

令和元年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18533

研究課題名(和文)GPCRの1分子動態・機能関連の比較解析

研究課題名(英文)Comparative analysis of the single-molecule diffusion-function relationships of GPCR

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・開拓研究本部・研究員

研究者番号：70609792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：GPCRは7回膜貫通構造を持つ膜受容体の総称である。本研究では、生きた培養細胞中で24種類のGPCRを1分子蛍光イメージングにより観察し、薬による受容体分子の動態変化を解析した。その結果、24種のGPCRは、いずれも活性化すると拡散が遅くなることが分かった。また、代謝型グルタミン酸受容体について、受容体の拡散と機能の関係を2色同時1分子イメージング等で解析し、Gタンパク質と相互作用中の受容体は拡散が速いものが多いのに対し、クラスリンと相互作用中の受容体は拡散が止まったものが多いことを明らかにした。本研究で明らかにしたGPCRの拡散・機能関連の応用として、新たな薬効評価手法を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCRは創薬の主要な標的分子となっている。本研究で明らかにした「受容体の拡散と機能の関係」は多くのGPCRに共通しているため、拡散を定量することで下流の細胞応答の異なる様々なGPCRに対する薬効を共通の指標で評価できるようになると期待される。

したがって、本研究成果は、1分子レベルで薬の作用機序を理解する1分子薬理学の発展や、1分子イメージングを用いたGPCR標的化合物の薬効評価という新たなドラッグスクリーニング手法の開発に貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptors (GPCRs) are major drug targets. However, it is difficult to measure the effects of a drug by monitoring each receptor molecule in a living cell. Here, we show that single-molecule imaging analysis provides an alternative method for assessing ligand effects on GPCRs. First, we demonstrate that the diffusion coefficient of metabotropic glutamate receptor 3 is tightly coupled with its functional states including G protein binding and clathrin-dependent endocytosis. Then, we confirmed the generality of diffusion-function relationship to many GPCRs regardless of the coupling specificity to G proteins. The present study provide a novel applicability of the single-molecule imaging in pharmacology and drug screening.

研究分野：生物物理学・薬理学

キーワード：GPCR 1分子イメージング 拡散機能関連 代謝型グルタミン酸受容体

## 1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、光・匂い・味・神経伝達物質・ホルモンなど細胞外さまざまな刺激を受け Gタンパク質を活性化することで、細胞内へと情報を伝える膜タンパク質の総称である。GPCR は低分子薬の約 30%の標的になるなど、創薬において主要な位置を占めている。現状、薬の標的分子となっている GPCR は全体の約 6%に過ぎず、100 種程度はリガンド未知のオーファン受容体である。従来、GPCR の活性評価は下流の細胞応答の計測に依存してきたが、オーファン受容体では下流も未知の場合が多く、何を薬効評価の指標とすればよいか分からない。また、下流が既知の GPCR に対する化合物スクリーニングを行う場合であっても、細胞内在性の他の受容体を介した細胞応答が化合物の評価を難しくするケースが生じる。したがって、標的となる GPCR 自体を計測して化合物の活性を定量する手法の開発が求められる。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の課題を解決するため、GPCR が引き起こす特定の細胞応答を測るのではなく、薬が結合することで GPCR 分子自体に生じる振る舞いの変化から薬効を評価することができないか、生細胞内 1 分子蛍光イメージングを用いて検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 蛍光標識タグ (HaloTag) 配列を融合した GPCR の cDNA の網羅的構築
- (2) 培養細胞 (HEK293 細胞) における GPCR 分子の 1 分子イメージングによる拡散動態定量
- (3) Gタンパク質阻害剤 (百日咳毒素) によるモデル GPCR (mGluR3) の拡散動態変化の解析
- (4) Gタンパク質と mGluR3 の 2 色同時 1 分子イメージングによる共局在解析
- (5) クラスリンノックダウンによる mGluR3 の拡散動態変化の解析
- (6) クラスリンと mGluR3 の 2 色同時 1 分子イメージングによる共局在解析

## 4. 研究成果

2016 年度は、モデルケースとしてクラス C GPCR の一つである代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR3) を用いた検証を行った。HEK293 細胞において、mGluR3 を蛍光色素で標識して全反射蛍光顕微鏡で観察した (図 1a)。撮影した動画の各 mGluR3 の輝点を追跡して軌跡を解析することで、受容体の拡散係数を定量した (図 1b)。さまざまな薬剤条件下で 1 分子イメージングを行い、拡散係数の平均値を比較したところ、mGluR3 が活性化すると動きが遅くなることが明らかになった。

さらに、統計解析を行い、拡散係数に基づいて mGluR3 の状態で分類したところ、速さの異なる四つの拡散状態に分類された (図 1c)。mGluR3 を不活性化する薬をかけると動きの速い分子の割合が増え、遅い分子の割合が減る (図 1d 左)。一方、mGluR3 を活性化する薬をかけると動きの速い分子の割合が減り、遅い分子の割合が増えることが明らかになった (図 1d 右)。

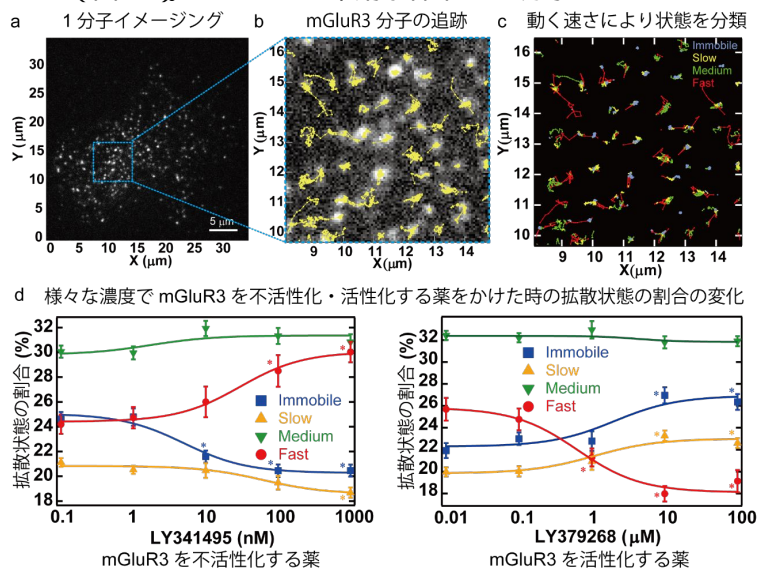


図 1 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR3) の 1 分子イメージングの解析

さらに、Gタンパク質を百日咳毒素で阻害した際に生じる mGluR の拡散状態の変化を定量した。その結果、インバースアゴニスト・アゴニスト存在下の双方で、mGluR の拡散が遅くなることが示された。特に拡散の変化はインバースアゴニスト存在下で著明であり、mGluR が Gタンパク質と不活性化状態においても結合した状態が存在し、この状態が速い拡散係数を持つことが示唆された。

また、mGluR で同定した拡散・機能相関の一般性を検証するために、進化的に異なるファミリーに属する 8 種類の GPCR について、同様に 1 分子計測を行った。アゴニスト依存的な拡散係数の変化を定量した結果、計測したすべての GPCR で活性化依存的な拡散係数の低下が認められた(図 2)。したがって、ホモロジーや下流のシグナル伝達経路を問わず、幅広い GPCR の活性を拡散係数という単一の指標で定量できることが示された。

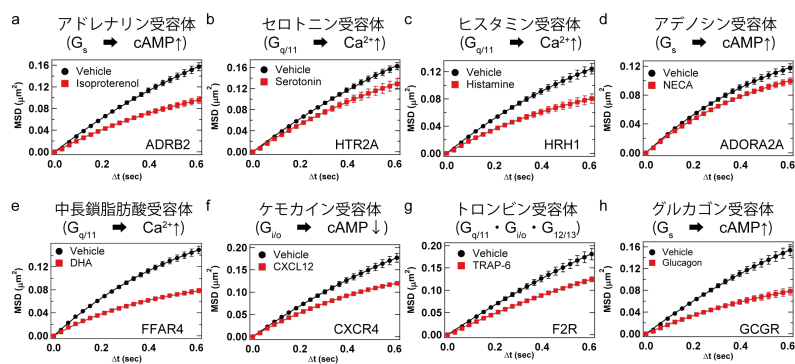


図 2 他の GPCR の薬刺激による拡散範囲の平均値の変化

2017 年度は、G タンパク質と mGluR3 の 2 色同時 1 分子計測を行い、両者の複合体の拡散動態を定量した。その結果、mGluR3 は活性・不活性状態を問わず G タンパク質と短期間相互作用することが明らかになり、この相互作用は百日咳毒素により阻害されることが示された。また、G タンパク質と相互作用中の mGluR3 は速い拡散状態を採る確率が高いことが示され、昨年度の百日咳毒素による阻害実験から間接的に示唆された結果を直接的に検証できた。

一方、GPCR のエンドサイトーシスに関わるクラスリンをロックダウンした際には、アゴニスト刺激時の拡散係数の低下が抑制されることが示された。さらに、クラスリンと mGluR3 についても 2 色同時 1 分子計測を行なったところ、クラスリンと相互作用中の mGluR3 は静止したの多いことが示された。以上の解析から、薬をかけた際に生じる mGluR3 の動きの変化は、これらの機能状態の割合が変化することを反映したものであることが推定された(図 3)。

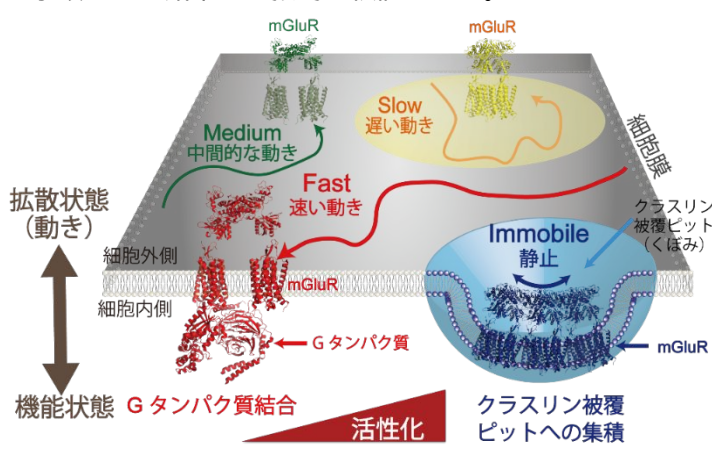


図 3 mGluR3 の生細胞膜中の動きと機能状態の関係

また、2017 年度は、昨年度に計測した 9 種の GPCR に加え、305 種の GPCR について蛍光標識用の HaloTag を融合したクローンの作製を行った。シームレスクローニングとランダム PCR を組み合わせてスクリーニングを行うことで、HaloTag 融合 GPCR の作製は順調に進み、計 314 種の GPCR について 1 分子イメージングを可能な状況を構築できた。

2018 年度は、昨年度までに計測した、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR3)の生細胞内 1 分子イメージングの結果と、mGluR とは異なるファミリーに属する GPCR8 種の 1 分子計測について論文発表・学会発表・プレスリリースを行った。

さらに、2018 年度は、昨年度まで作成した 314 種の HaloTag 融合 GPCR のうち、計 24 種に關しても 1 分子イメージングを行った。その結果、計測したすべての GPCR で G タンパク質共役特異性に依らず、アゴニスト刺激依存的に拡散が遅くなることが示され、1 分子イメージングを用いた薬効評価がより広範な受容体に適用できることが明らかになった。

本研究により、GPCR の拡散と機能の関係は多くの GPCR に広く共通しており、活性化した GPCR の動きは遅くなることが明らかになった。したがって、1 分子イメージングにより GPCR の動きを見ることで新規化合物が GPCR にどのような作用を及ぼすか推定できると考えられる。

今後は、作成したすべての GPCR について 1 分子イメージングを行い、比較解析を行う予定である。また、本研究では、mGluR3 と G タンパク質・クラスリン結合のそれぞれが異なる拡散状態変化に寄与することを示した。今後は GPCR の拡散動態と多様な機能状態との対応関係をさらに解析することで、単一計測で GPCR のシグナルバイアスを定量できる手法に昇華していきたい。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

“ Single-molecule diffusion-based estimation of ligand effects on G protein-coupled receptors ”

Yanagawa M, Hiroshima M, Togashi Y, Abe M, Yamashita T, Shichida Y, Murata M, Ueda M, Sako Y

Science Signaling 11(548) eaao1917 2018 年 ( 原著論文 : 査読有 )

doi: 10.1126/scisignal.aao1917.

“ Lipid-Protein Interplay in Dimerization of Juxtamembrane Domains of Epidermal Growth Factor Receptor ”

Maeda R, Sato T, Okamoto K, Yanagawa M, Sako Y

Biophysical journal 114(4) 893-903 2018 年 ( 原著論文 : 査読有 )

doi: 10.1016/j.bpj.2017.12.029.

“ Adaptation of cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation ”

Kojima K, Matsutani Y, Yamashita T, Yanagawa M, Imamoto Y, Yamano Y, Wada A, Hisatomi O, Nishikawa K, Sakurai K, Shichida Y

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114(21) 5437-5442 2017 年 ( 原著論文 : 査読有 )

doi: 10.1073/pnas.1620010114.

“ Single-molecule fluorescence imaging of RalGDS on cell surfaces during signal transduction from Ras to Ral ”

Yoshizawa R, Umeki N, Yanagawa M, Murata M, Sako Y

Biophysics and physicochemistry 14 75-84 2017 年 ( 原著論文 : 査読有 )

doi: 10.2142/biophysico.14.0\_75.

「細胞膜受容体の1分子イメージング」

柳川 正隆, 佐甲 靖志

生体の科学 68(5) 386-387 2017 年 ( 総説 : 査読無 )

### [ 学会発表 ] ( 計 16 件 )

「1分子イメージングを用いたGPCRの薬理学に向けて」

柳川 正隆. 第56回日本生物物理学会年会, 2018年, (招待講演)

「1分子拡散動態を指標にしたGPCRの活性評価」

柳川 正隆. 蛋白研セミナー: 生体膜上の生物化学2018, 2018年, (招待講演)

「MCF細胞内におけるp52ShcのGrb2シグナル伝達制御」

吉澤 亮, 梅木 伸久, 柳川 正隆, 村田 昌之, 佐甲 靖志.

第56回日本生物物理学会年会, 2018年

“ Single-molecule pharmacology of a G protein-coupled receptor ”

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

International Symposium on Biophysics of Rhodopsins, Japan, 2017 ( 招待講演 )

“Single-molecule imaging-based estimation of GPCR activity”

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. 日本生物物理学会第 55 回年会, 2017 年

“Single-molecule pharmacology of a GPCR”

Masataka Yanagawa, Michio Hiroshima, Yuichi Togashi, Takahiro Yamashita, Yoshinori Shichida, Masahiro Ueda, Masayuki Murata, Yasushi Sako  
University of Strasbourg-RIKEN Workshop on Membrane Lipidology, France, 2017 年

“Single-molecule imaging-based estimation of GPCR activity”

柳川 正隆,  
理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 IX」, 2017 年

“p52SHC translocation to the plasma membrane of MCF7 cells”

吉澤 亮, 梅木 伸久, 柳川 正隆, 村田 昌之, 佐甲 靖志.  
日本生物物理学会第 55 回年会, 2017 年

“Evolutionary acquisition of low thermal noise of cone pigments for scotopic vision”

小島 慧一, 松谷 優樹, 柳川 正隆, 山下 高廣, 今元 泰, 久富 修, 山野 由美子, 和田 昭盛, 七田 芳則. 日本生物物理学会第 55 回年会, 2017 年

“Comparison of thermal activation rates between vertebrate visual pigments and pinopsin”

山下 高廣, 佐藤 恵太, 小島 慧一, 酒井 佳寿美, 松谷 優樹, 柳川 正隆, 山野 由美子, 和田 昭盛, 岩部 直之, 大内 淑代, 七田 芳則. 日本生物物理学会第 55 回年会, 2017 年

「1 分子拡散動態を指標にした GPCR の活性評価」

柳川 正隆  
研究会「理論と実験」, 広島大学, 2017

「1 分子動態を指標とした Class C GPCR の活性推定」

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  
第 13 回 GPCR 研究会, 2016 年

“Comparative analysis of diffusion-function relationship of G protein-coupled receptors on the living cell surface”

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  
日本生物物理学会第 54 回年会, 2016 年

“Elucidation of the EGF dependent localization mechanism of RalGDS molecule to plasma membrane using TIRF microscopy”

吉澤 亮, 梅木 伸久, 柳川 正隆, 村田 昌之, 佐甲 靖志.  
日本生物物理学会第 54 回年会, 2016 年

“Thermal activation rates of visual pigments expressed in rods”

Keiichi Kojima, Yuki Matsutani, Masataka Yanagawa, Takahiro Yamashita, Yasushi Imamoto, Osamu Hisatomi, Yumiko Yamano, Akimori Wada, Yoshinori Shichida  
日本生物物理学会第 54 回年会, 2016 年

「1 分子動態を指標にした GPCR の活性推定」

柳川 正隆  
細胞動態システム科学研究会 2016 (招待講演)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 2 件）

名称：METHOD FOR EVALUATING ACTIVITY OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (GPCR)  
発明者：Masataka Yanagawa, Yasushi Sako, Michio Hiroshima, Masato Yasui, Masahiro Ueda, Yuichi Togashi  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 15/957406  
出願年月日：2018 年 4 月 16 日  
国内外の別： 国外

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 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

プレスリリース 細胞膜の受容体1分子の動きから薬効を評価 - 活性化したGPCR分子の動きは遅くなる -  
[http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180919\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180919_1/)

理化学研究所 佐甲細胞情報研究室ホームページ 論文発表等  
(論文へのオープンアクセスリンク)  
<http://www2.riken.jp/cell-info/publication/>

6 . 研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。