

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07396

研究課題名(和文) 三量体Gタンパク質シャトリングによる走化性ダイナミックレンジ拡張機構

研究課題名(英文) Broad dynamic range regulation in eukaryotic chemotaxis by trimeric G protein shuttling

研究代表者

上村 陽一郎 (Kamimura, Yoichiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：20321599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞性粘菌や白血球のような走化性細胞は広い濃度レンジに渡って化学物質の濃度勾配に応じた細胞運動を示す。濃度レンジ拡張には三量体Gタンパク質の空間制御であるGタンパク質シャトリングが必要である。本研究では、Gタンパク質シャトリング機構の中心となるGタンパク質とその結合因子であるGip1の複合体形成について構造に基づいた理解に到達した。Gip1は疎水性の穴を持つカゴ状の構造を持ち、この穴にGタンパク質ガンマサブユニットの脂質修飾が刺さることで複合体形成をしていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

走化性は初期発生、免疫応答などで重要な機能を持つ。細胞性粘菌や白血球のような走化性細胞は化学物質の濃度勾配に沿った細胞運動を、広い濃度範囲にわたって行うことが知られている。濃度勾配情報はGPCRシグナリングによって処理される。走化性物質の濃度が高くなると、三量体Gタンパク質が細胞質から細胞膜へと局在を変えるGタンパク質シャトリングが必要になる。この制御にはGタンパク質結合因子Gip1が必須の役割を持つ。本研究ではGip1の構造から三量体Gタンパク質との複合体形成機構を明らかにし、Gタンパク質シャトリングの分子基盤について理解を深めた。

研究成果の概要(英文)：Chemotactic cells, such as Dictyostelium discoideum cells or neutrophils, can migrate along chemical gradients over its broad ranges. The dynamic ranges are expanded by trimeric G protein shuttling between the cytoplasm and plasma membrane. Gip1 binds to and dissociates from cytosolic G proteins. This study revealed that Gip1 had a cylinder-like fold with a central hydrophobic cavity by an X-ray crystal structural analysis. The Gip1 cavity underlies the complex formation with G proteins which provides a binding site through the lipid modification of its gamma subunit.

研究分野：細胞生物学

キーワード：走化性 三量体Gタンパク質 ダイナミックレンジ制御 三量体Gタンパク質シャトリング Gip1 細胞性粘菌

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白血球や細胞性粘菌などの走化性細胞は、外界にある化学物質のわずか1%程度の濃度差を10万倍にも及ぶ広い濃度レンジで知覚することができる(J.Cell.Biol.,75, p606,1977; J.Cell.Biol.,108,p973,1989)。細胞性粘菌は栄養が枯渇すると自らcAMPを細胞外に分泌し走化性応答を示す。cAMPに対する走化性応答は最も研究が進んでいるモデルシステムである。cAMPはGタンパク質共役型受容体(GPCR)cAR1に結合し、三量体Gタンパク質(以下、Gタンパク質) $G\alpha 2-G\beta\gamma$ によって下流にシグナルを伝える。これまでの研究では、cAMP受容体が刺激依存的にリン酸化を受け、cAMPに対する感受性を下げること、ダイナミックレンジが拡張していると考えられてきた。しかし、リン酸化がおこらないような変異受容体でも、ダイナミックレンジへの影響はわずかであり(J.Biol.Chem.,272,p27313,1997)その他の分子機構の存在を示唆するものであった。

我々は走化性物質のセンシング機能を調節する因子を探索し、Gタンパク質と結合するGip1(G-protein interacting protein 1)を同定した(PNAS,113,p4356,2016)。面白いことにGip1破壊株では高濃度での走化性能が顕著に低下しており、Gip1が走化性におけるダイナミックレンジ調節に極めて重要であることがわかった。また、細胞膜で機能するGタンパク質が細胞膜と細胞質を行き来する「Gタンパク質シャトリング」という現象を見出し、この反応にGip1が必要であるところを明らかにした。これまでの結果からダイナミックレンジ拡張機構について次のような新たなモデルを提唱している。(1)Gip1はGタンパク質と結合し、その一部を細胞質プールとして維持する。(2)走化性物質の刺激によってGタンパク質シャトリングが変調を受け、細胞質中のGタンパク質が細胞膜へと移行する。(3)このようなGタンパク質の空間制御によって、Gタンパク質が細胞膜上で再分配され、枯渇することなく高濃度側でも十分な勾配情報を獲得できる。GPCRシグナリングには多くの研究があるものの、このようなGタンパク質の空間制御はほとんど知られていない。走化性ダイナミックレンジ調節におけるGタンパク質の空間制御の分子基盤を明らかにすることで、真核生物で広く保存されているGPCRシグナリングの理解を深めることに繋がる。

2. 研究の目的

本研究では、走化性のダイナミックレンジを広く維持する分子基盤を理解する。走化性細胞は、約10万倍の濃度レンジにわたって走化性応答を示す。申請者はこのダイナミックレンジ制御に三量体Gタンパク質の細胞内シャトリングという空間制御が関与することを見出した。細胞内シャトリングは走化性物質の勾配下で適切な量のGタンパク質を反応の場である細胞膜に供給することで、ダイナミックレンジを拡張している可能性が高い。そこで、Gip1とGタンパク質の結合様式を明らかにすることで、Gタンパク質の空間制御を理解することを試みた。

3. 研究の方法

Gip1とGタンパク質の結合様式を明らかにするために、以下の研究を実施した。

(1) Gip1のGタンパク質結合ドメインのX線結晶構造解析。

Gip1はN末端側にPHドメイン、C末端側にGタンパク質との結合ドメインを持つ。本研究では、Gタンパク質結合ドメインであるGip1のC末端側を大腸菌で大量発現し、精製、結晶条件を検討した。作製した結晶を用いてX線を照射し、回折を得た。このデー

- タを使い構造モデルを構築した。
- (2) 生化学的、遺伝学的手法による G タンパク質の Gip1 結合部位の同定。
G タンパク質側の Gip1 結合部位を同定するため、まず、 α サブユニット、 $\beta\gamma$ サブユニットへの結合性を生化学的に解析した。その結果、 $\beta\gamma$ サブユニットが主に結合に関与することがわかった。そこで、次に γ サブユニットに注目し脂質修飾部位を欠失した変異を作製し、生化学的、遺伝学的に Gip1 との結合性とシャトリング機能について調べた。
- (3) Gip1 網羅的変異導入法による G タンパク質結合とシャトリング機能の相関解析。
X 線結晶構造解析から Gip1 は疎水的な穴を持つカゴ状の構造をしていることがわかった。我々はこの穴に G タンパク質の γ サブユニットの脂質修飾が刺さることで複合体を形成していると予測した。そこで、疎水的な穴を形成するアミノ酸に比較的大きな側鎖を持つトリプトファン置換を網羅的に導入し、G タンパク質との結合性とシャトリング機能を検討した。また、G タンパク質との結合に重要な部位を同定するため、Gip1 に対して網羅的アラニンスキャニング変異を導入し、G タンパク質との結合性とシャトリング機能を検討した。
- (4) G タンパク質シャトリングと走化性ダイナミックレンジの機能相関解析。
トリプトファン、アラニン変異を導入した Gip1 で G タンパク質との結合に異常を示したのものについて、走化性ダイナミックレンジをマイクロピペットアッセイと 2-ドロップアッセイにより評価した。マイクロピペットアッセイでは、濃度勾配を走化性物質である cAMP を詰めたガラスピペットを使い形成する。この勾配に対する粘菌細胞の走化性応答を評価した。2-ドロップアッセイでは、粘菌細胞の懸濁液と 10 nM~1 mM の cAMP 溶液の液滴を 2 mm の間隔で並置し、液滴内の細胞が cAMP 溶液側に移動するか否かで走化性の応答を評価した。

4. 研究成果

Gip1 の G タンパク質との結合ドメインについて X 線結晶構造解析に成功した (Nature Commun., 9, 4635, 2018)。このドメインは 6 つのヘリックスがカゴ状構造をとりその中央に疎水性の穴が空いていた (図 1)。また、この穴の中にはタンパク質を調整した大腸菌由来の脂質分子が確認された。これは、Gip1 の疎水性の穴に三量体 G タンパク質の脂質修飾部位が刺さることで複合体を形成していることを示唆した。

次に、Gip1 との結合に必要な G タンパク質側サイトを決定した。まず、G タンパク質の α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットのどちらが Gip1 との結合に関与するかを調べた。その結果、 $\beta\gamma$ サブユニットが主要な役割を果たしていることがわかった。 γ サブユニットの C 末端側は脂質修飾される CAAX 配列を持っており、実際ゲラニルゲラニル化されていることを確認した。CAAX サイトを欠失した $\beta\gamma$ サブユニット (Δ CAAX) を作製し細胞内で機能を調べた。その結果、変異 $\beta\gamma$ (Δ CAAX) は細胞膜に局在することができず、栄養飢餓による子実体形成にも異常を示した。次に、細胞内あるいは *in vitro* で Gip1 と $\beta\gamma$ サブユニットの結合をプルダウンにより調べたところ、野生型 $\beta\gamma$ サブユニットで観察された結合が変異 $\beta\gamma$ (Δ CAAX) では観察されなかった (図 2)。これらのことより、 $\beta\gamma$ サブユニットの脂質修飾は、G タンパク質の細胞膜への局在に加えて Gip1 の結合に必須であることが明らかとなった。

これらの結果は、Gip1 の疎水性の穴が $\beta\gamma$ サブユニットの脂質修飾との結合に関与していることを強く示唆していた。そこで、Gip1 の疎水性の穴を形成するアミノ酸残基を構造情報に基づき抽出し、トリプトファン残基に置換した。トリプトファンの側鎖は比較的大きいため、Gip1 の

穴を物理的に塞ぐことが期待された。実際これらの変異 G γ 1 の多くが G タンパク質と結合できないことをプルダウンにより確認した。野生株では G タンパク質は細胞膜に加えその一部は細胞質に局在する。しかし、トリプトファン変異 G γ 1 を持つ細胞は細胞質 G タンパク質が見られず、細胞膜にのみ局在した。これらの結果から、G γ 1 の疎水性の穴が G タンパク質との結合に参与していることが確認された。

さらに、G γ 1 の疎水性の穴以外に G タンパク質との結合に必要な部位がないかを網羅的アラニンスキャンニングにより調べた。その結果、G γ 1 の C 末端が重要であることがわかった。この部分は穴の形成には関係なく、穴の入り口部分の形成に重要な役割を果たすようであった。

我々はすでに G γ 1 が cAMP に対する走化性のダイナミックレンジを高濃度側に拡張することを見出している。そこで、G タンパク質と結合できない変異 G γ 1 を持つ細胞の走化性能を調べた。これらの変異株では gip1 破壊株同様、高濃度域での走化性効率が低下していた。これらのことから、G γ 1 は穴を介して G タンパク質と結合することで正常に機能し、粘菌細胞が高濃度の誘引物質に対して効率的に走化性運動をするために重要であることがわかった。

最後に、今回の研究では G γ 1 の立体構造を 2 種類明らかにした。この 2 種類の全体像はほぼ同じであるものの、G γ 1 の一部が内部に押し込まれて疎水性の穴がへこみ、穴の大きさに違いが出ていた。以前の観察から、細胞外の誘引物質刺激によって G タンパク質は G γ 1 から離れ、細胞質から細胞膜へとその居場所を変えることがわかっていた。おそらく、G γ 1 は細胞外からの刺激があると、穴の大きさを変化させることで、G タンパク質との結合の強さを調節しているのではないかと予想された (図 3)。

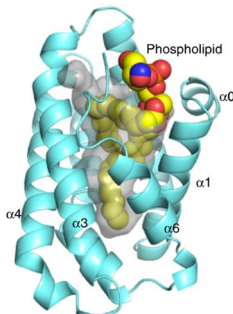


図 1 . G γ 1 の G タンパク質結合ドメインの X 線結晶解析モデル。

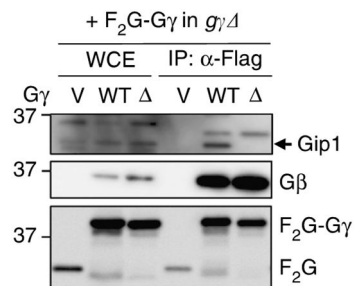


図 2 . G タンパク質 γ サブユニットの脂質修飾が G γ 1 との結合に必要。野生型 G γ (WT) と脂質修飾欠失変異 (Δ CAAX) をプルダウンし、G γ 1 との共沈降をウェスタンブロット解析。

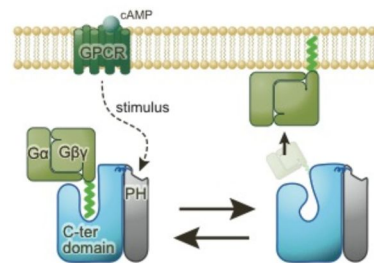


図 3 . G γ 1 依存的 G タンパク質シャットリングモデル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Senoo Hiroshi, Kamimura Yoichiro, Kimura Reona, Nakajima Akihiko, Sawai Satoshi, Sesaki Hiromi, Iijima Miho	4. 巻 21
2. 論文標題 Phosphorylated Rho-GDP directly activates mTORC2 kinase towards AKT through dimerization with Ras-GTP to regulate cell migration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 867 ~ 878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-019-0348-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamazaki Shin-ichi, Hashimura Hidenori, Morimoto Yusuke V., Miyanaga Yukihiro, Matsuoka Satomi, Kamimura Yoichiro, Ueda Masahiro	4. 巻 525
2. 論文標題 Talin B regulates collective cell migration via PI3K signaling in Dictyostelium discoideum mounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 372 ~ 377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 上村陽一郎、上田昌宏	4. 巻 272
2. 論文標題 三量体G蛋白質シャトリング制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 605 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyanaga Yukihiro, Kamimura Yoichiro, Kuwayama Hidekazu, Devreotes Peter N., Ueda Masahiro	4. 巻 507
2. 論文標題 Chemoattractant receptors activate, recruit and capture G proteins for wide range chemotaxis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 304 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanabe Yuki, Kamimura Yoichiro, Ueda Masahiro	4. 巻 131
2. 論文標題 Parallel signaling pathways regulate excitable dynamics differently to mediate pseudopod formation during eukaryotic chemotaxis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs214775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.214775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyagawa Takero, Koteishi Hiroyasu, Kamimura Yoichiro, Miyanaga Yukihiko, Takeshita Kohei, Nakagawa Atsushi, Ueda Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural basis of Gip1 for cytosolic sequestration of G protein in wide-range chemotaxis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07035-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 真核微生物、細胞性粘菌をモデルとした走化性応答に関する研究
3. 学会等名 第22回真核微生物交流会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 走化性ダイナミックレンジ制御における三量体Gタンパク質の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 走化性濃度勾配センシングにおける三量体Gタンパク質制御
3. 学会等名 2020年 生体運動研究合同班会議プログラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 Structural basis of Gip1-mediated G protein shuttling which regulates broad dynamic range chemotaxis
3. 学会等名 Annual Interantional Dictyostelium Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 走化性における勾配認識機構
3. 学会等名 第52回つくば藻類プロティストフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 細胞性粘菌リソースと研究への利用
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 NBRP細胞性粘菌事業とその利用(2018年)
3. 学会等名 第8回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 NBRP「細胞性粘菌」:多様な研究分野におけるモデル生物としての可能性
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 The molecular basis of heterotrimeric G protein Shuttling in GPCR signaling
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 ユニークな生活環を持つ真核生物「細胞性粘菌」のモデル生物としての研究の魅力
3. 学会等名 帝京大学バイオ・航空合同セミナープログラム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 Gip1 structure reveals the molecular mechanism of trimeric G protein shuttling for eukaryotic broad range chemotaxis
3. 学会等名 Gordon research conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 細胞性粘菌リソースと研究への利用
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 細胞性粘菌リソースと研究への利用
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村陽一郎、宮川武朗、小手石泰泰、上田昌宏
2. 発表標題 Gip1の構造から見えてきた三量体Gタンパク質シャトリングの分子基盤
3. 学会等名 第14回GPCR研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoichiro Kamimura
2. 発表標題 Heterotrimeric G-protein shuttling via Gip1 extends the dynamic range of eukaryotic chemotaxis.
3. 学会等名 RIKEN CLST meeting (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoichiro Kamimura, Hidekazu Kuwayama, Masahiro Ueda
2. 発表標題 National BioResource Project (NBRP) of cellular slime molds in Japan
3. 学会等名 Annual Interantional Dictyostelium Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村陽一郎、宮川武朗、小手石泰泰、宮永之寛、上田昌宏
2. 発表標題 三量体Gタンパク質の空間制御を可能にする構造基盤
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第7回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村陽一郎、桑山秀一、上田昌宏
2. 発表標題 第4期NBRP細胞性粘菌
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第7回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村陽一郎、桑山秀一、上田昌宏
2. 発表標題 もっと使えるNBRP
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第7回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村陽一郎、宮川武朗、小手石泰泰、宮永之寛、上田昌宏
2. 発表標題 GPCRシグナル伝達系における三量体Gタンパク質シャトリングの分子機構
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村陽一郎、桑山秀一、上田昌宏
2. 発表標題 モデル真核生物「細胞性粘菌」の様々な研究における有用性と活用
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村陽一郎、桑山秀一、上田昌宏
2. 発表標題 ユニークな生活環を持つ真核生物「細胞性粘菌」のモデル生物としての研究の魅力
3. 学会等名 日本細菌学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村陽一郎
2. 発表標題 走化性勾配認識における三量体Gタンパク質制御
3. 学会等名 第10回日本細胞性粘菌学会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村陽一郎、上田昌宏
2. 発表標題 Roles of Gip1 and Ric8 in activation of heterotrimeric G proteins for eukaryotic chemotaxis
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒岩麟平、上村陽一郎、上田昌宏
2. 発表標題 Role of RGSs in gradient sensing by chemotactic cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所 細胞シグナル動態研究グループ http://www.qbic.riken.jp/csd/ja/index.html
--

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