako

“Single-molecule fluorescence imaging of RasGDS on cell surfaces during signal transduction from Ras to Ras” Biophysics and Physicobiology, 査読有, 2017, 印刷中

Masataka Yanagawa, Keiichi Kojima, Takahiro Yamashita, Yasushi Imamoto, Take Matsuyama, Koji Nakanishi, Yumiko Yamano, Akimori Wada, Yasushi Sako, Yoshinori Shichida

“Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore” Scientific Reports, 査読有, 5 巻, 2015, 11081 頁,  
DOI: 10.1038/srep11081

[学会発表](計 19 件)

Masataka Yanagawa, Michio Hiroshima, Yuichi Togashi, Takahiro Yamashita, Yoshinori Shichida, Masahiro Ueda, Masayuki Murata, Yasushi Sako

“Single-molecule pharmacology of a G protein-coupled receptor”, International Symposium on Biophysics of Rhodopsins

2017 年 5 月 11-12 日 (招待講演)  
Kyoto University (京都府京都市)

柳川正隆

“Single-molecule pharmacology of a G protein-coupled receptor”、理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 IX」, 2017 年 4 月 13-14 日  
理化学研究所(埼玉県和光市)

Masataka Yanagawa, Michio Hiroshima, Yuichi Togashi, Takahiro Yamashita, Yoshinori Shichida, Masahiro Ueda, Masayuki Murata, Yasushi Sako

“Single-molecule pharmacology of a GPCR” University of Strasbourg-RIKEN Workshop on Membrane Lipidology  
2017 年 3 月 9-10 日  
Region Grand Est (France)

柳川正隆

“1 分子動態を指標にした GPCR の活性推定”, 細胞動態システム科学研究 2016  
2016 年 12 月 20-22 日(招待講演)  
淡路島夢舞台ウェスティンホテル(兵庫県淡路市)

Keiichi Kojima, Yuki Matsutani, Masataka Yanagawa, Takahiro Yamashita, Yasushi Imamoto, Osamu Hisatomi, Yumiko Yamano, Akimori Wada, Yoshinori

Shichida  
“Thermal activation rates of visual pigments expressed in rods”  
日本生物物理学会第 54 回年会  
2016 年 11 月 25-27 日  
つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Ryo Yoshizawa, Nobuhisa Umeki, Masataka Yanagawa, Masayuki Murata, Yasushi Sako  
“Elucidation of the EGF dependent localization mechanism of RalGDS molecule to plasma membrane using TIRF microscopy”  
日本生物物理学会第 54 回年会  
2016 年 11 月 25-27 日  
つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Masataka Yanagawa, Michio Hiroshima, Yuichi Togashi, Takahiro Yamashita, Yoshinori Shichida, Masahiro Ueda, Masayuki Murata, Yasushi Sako  
“Comparative analysis of diffusion-function relationship of G protein-coupled receptors on the living cell surface”  
日本生物物理学会第 54 回年会  
2016 年 11 月 25-27 日  
つくば国際会議場(茨城県つくば市)

柳川正隆, 廣島通夫, 富樫祐一, 山下高廣, 七田芳則, 村田昌之, 上田昌宏, 佐甲靖志  
“1 分子動態を指標とした Class C GPCR の活性推定”, 第 13 回 GPCR 研究会, 2016 年 5 月 13-14 日  
日本科学未来館(東京都江東区)

Masataka Yanagawa, Michio Hiroshima, Takahiro Yamashita, Yoshinori Shichida, Yasushi Sako  
“Single-molecule imaging of GPCR oligomerization followed by internalization”, The 4th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions  
2015 年 11 月 22-23 日  
Kyushu University (福岡県福岡市)

柳川正隆, 廣島通夫, 山下高廣, 七田芳則, 佐甲靖志  
“生細胞膜上の 1 分子拡散動態に基づく GPCR の活性推定”  
研究会「理論と実験」2015  
2015 年 10 月 8-9 日  
広島大学(広島県東広島市)

Masataka Yanagawa  
“Single-molecule imaging of GPCR

oligomerization followed by internalization”  
日本生物物理学会第 53 回年会  
(招待講演・シンポジウム企画者)  
2015 年 9 月 13-15 日 金沢大学(石川県金沢市)

Keiichi Kojima, Masataka Yanagawa, Takahiro Yamashita, Yuki Matsutani, Yasushi Imamoto, Take Matsuyama, Koji Nakanishi, Yumiko Yamano, Akimori Wada, Yasushi Sako, Yoshinori Shichida  
“Molecular mechanism of the low thermal activation rate of visual pigments”  
日本生物物理学会第 53 回年会  
2015 年 9 月 13-15 日 金沢大学(石川県金沢市)

柳川正隆, 廣島通夫, 山下高廣, 七田芳則, 佐甲靖志  
“全反射蛍光顕微鏡による代謝型グルタミン酸受容体の 1 分子動態解析”  
生理研研究会「膜システムの機能的・構造的統合」  
2015 年 9 月 1-2 日、生理研(愛知県岡崎市)

柳川正隆, 廣島通夫, 山下高廣, 七田芳則, 佐甲靖志  
“1 分子イメージングでみる代謝型グルタミン酸受容体の高次多量体形成と内在化” 第 12 回 GPCR 研究会, 2015 年 5 月 15-16 日、日本科学未来館(東京都江東区)

柳川正隆, 廣島通夫, 山下高廣, 七田芳則, 佐甲靖志  
“1 分子イメージングでみる代謝型グルタミン酸受容体の高次多量体化とエンドサイトーシス”  
理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 VII」, 2015 年 4 月 2-3 日  
理化学研究所(埼玉県和光市)

柳川正隆  
“1 分子蛍光イメージングで見る生細胞膜中で集まる GPCR”, 第 87 回 日本生化学会大会, 2014 年 10 月 18 日(招待講演)  
国立京都国際会館(京都府京都市)

Masataka Yanagawa, Michio Hiroshima, Takahiro Yamashita, Yoshinori Shichida, Yasushi Sako  
“Direct observation of higher-order oligomerization of GPCR followed by internalization”, 16th International Conference on Retinal Proteins  
2014 年 10 月 5-10 日, 長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市)

柳川 正隆, 廣島 通夫, 山下 高廣, 七田 芳則, 佐甲 靖志  
“1 分子イメージングによる代謝型グルタミン酸受容体の高次多量体形成と内在化の解析” 日本生物物理学会第 52 回年会, 2014 年 9 月 25-27 日  
札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

柳川正隆, 廣島通夫, 山下高廣, 七田芳則, 佐甲靖志  
“1 分子イメージングによる代謝型グルタミン酸受容体の細胞内動態解析”  
理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 VI」, 2014 年 4 月 3-4 日  
理化学研究所(埼玉県和光市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: G タンパク質共役型受容体(GPCR)の活性評価方法  
発明者: 柳川正隆, 佐甲靖志, 廣島通夫, 安井真人, 上田昌宏, 富樫祐一  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2017-084803  
出願年月日: 2017 年 4 月 21 日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳川 正隆 (YANAGAWA, Masataka)  
国立研究開発法人理化学研究所・  
佐甲細胞情報研究室・研究員  
研究者番号: 70609792

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号:

(4) 研究協力者 ( )