

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08557

研究課題名(和文)代謝型プリン受容体P2Y1Rの膜電位依存性の構造基盤および構造変化の解明

研究課題名(英文)Analyses of voltage dependent structural changes in the metabotropic purinergic receptor P2Y1R

研究代表者

立山 充博 (TATEYAMA, MICHIMIRO)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・准教授

研究者番号：30276472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はP2Y1Rの膜電位依存性が受容体自体によるものか否かの検証および膜電位依存性を生ずる機構の解明であったが、機器の故障等による研究計画の見直しにより当初の目的に達しえなかった。しかしながら、HEK293T細胞発現系を用いた特異的アミノ酸導入およびANAP-VCF計測系の開発、ゲーティング電流記録などの成功による一連の研究から、膜電位変化により起こるP2Y1Rの構造変化は極めて微細で本研究における手法では検出が難しいことが明らかとなった。また、P2Y1Rと配列相同性の高いP2Y12Rを用いた実験から、特定の荷電性アミノ酸残基が膜電位依存性に寄与するのではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gタンパク質共役型受容体には膜電位依存性を示すものがあることが知られている。しかしながら、受容体や作用薬の種類により電位依存的応答が異なるなど不明な点はいまだに多い。本研究により、Gq共役型P2Y1Rが電位依存性を示すのに対し、Gi/o共役型P2Y12Rが電位依存性を示さないこと、また、作用薬であるADPのみならずATPへの応答性もP2Y1Rは膜電位依存的に変化することが明らかとなった。ADPおよびATP、代謝型プリン受容体の多様な生理機能を理解するのに貢献するものと思われる。また、本研究で得られた培養細胞系での目的タンパク質への特異的アミノ酸導入法などは、今後の研究に寄与する。

研究成果の概要(英文)：We had planned to examine whether the conformational changes in metabotropic purinergic receptor P2Y1R is induced by voltage changes and to clarify the mechanisms how P2Y1R senses the changes in the membrane potential. Unfortunately, our questions were to be studied yet, mostly due to the troubles in our experimental apparatuses. We then changed the plan and have established the methods to introduce artificial amino acids into the target proteins expressed in HEK293T cells and to label the specific residue by AANP whose fluorescent intensity was measured under the voltage clamp condition (AANP-VCF). Gating currents were also recorded. Our results suggested that the conformational changes induced by changes in the membrane potential might be subtle in P2Y1R. In addition, difference in the voltage dependence between P2Y1R and P2Y12R suggested that voltage dependence might not be derived from the specific charged residue.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 膜電位依存性 電気生理学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は生体機能調節に関わる重要な膜タンパク質であり、多様な生理活性物質との特異的結合を介して、細胞機能を制御する。このため、GPCRは創薬における標的分子としても位置付けられており、GPCRを介するシグナリング(GPCRシグナリング)機構の詳細に関する研究は重要である。GPCRシグナリングは、リガンドとの結合により受容体が活性化されることで開始されるが、近年、GPCRシグナリングのシグナリング効率が膜電位により変化するという「膜電位依存性」を示す複数のGPCRが報告されており、我々もムスカリン性アセチルコリン受容体I型(M1R)の作用薬親和性が膜電位により変化することを報告した。さらに、先行研究により代謝型プリン受容体I型(P2Y1R)の膜電位依存性を示唆する実験結果を得た。GPCRの膜電位依存性を生ずる機構に関しては、未だ不明な点が多い。P2Y1Rは結晶構造解析から、その立体構造も明らかとなっているため、P2Y1RはGPCRの膜電位依存性を解明する対象の一つとして有用と考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、P2Y1Rが受容体レベルで膜電位依存性を示すか否かを検証し、膜電位依存性を生み出す機構を解明することである。後者に関しては、膜電位依存性に関わるアミノ酸残基の同定や他の代謝型プリン受容体との機能・構造比較などを行い、機構解明を目指す。また、GPCRの膜電位依存性は作用薬により異なることが知られている。P2Y1RはADPのみならずATPにも反応することから、作用薬依存性についても検討する。以上により、GPCRの膜電位依存性の研究に貢献することも、本研究の重要な目的の一つである。

3. 研究の方法

P2Y1Rが受容体レベルで膜電位依存性を示すか否かの検証は、本研究の目的の一つである。このためには、受容体の構造変化を直接的に捉えることが必要となる。これまで、Förster Resonance Energy transfer (FRET) 効率計測により受容体構造変化を解析していたが、P2Y1RのFRET効率変化量が十分でないため、電位依存性について十分な解析ができなかった。そこで、本研究では、電位依存性チャンネルが電位依存性ホスファターゼに用いられるゲーティング電流記録によりP2Y1Rの電位依存性について検討した。また、近年、上記のチャンネルやホスファターゼの膜電位依存性に関する重要なアミノ酸残基の同定には、蛍光人工アミノ酸を特定の部位に導入し、膜電位変化による蛍光強度変化を計測することで導入アミノ酸残基の微小な構造変化を検出するという膜電位固定下蛍光強度計測法(VCF法)が用いられている。そこで、本研究においてもVCF法を導入しP2Y1Rの電位依存性に関与するアミノ酸残基の同定を目指した。

膜電位依存性に関する重要なアミノ酸残基の同定には、P2Y1R以外の代謝型プリン受容体の膜電位依存性と構造を比較することも有用な方法の一つと考えられた。そこで、P2Y1Rと同じように立体構造が報告されているP2Y12Rについて2ポア型カリウムチャンネルの一種であるTHIK1チャンネル活性化を指標として、膜電位依存性の検討を行った。

ムスカリン性アセチルコリン受容体やドパミン受容体では、作用薬により膜電位依存性を示すものと示さないものがあることが報告されている。そこで、本研究においても、P2Y1Rの作用薬としてATPや2MeSADPを用い、THIK-1チャンネル活性化および蛍光タンパク質を付加したP2Y1RとGタンパク質βサブユニットとのFRET解析により、その膜電位依存性を調べた。

4. 研究成果

(1) ゲーティング電流記録

電位依存性イオンチャンネルや電位依存性ホスファターゼは、膜貫通部位1-4から構成され電位センサーと呼ばれる機能的ドメインを有する。電位センサーに位置する陽イオンに荷電した残基群が膜電位変化に伴い、電荷を移動させることでゲーティング電流が記録される。下の図1に、ゲーティング電流記録を示す。実験では、細胞内外の主な陽イオンをN-メチル-D-グルカミンとする溶液を用いることで、HEK293T細胞の内在性電位依存性カリウムチャンネル電流は除外された(図1左)。この実験条件において、電位依存性カリウムチャンネルKv1.5を発現した細胞では、脱分極に伴う非常に速い外向き電流の増加(ONゲーティング電流)と、再分極に伴う緩徐な内向き電流(OFFゲーティング電流)が観察された(図1中央)。細胞膜上に発現した電位センサーの電荷移動がゲーティング電流であるため、電流を積分した値を移動電荷量として評価する。その結果、50%の電荷移動を持たず膜電位($V_{1/2}$)は、 -0.3 mVであった。これは、報告されている $V_{1/2}$ に近い値であり、実験系および解析が適切であることが確認された。しかしなが

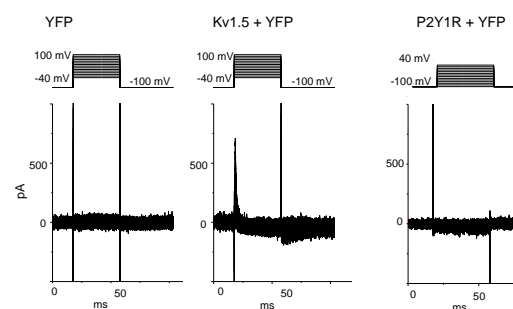


図1 ゲーティング電流

ら、P2Y1R を発現させた細胞から、ゲーティング電流を記録することが出来なかった (図 1 右)。ゲーティング電流の大きさは、細胞膜上に発現するタンパク質量に依存する。そこで、P2Y1R の C 末端に蛍光タンパク質 YFP を付加し、細胞膜上に強い YFP 蛍光を示す細胞を対象としてゲーティング電流記録を試みたが、ON・OFF ゲーティング電流ともに記録できなかった。ムスカリン性アセチルコリン受容体 (M1R および M2R) は、oocyte 発現系でゲーティング電流が記録されていることから、M1R・M2R を HEK293T 細胞に発現させ実験を行ったが、ゲーティング電流の記録に至らなかった。以上により、GPCR のゲーティング電流は非常に小さいこと、HEK293T 細胞発現系は適さない事が明らかとなった。また、oocyte 発現系の実験には、カットオープン法を新たに導入する必要のあることから、蛍光人口アミノ酸を用いた研究を進めた。

(2) 蛍光人口アミノ酸の導入と VCF

蛍光人工アミノ酸を用いた VCF 実験には、よく oocyte が用いられており、所属研究室でも VCF は行われている。しかしながら、VCF 計測系の高い使用状況と新たに計測系を導入するための予算不足により、HEK293T 細胞を用いた VCF 実験を行った。本研究では、蛍光人工アミノ酸として Anap を用いたが、これを導入するには、導入する残基に対応する DNA のコードをアンバーコドンに置き換え、これを認識する tRNA も発現させる必要がある。tRNA をコードする核酸を含んだ vector (AnapVector) を購入し、変異体コンストラクト用 vector を市販の試薬を用いて、HEK293T 細胞に導入した。導入後、培地に蛍光人工アミノ酸である Anap を添加し、16 h 以上培養を行った。

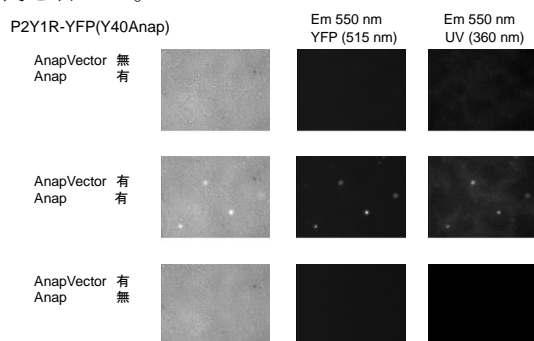


図2 蛍光人工アミノ酸の導入

図 2 に結果を示す。YFP の 40 番目のチロシンをアンバーコドンに変異させた YFP (Y40Anap) を P2Y1R の C 末端に付加したコンストラクト P2Y1R-YFP (Y40Anap) の遺伝子導入を行った。AnapVector の導入されないと、Anap が取り込まれず、YFP が合成されない (図 2 上段)。また、ANAP を添加しなくても同様な結果を得た (図 2 下段)。また、360nm の励起光により 550nm での蛍光が得られたことから、Anap 導入コンストラクト発現が確認された。

P2Y1R の特定部位に Anap を導入することが可能となったので、VCF 実験を行った。P2Y1R の 325 番目のフェニルアラニンを Anap に置換したコンストラクト (F325Anap) を使い、360 nm 励起による 550 nm の蛍光強度を計測した。膜電位を -80 mV に固定し脱分極パルスを与えたが、膜電位変化に対応した蛍光強度の変化は認められなかった。W176Anap、F188Anap、Y210Anap、N316Anap などを用いても膜電位変化に伴う蛍光強度変化は認められなかった。これらの結果は、Anap の導入部位が適切でないこと、もしくは計測系の検出感度が低いことによりもたらされると考えた。そこで、F515 に Anap を導入した膜電位依存性ホスファターゼを用いて同様の実験を行ったところ、膜電位変化に対する蛍光強度変化が認められなかった。この結果は、培養細胞に Anap コンストラクトを発現させるといふ我々の VCF 実験では、十分な検出感度が得られないことを意味する。Anap は蛍光色素としては暗く、褪色も早いことが知られているため、Anap に代わり 4 アジドフェニルアラニンを P2Y1R に導入し、このアジド基に蛍光色素を特異的に反応し VCF 実験に用いることを考えた。4 アジドフェニルアラニンの導入には成功したが、細胞が生きた状態で蛍光色素を反応させる条件を見出すに至らなかった。

(3) P2Y12R の膜電位依存性

P2Y12R は Gi/o 共役型受容体に分類され、ADP や ATP により活性化される。また、その立体構造が報告されている受容体でもあり、P2Y1R との相同性も高い。このため、マウス P2Y12R の cDNA をクローニングして、P2Y12R の膜電位依存性について調べた。3 つの細胞から膜電位を脱分極 (40 mV)・過分極 (-80 mV) に保持した条件で濃度作用曲線を得た (図 3)。右図に示すように、P2Y12R の作用薬に対する反応性は膜電位による影響を受けなかった。P2Y1R の膜電位依存性は第 7 膜貫通部位のアスパラギン酸残基 (D320) をアラニンに変異させることで失われたことから、この部位が電位依存性に重要な働きを持つことは明らかであったが、P2Y12R も同様にアスパラギン酸残基 (D300) を保持しながら電位依存性を示さなかったことから、このアスパラギン酸残基が膜電位依存性を決定づけるものではないことが明らかとなった。

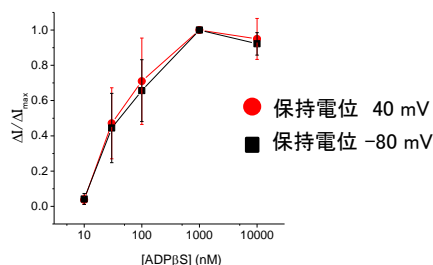


図3 P2Y12Rの濃度作用曲線

(4) 異なる作用薬に対する電位依存性

ドパミン受容体 D2R やムスカリン性アセチルコリン受容体 (M2R、M3R) などは、作用薬の種類に対し異なる電位依存性を示すことが知られている。そこで、P2Y1R の ATP に対する応答性が膜

電位により影響を受け売るか否かについて調べた。KCNK13 電流増加作用については、膜電位を 0 mV に保持したときの方が -80 mV に保持した時より高い応答性を示した(図 4 左)。また、P2Y1R と Gq タンパク質間の FRET 計測実験においても、脱分極電位に膜電位を保持したときの方が高い応答性を示すことが明らかとなった(図 4 右)。以上の結果は、P2Y1R の ATP に対する応答性は膜電位に依存し、ADP 同様に脱分極時に応答性が高くなることを意味する。

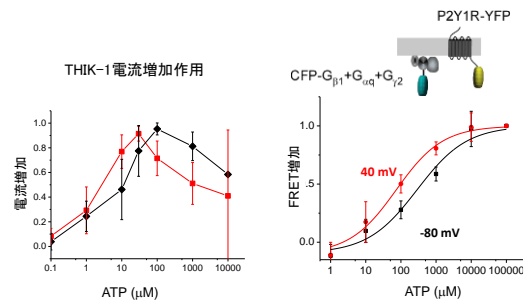


図4 P2Y1Rの電位依存性ATP応答

ADP および ATP は、生体内におけるシグナリング分子として知られているため、これらの分子に対する P2Y1R の電位依存的応答の役割には興味もたれる。

本研究は、P2Y1R 自身の膜電位依存性の有無の検証および膜電位依存性を生ずる機構の解明を目的としたものだが、機器の故障等による研究計画の変更のため、当初の目的に達しえなかった。しかしながら、一連の研究において、HEK293T 細胞発現系を用いた特異的アミノ酸導入の確立および ANAP-VCF 計測の試み、ゲーティング電流記録など実験系を起ち上げることが出来た。特に、ANAP-VCF 計測やゲーティング電流記録の結果から、膜電位変化による P2Y1R の構造変化は極めて微細で検出が難しいことが予想された。構造基盤関については、P2Y1R と高い配列相同性を示す P2Y12R が膜電位依存性を有しないということから、特定の荷電性アミノ酸残基が膜電位依存性に寄与するのではないことが考えられた。また、ATP への膜電位依存的応答性などからもその生理的意義の解明がまたれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Okamoto S, Sato T, Tateyama M, Kageyama H, Maejima Y, Nakata M, Hirako S, Matsuo T, Kyaw S, Shiuchi T, Toda C, Sedbazar U, Saito K, Asgar NF, Zhang B, Yokota S, Kobayashi K, Foufelle F, Ferre P, Nakazato M, Masuzaki H, Shioda S, Yada T, Kahn BB, Minokoshi Y	4. 巻 22
2. 論文標題 Activation of AMPK-Regulated CRH Neurons in the PVH is Sufficient and Necessary to Induce Dietary Preference for Carbohydrate over Fat.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 706-721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.11.102	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 該当する
1. 著者名 Kume S, Shimomura T, Tateyama M, Kubo Y	4. 巻 596
2. 論文標題 Two mutations at different positions in the CNBH domain of the hERG channel accelerate deactivation and impair the interaction with the EAG domain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4629-4650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP276208	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 Aoki I, Tateyama M, Shimomura T, Ihara K, Kubo Y, Nakano S, Mori I	4. 巻 1
2. 論文標題 SLO potassium channels antagonize premature decision making in <i>C. elegans</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0124-5	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 Tateyama M, Kubo Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Gi/o-coupled muscarinic receptors co-localize with GIRK channel for efficient channel activation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0204447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0204447	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 Chen, I.S., Tateyama, M., Fukata, Y., Uesugi, M., & Kubo, Y.	4. 巻 595
2. 論文標題 Ivermectin activates GIRK channels in a PIP2 -dependent, G -independent manner and an amino acid residue at the slide helix governs the activation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 5895-5912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP274871.	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 Okamoto S., Sato T., Tateyama M., Kageyama H., Maejima Y., Nakata M., Hirako S., Matsuo T., Kyaw S., Shiuchi T., Toda C., Sedbazar U., Saito K., Asgar N. F., Zhang B., Yokota S., Kobayashi K., Fougelle F., Ferre P., Nakazato M., Masuzaki H., Shioda S., Yada T., Kahn B.B., Minokoshi Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Activation of AMPK-Regulated CRH Neurons in the PVH is Sufficient and Necessary to Induce Dietary Preference for Carbohydrate over Fat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 706 ~ 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.11.102	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tateyama M, Kubo Y
2. 発表標題 Metabotropic glutamate receptor mGlu2 regulates signaling via Gq-coupled serotonergic receptor
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立山充博、久保義弘
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体mGlu2とGq共役型モノアミン受容体の機能的相互作用
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立山充博、久保義弘
2. 発表標題 Activation of the THIK-2 channel by Gi/o and Gq coupled receptors
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（紙面発表）
4. 発表年 2020年

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