

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 2 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860170

研究課題名(和文) FRETイメージングによる細胞内局在性GPCR活性化の解明

研究課題名(英文) Evaluation of intracellular GPCR activation by using FRET imaging

研究代表者

宇和田 淳介 (Uwada, Junsuke)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70580314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内に局在するムスカリンM1受容体に着目し、その活性制御をリアルタイム可視化技術により解析することを目的としている。これまでに解析に必要なM1受容体のFRETコンストラクトを12種類作製しており、神経系細胞株に導入して、活性化に伴う変化の解析を進めている。また、M1受容体と、共役するGタンパク質との相互作用についても解析を進め、両者が細胞表面だけでなく、細胞内でも共役している可能性を示す結果を得た。人為的変異で細胞内に局在させたM1受容体ではGタンパク質との共局在性が著しく低下したことから、両者の関係性はM1受容体の局在様式に依存することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research was aimed at elucidating the mechanism of activation of intracellular muscarinic M1 receptor using real-time visualization technique. Twelve FRET constructs of M1 receptor were designed and introduced to N1E-115 neuroblastoma cells. Effectiveness of each constructs is currently being examined using confocal microscopy. In addition, interaction of M1 receptor and associated G proteins were also examined in living cells. Interestingly, G proteins was colocalized with M1 receptors at intracellular vesicles as well as at cell surface. On the other hand, C-terminal tail modified M1 receptor, which is exclusively localized intracellularly, showed poor colocalization with G protein. Therefore, it was indicated that the coupling of intracellular M1 receptor and G proteins is dependent on the trafficking machinery of M1 receptors.

研究分野：分子薬理学

キーワード：ムスカリン受容体 FRET GPCR

1. 研究開始当初の背景

ムスカリン M1 受容体 (以下 M1 受容体) は、アセチルコリンをリガンドとする G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種である。通常、GPCR は細胞表面に局在し、細胞外からのリガンド刺激を受けて活性化され、細胞内へと情報伝達を行う。しかし、近年いくつかの GPCR で、細胞表面だけでなく、細胞の内部に局在した状態でもリガンド刺激に応じた活性を示す例が報告されている。しかし、これまでの研究では細胞内 GPCR の活性を検出するために、リガンドの細胞膜透過性の有無を利用した方法、GPCR が局在する細胞内小器官を単離したうえでリガンド刺激を行う方法、といった間接的な手法に依っており、生細胞で細胞内の GPCR が活性化される様子を直接的に確認することは行われてこなかった。

我々は以前の研究により、M1 受容体も細胞内に局在する性質を有し、リガンド刺激により活性化されうることを明らかにしている。細胞内 M1 受容体は活性化により MAP キナーゼ系を活性化するなど、その機能性について解明が進みつつあるが、実際に細胞内で M1 受容体が活性化を受けるメカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

細胞内 GPCR の活性化を直接的に検出することは、活性化の際の速度論的な解析を可能にし、その制御メカニズムを知るためのツールにもなる。更には創薬候補のリガンドの細胞膜透過性、細胞内 GPCR の活性化能をスクリーニングするための手法としての応用も考えられるなど有用性は高い。

本研究では細胞内 M1 受容体をターゲットとし、細胞内での活性を調べるシステムを構築することを目的とした。実際には、蛍光タンパク質を M1 受容体に融合させた系を利用した生細胞のリアルタイム観察によって、細胞内 M1 受容体が活性化される様子を直接的に確認することを目指した。特に FRET (フェルスター共鳴エネルギー移動) を利用して、活性化に伴う M1 受容体の構造的変化を指標に解析することを試みた。

3. 研究の方法

本研究では、FRET を利用して M1 受容体の活性化を検出するため、蛍光タンパク質を融合させた M1 受容体コンストラクトを作製し、神経芽細胞腫の N1E-115 細胞に導入した後に、共焦点レーザー顕微鏡下での局在と FRET 効率の変化をリアルタイムで観察した。コンストラクトは、以下の 2 つの検出系に基づいて作製された。

(1) M1 受容体の 1 分子 FRET 解析

GPCR は 7 回膜貫通型の受容体である。この内、3 番目の細胞内領域と C 末端領域は比較的自由度の高い構造をしているが、M1 受

容体では 3 番目細胞内領域が 157 アミノ酸ほどあり、全体の 34% を占める長いループ構造となっている。GPCR が活性化を受けると、構造変化に伴って 3 番目細胞内領域と C 末端領域の間の距離が変化することが知られている。このそれぞれの領域に異なる蛍光タンパク質を融合させたコンストラクトを作製し、両者間の距離の変化を蛍光タンパク質間の FRET 効率の変化として GPCR の活性を検出する系が既に報告されている。本研究では、M1 受容体の C 末端と、3 番目細胞内領域の N 末側、C 末側、あるいは一部欠失させ短縮した変異体に対して、BFP 系と GFP 系あるいは GFP 系と RFP 系の蛍光タンパク質を融合させた FRET コンストラクトを作製し、解析に供した。

(2) M1 受容体と G タンパク質間の 2 分子 FRET 解析

GPCR である M1 受容体は G α 、G β 、G γ の G タンパク質 3 量体と共役しており、G α は特に Gq/11 に依存したシグナリングを惹起する。活性化を受けた後、両者は解離することが知られており、それぞれに蛍光タンパク質を融合させることで、活性を FRET 効率の変化として検出することができる。本研究では BFP 系と GFP 系の蛍光タンパク質を融合させたコンストラクトを作製した。

4. 研究成果

(1) M1 受容体の FRET コンストラクト作製

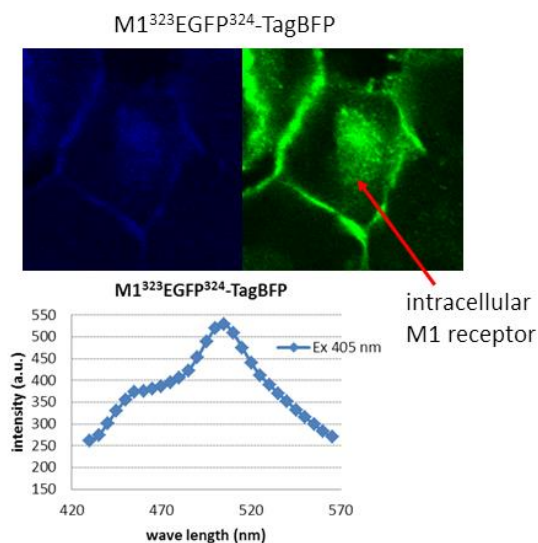
本研究ではまず、生細胞内で M1 受容体の活性をモニターできるコンストラクトの作製を行った。M1 受容体の配列内における蛍光タンパク質の挿入箇所は、3 番目細胞内領域と C 末端である。3 番目細胞内領域は 157 アミノ酸あり、比較的長い配列であるため、挿入箇所は N 末側の 228/229、C 末側の 323/324、361/362、中間領域を欠失させた 228/324 と、複数を検討した。融合させる蛍光タンパク質として、TagBFP と AcGFP 又は EGFP のペア、EGFP 又は Clover と TagRFP のペアを作製し、合わせて 12 種類のコンストラクトでその FRET 効率の比較を行った。

我々の研究により、M1 受容体の細胞内への局在には、C 末端領域の特定の配列にエンドサイトーシスに関わる AP-2 複合体因子が結合することが重要であることが分かっている。しかし、C 末端領域に、蛍光タンパク質を融合させても、M1 受容体の細胞内局在には影響せず、本研究の目的に支障はないことが分かった (図 1)。

一方、3 番目細胞内領域に蛍光タンパク質を融合させた M1 受容体の中で、中間領域を欠失させ、その部位に蛍光タンパク質を融合させたものを細胞に発現させ、局在性を確認したところ、Forward Trafficking が阻害され小胞体領域付近に留まる傾向が見られた。

野生型で見られる細胞内 M1 受容体との混同を避けるため、このコンストラクトは以降の FRET 解析からは除外した。調べを進めると、この Forward Trafficking の低下は、欠失のみで蛍光タンパク質を融合させない場合でも同様に観察された。幾つかの欠失変異体を作製し検討したところ、3 番目細胞内領域にある酸性アミノ酸クラスター付近の欠失が原因であると推測された。現在、この領域の受容体輸送への機能性を明らかにするため相互作用因子の同定を含めて検討を進めている。

作製したコンストラクトを神経芽細胞腫の N1E-115 細胞に導入し、FRET 効率をアクセプターフォトブリーチング法などで検討した。用いたコンストラクトのうち、M1³²³EGFP³²⁴-TagBFP で最も効率の良い FRET を確認した。細胞膜表面と細胞内の M1 受容体のそれぞれで比較したところ、いずれも同程度の FRET 効率が得られ、局在による違いは見られなかった。本研究の主眼であるアゴニスト投与時の M1 受容体の活性化に伴う FRET 効率を細胞表面と細胞内で比較する実験については、まだ安定的なデータを得られる状態に至っていない。現在、幾つかの技術的な問題を克服し、研究を進めているところである。

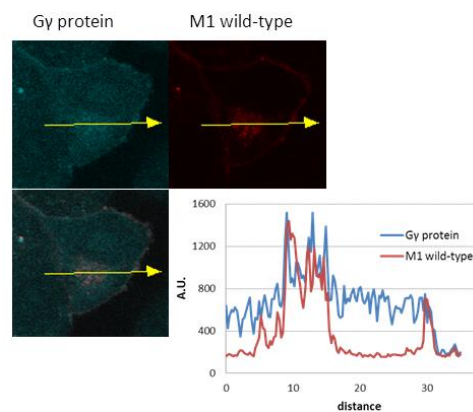


(図 1) M1 受容体 FRET コンストラクトの N1E-115 細胞における局在(上)及び 405 nm 励起時の蛍光スペクトル (下)

(2) 細胞内 M1 受容体と G タンパク質の共役

細胞内部局在型の M1 受容体と 3 量体 G タンパク質の関係を調べるため、M1 受容体と、Gq、G γ タンパク質の蛍光タンパク質融合体を作製した。N1E-115 細胞に発現させた G γ タンパク質は細胞表面付近への集積と共に細胞質全体への局在が見られる。興味深いことに G γ タンパク質を M1 受容体とともに共発現させたとき、両者が細胞内で顕著な共局在のドットを示すことが分かった (図 2)。このことは両者が細胞表面だけでなく細胞内

でも共役して、細胞内 M1 受容体の活性化による G タンパク質を介したシグナリングを惹起する可能性を示唆している。M1 受容体は細胞表面と細胞内両方に局在するが、C 末端 442 番目のトリプトファンをチロシンに変異させると、細胞表面の受容体量が著しく減少し、細胞内にもみ局在ようになる。この変異体の局在を G γ タンパク質と比較すると、その共局在性は野生型に比べて明らかに低下していた。このことから、M1 受容体と Gq タンパク質の共役は、M1 受容体の局在性の様式に依存している可能性が示唆された。現在、アゴニスト刺激時の M1 受容体と G タンパク質の間の変化を解析する研究を進めている。



(図 2) G γ タンパク質と M1 受容体の N1E-115 細胞における局在の比較。矢印方向のライン上の蛍光強度を右下に示している。

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 Khan MR, Uwada J, Yazawa T, Islam MT, Krug SM, Fromm M, Karaki S, Suzuki Y, Kuwahara A, Yoshiki H, Sada K, Muramatsu I, Anisuzzaman AS, Taniguchi T. "Activation of muscarinic cholinergic receptor ameliorates tumor necrosis factor- α -induced barrier dysfunction in intestinal epithelial cells." **FEBS Lett.** 589(23):3640-7. (2015) doi: 10.1016/j.febslet.2015.10.029 (査読有)
- ② Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, Khan MR, Uwada J, Umezawa A, Taniguchi T. "Regulation of Steroidogenesis, Development, and Cell Differentiation by Steroidogenic Factor-1 and Liver Receptor Homolog-1." **Zoolog Sci.** 32(4):323-30. (2015) doi: 10.2108/zs140237 (査読有)
- ③ Khan MR, Islam MT, Yazawa T, Hayashi H, Suzuki Y, Uwada J,

Anisuzzaman AS, Taniguchi T. "Muscarinic cholinergic-mediated activation of JNK negatively regulates intestinal secretion in mice." **J Pharmacol Sci.** 127(1):150-3. (2015) doi: 10.1016/j.jphs.2014.10.001 (査読有)

- ④ Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman AS, Umada H, Hayashi R, Kainoh M, Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. "Pharmacologically distinct phenotypes of $\alpha 1B$ -adrenoceptors: variation in binding and functional affinities for antagonists." **Br J Pharmacol.** 171(21):4890-901. (2014) doi: 10.1111/bph.12813 (査読有)
- ⑤ Uwada J, Yoshiki H, Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. "Intracellular localization of the M1 muscarinic acetylcholine receptor through clathrin-dependent constitutive internalization is mediated by a C-terminal tryptophan-based motif." **J Cell Sci.** 27(Pt 14):3131-40. (2014) doi: 10.1242/jcs.148478 (査読有)

[学会発表] (計2件)

- ① 宇和田 淳介 他、「ムスカリン M1 受容体のクラスリン依存的な構成的細胞内移行」第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ② Islam MT, Yazawa T, Uwada J 他、「Muscarinic cholinergic-mediated activation of JNK negatively regulates intestinal secretion」第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇和田 淳介 (UWADA JUNSUKE)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：70580314

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし