

令和元年6月9日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15105

研究課題名(和文) 走化性における応答濃度レンジ拡張メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of chemotactic range extension mechanism

研究代表者

宮永 之寛 (MIYANAGA, Yukihiro)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：70569772

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)：本研究は、真核細胞の走化性にみられる、数万倍に及ぶ広い濃度範囲で誘引物質の濃度勾配を検知する仕組みを明らかにするために実施した。走化性に関与する三量体Gタンパク質1分子を1分子観察顕微鏡で観察し、生きた細胞の細胞膜上での動態を解析したところ、一般的に考えられているGタンパク質共役受容体(GPCR)と三量体Gタンパク質の相互作用様式とは異なる複合体形成が明らかになった。今回発見したGPCRとGタンパク質の複合体は、細胞の応答濃度の最大値を拡張するのに関与していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、広い濃度範囲で安定して実現される真核細胞の走化性のメカニズム解明において重要なものである。GPCRは視覚や神経伝達物質、ホルモンなどの受容など、様々な生理現象に関わっており、本研究で見出したGPCRとGタンパク質の新たな複合体形成様式は、走化性のみならず、GPCRを介したシグナル伝達全般においても同様に働く可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The wide range sensing of extracellular signals is a common feature of various sensory cells. Eukaryotic chemotactic cells driven by GPCRs and their cognate G proteins are one example. This system endows the cells directional motility towards their destination over long distances. We reveal that the receptor-mediated capturing of G proteins mediate chemotactic signaling at the higher concentration ranges. Single-molecule imaging analysis showed that the activated G subunit forms an unconventional complex with the agonist-bound receptor. This complex formation of GPCR-G increased the membrane-binding time of individual G molecules and therefore resulted in the local accumulation of G. Our findings provide an additional chemotactic dynamic range mechanism in which multiple G protein dynamics positively contribute to the production of gradient information.

研究分野：生物物理

キーワード：走化性 濃度レンジ GPCR Gタンパク質 1分子イメージング 細胞内シグナル伝達 細胞性粘菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の走化性応答では、細胞外の誘引物質の濃度勾配が検知され、濃度勾配に沿って方向性のある移動運動が引き起こされる。走化性研究のモデル生物である細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、数 10 pM～数 10 μ M の広い濃度レンジで誘引物質 cAMP の濃度勾配に対して正の走化性を示す。こうした広い濃度レンジでの走化性は、免疫系の好中球や破骨細胞、或いは神経細胞でも観察され、真核細胞の走化性の一般的な性質と考えられている。しかしながら、広い応答濃度レンジを実現する分子メカニズムはいずれの細胞においても明らかになっていない。

走化性応答では、細胞外の誘引物質の濃度勾配に応じて細胞内でシグナル分子の局在が制御され、結果として濃度勾配に沿ったシグナル分子の前後極性が形成される。広い濃度レンジで応答するには、誘引物質の平均濃度が変化しても濃度勾配の情報が何らかの仕組みで取り出され、シグナル分子の前後極性が形成される必要がある。

細胞性粘菌や好中球の走化性では、G タンパク質共役型受容体を介してシグナル伝達が行われるため、広い濃度レンジにわたって G タンパク質の活性化が調節されると考えられてきた。ところが、細胞性粘菌において G タンパク質の活性化 (G と G サブユニット間の解離反応) を検出する FRET プローブを用いて計測したところ、G タンパク質の活性化自体は数 10 nM の cAMP 濃度で飽和することが明らかとなった。これは、細胞が実際に示す走化性の応答レンジに比べて低い濃度で G タンパク質の活性化が飽和しており、受容体による G タンパク質の活性化だけでは走化性の応答レンジの広さを説明できないことを意味する。このことから、G タンパク質の活性制御以外のメカニズムにより応答レンジが拡張されると考えられる。

2. 研究の目的

真核細胞の走化性では広い濃度レンジ (10 の 6 乗以上) にわたって誘引物質の濃度勾配が検知されるが、その分子メカニズムは明らかになっていない。本研究は、濃度勾配センシングにおける G タンパク質の時空間動態を 1 分子レベルからのイメージング解析により捉え、走化性の濃度勾配センシングにおける濃度レンジ拡張メカニズムを明らかにするのが目的である。

走化性刺激の高濃度領域における両タンパク質の挙動に注目して 1 分子イメージング解析をおこなうことで、高濃度特異的な走化性シグナル伝達のメカニズムを明らかにする。特に、生きた細胞でリアルタイムに G タンパク質 1 分子を可視化し、G タンパク質の拡散や膜との相互作用 (結合・解離反応) を定量することで、誘引物質濃度の変化に対応した G タンパク質の振る舞いの変化を捉える。これにより、高い誘引物質濃度でも正確な濃度勾配をセンスするメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

走化性の濃度勾配センシングにおいては、誘引物質の広い濃度レンジにわたって活性型 G タンパク質の濃度勾配が細胞膜上で形成されると考えられる。そこで、G タンパク質の膜結合性や拡散性など、細胞膜上での挙動を定量的に特徴づける実験系として、申請者がこれまでに構築した細胞内 1 分子観察顕微鏡を活用したライブ 1 分子イメージング解析をもちいた。これにより、細胞膜上の G タンパク質の時空間動態とそれらの誘引物質刺激による変化をナノメートル精度で捉えた。得られたデータを解析することで、G タンパク質が細胞膜と細胞質を行き来する反応過程 (G タンパク質シャットリング) における速度定数 (膜への結合速度と膜から解離

速度)や、膜上での G タンパク質の拡散係数の決定、これらのパラメタの誘引物質濃度に対応した変化を検出した。

特に誘引物質濃度の高いレンジにおける挙動にフォーカスした解析を行い、高濃度誘引物質存在下で特徴的に起こる G タンパク質の挙動を明らかにした。分子レベルの挙動に見られる特徴が、走化性という細胞レベルの表現型にどのように影響するかを調べるため、変異タンパク質を細胞へ導入し分子レベルの挙動を変化させ、細胞の走化性能の変化を定量した。

4. 研究成果

三量体 G タンパク質は G $\beta\gamma$ との相互作用によって細胞膜だけでなく細胞質にも存在していることを既に明らかにしていたが、三量体 G タンパク質の生きた細胞膜上での動態を 1 分子解析したところ、G タンパク質の局在は静的なものではなく、動的に細胞膜と細胞質を行き来していることがわかった。また、一般的に考えられている G タンパク質共役受容体 (GPCR) と三量体 G タンパク質の相互作用様式とは異なる複合体形成が明らかになった。一般的に GPCR は三量体 G タンパク質を相互作用を介して活性化し β と γ のサブユニットに解離させると考えられている。本研究で得られた結果は、活性化し解離した G が GPCR に再び結合することを示していた (図 1)。さらに、この GPCR と G の結合は走化性レンジの拡張メカニズムに重要であることがわかった。GPCR-G は走化性誘引物質濃度に依存して結合しており、その反応は G タンパク質の活性化や G $\beta\gamma$ との相互作用の解消という、これまでに明らかになっていた反応よりも高い濃度依存性を持つものであった (図 2)。新たに見つかった GPCR と G の結合の走化性レンジの拡張メカニズムへの関与を確認するため、GPCR と誘引物質との親和性を変異 GPCR の導入することで変え、新たに見つかった GPCR と G の結合濃度依存性を操作した。その結果、細胞の走化性レンジが操作に同調して拡張されることを見出した。これは、今回新しく確認された GPCR-G の相互作用が濃度レンジを拡張することを示唆している。これは走化性応答のみならず、GPCR を介したシグナル伝達全般において重要な発見である可能性がある。

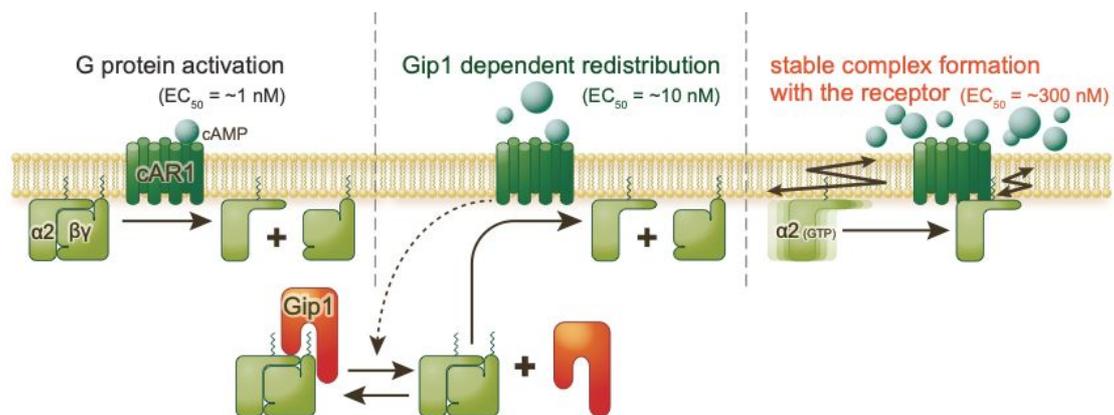


図 1 走化性に関与する G タンパク質の挙動。活性化、Gip1 依存的な局在変化、GPCR との複合体形成の 3 つのイベントがそれぞれ異なる誘引物質濃度で起こることがわかった。

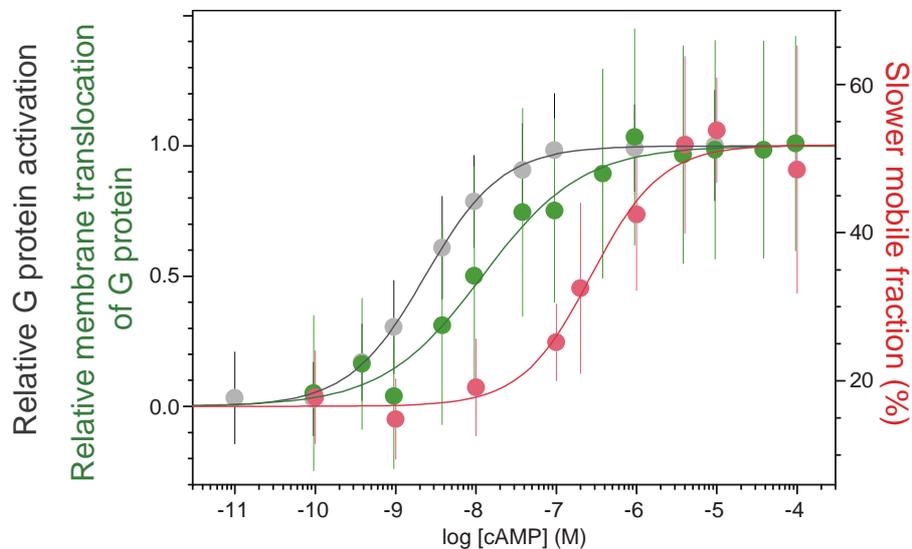


図2 Gタンパク質の活性化(グレー), Gip1 依存的な局在変化(緑), GPCR との複合体形成(赤)の誘引物質濃度依存性。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Miyanaga, Y., Kamimura, Y., Kuwayama, H., Devreotes, P. N., Ueda, M., Chemoattractant receptors activate, recruit and capture G proteins for wide range chemotaxis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 507, 2018, 304-310
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.11.029

宮永之寛, 上村陽一郎, 上田昌宏, 三量体 G タンパク質の局在制御を介した走化性レンジの拡張機構, *生物物理*, 査読有, 58 巻, 2018, 237-240.
DOI: 10.2142/biophys.58.237

Miyagawa, T., Koteishi, H., Kamimura, Y., Miyanaga, Y., Takeshita, K., Nakagawa, A., Ueda, M. Structural basis of Gip1 for cytosolic sequestration of G-protein in wide range chemotaxis, *Nature Communications*, 査読有, 9, 2018, Article number: 4635.
DOI: 10.1038/s41467-018-07035-x

〔学会発表〕(計3件)

宮永之寛, 上村陽一郎, 桑山秀一, 上田昌宏, 走化性 G タンパク質共役受容体は濃度依存的に三量体 G タンパク質の制御機構を切り替えて走化性レンジを拡張する, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018

神谷要平, 宮永之寛, 上田昌宏, 走化性における三量体 G タンパク質の動態, 第 8 回日本細胞性粘菌学会例会, 2018

宮永之寛, 上村陽一郎, 桑山秀一, 上田昌宏, 走化性濃度レンジを拡張する cAR1 と G 2 の複合体形成, 日本細胞性粘菌学会 第 7 回例会, 2017

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。