

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05760

研究課題名（和文）網羅的な細胞内1分子イメージングによるGPCRome解析

研究課題名（英文）Single-molecule imaging-based GPCRome analysis

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：GPCRは薬の主要な標的分子である。本研究では、細胞膜中のGPCRの拡散動態を規定する分子基盤を明らかにすることを目的とし、GPCRとエフェクターの相互作用を1分子レベルで解析した。その結果、アレスチン結合が多くのGPCRに共通した拡散動態変化の主要因であることが分かった。また、アレスチン結合を規定するGPCRのリン酸化がどのように制御されているかをモデル受容体で明らかにした。さらに、網羅的なGPCRの1分子イメージングを実施するための基盤技術を開発した。新たなGPCRの蛍光標識法を確立し、従来の蛍光標識法で生じていた一部のGPCRに対するアレスチン結合が不安定化する問題を解決した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCRが「いつ」「どこで」「どのように」エフェクター分子と相互作用し、細胞外から受容した情報を細胞内へと伝えるのかを解明することは、薬の作用機序を理解する上で重要な課題である。本研究では、GPCRとエフェクターの相互作用を1分子レベルで定量する手法を開発し、細胞内シグナル伝達の空間的な制御機構の一端を解明することに成功した。本研究で開発した細胞内1分子計測・解析のワークフローはGPCRだけでなく他の膜受容体を標的とした薬理学・創薬研究にも応用できると期待される。

研究成果の概要（英文）：G protein-coupled receptors (GPCRs) are major drug targets. In the present study, we analyzed the interaction between GPCRs and their effectors, including G protein, arrestin, and GRKs, at the single molecule level to elucidate the molecular basis that governs the diffusion dynamics of GPCRs in the plasma membrane. As a result, we found that arrestin binding is the main factor of the diffusion dynamics change that commonly observed in many GPCRs. We also revealed how GRK-dependent phosphorylation of GPCRs, which promotes arrestin binding, is regulated in model receptors. In addition, we developed the basic technology to perform comprehensive single-molecule imaging of GPCRs. We established a new fluorescent labeling method for GPCRs, which solved a problem in a conventional labeling method that caused unstable arrestin binding to a specific GPCR.

研究分野：生物物理学

キーワード：GPCR 1分子イメージング 細胞内シグナル伝達 アレスチン エンドサイトーシス ERKシグナル 拡散機能相関

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

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のさまざまな刺激を受け、G タンパク質・アレチンを通じて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。柳川らは過去に代謝型グルタミン酸受容体をモデルとして生細胞内 1 分子イメージングを行い、G タンパク質やクラスリンの結合と連関して受容体の拡散動態が変化することを明らかにした。また、GPCR の系統分類上の様々な位置にある 9 種の受容体に共通して活性化に伴い拡散が遅くなることを示した(Yanagawa et al. *Sci Signal.* 2018)。しかしながら、多様な GPCR に共通する拡散動態変化の背景については未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、網羅的な GPCR の 1 分子イメージングにより、薬刺激が細胞膜中の GPCR の拡散動態を変えるメカニズムを明らかにすることを目的とする。まず、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 S1PR1、アンジオテンシン II 受容体 AGTR1、バソプレシン受容体 V2R をモデルとして GPCR とシグナル伝達分子との相互作用を 2 色同時 1 分子イメージングで解析し、GPCR の拡散・機能相関の詳細を解明する。さらに、多様な GPCR について 1 分子動態計測に基づく比較解析をすることで、拡散動態を規定する GPCR の領域を推定する。

3. 研究の方法

本研究では、HEK293 細胞の親株またはエフェクター分子をロックアウトした細胞株をすべての計測に用いた。実験目的に応じて HEK293 細胞に観察対象の分子をリポフェクションし、1 日後に蛍光標識して細胞内 1 分子イメージングを行った。細胞内 1 分子イメージングは Nikon Ti2E をベースに独自に開発した自動化全反射蛍光顕微鏡システムを用い、本研究で開発した動画解析ワークフローを用いて分子動態を解析した。

具体的には、下記の 8 項目を検討した。

- (1) 網羅的な GPCR の 1 分子計測に向けた顕微鏡計測の自動化・解析ワークフローの改善
- (2) S1PR1 と G タンパク質・アレチンの 2 色 1 分子計測による拡散・機能連関の解析
- (3) 多様なリガンド刺激下で生じる S1PR1 の拡散動態変化の解析
- (4) AT1R と GRK の 2 色 1 分子計測による拡散・機能連関の解析
- (5) 蛍光標識タグ HaloTag による V2R のアレチン結合能の低下の確認
- (6) LgBiT-HiBiT 間相互作用を利用した GPCR の蛍光標識法の検討
- (7) LgBiT 融合 V2R とアレチンの 2 色 1 分子計測による拡散・機能連関の解析
- (8) LgBiT 融合 GPCR をコードする網羅的なプラスミドライブラリの作製

4. 研究成果

2020 年度は、網羅的な 1 分子計測による GPCRome 解析を進めるために必要な細胞内 1 分子イメージングの自動化の条件検討を実施した。また、データ解析のワークフローに関して高速化し、作成した解析プログラム(smDynamicsAnalyzer)を WEB 上に公開した。また、本プログラムの使用方法を含む細胞内 1 分子イメージングの計測・解析の詳細なワークフローについて、Invited Book Chapter に寄稿した(Yanagawa, Sako *Methods Mol Biol.* 2021)。

また、S1PR1 をモデルとした GPCR の拡散・機能相関の解析を実施し、細胞膜中の S1PR1 分子の拡散動態計測から、リガンドの 3 種の経路(G タンパク質・アレチン結合・エンドサイトーシス)に対する薬効を 1 細胞レベルで推定できることが明らかになった。

2021 年度は、AT1R とシグナル伝達分子(Gq・GRK2/5)の相互作用を 2 色同時 1 分子イメージングにより解析した。その結果、刺激前の細胞膜において AT1R・Gq・GRK5 が同じ膜ドメインに集積しており、Gq の活性化の有無に伴い GRK5 の膜ドメイン選択性が逆方向に変化することを突き止めた(図, Kawakami, Yanagawa et al. *Nature Commun.* 2022 から改変)。一方、AT1R は活性化すると Gq の活性化の有無に関わらず、膜ドメインへの集積がより促進される。この Gq 活性化に伴う AT1R・GRK の膜ドメインへの親和性の違いに依存して、AT1R をリン酸化する GRK のサブタイプの選択性が厳密に制御されることが分かった。

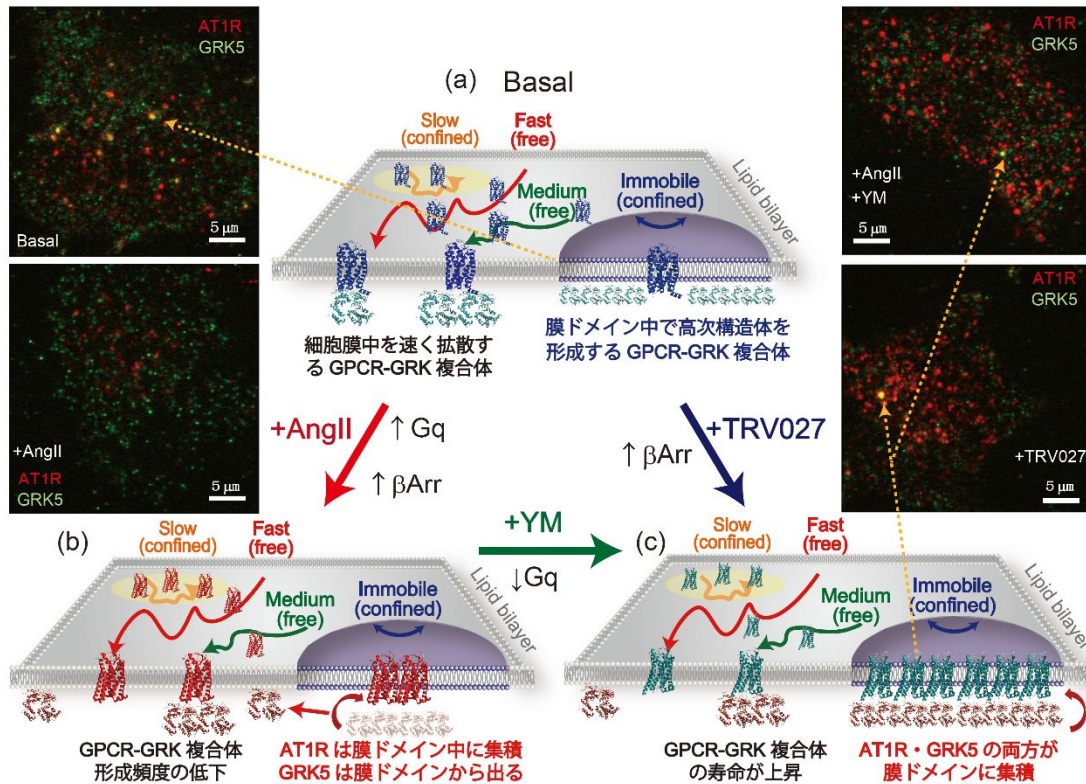


図 2 色 1 分子イメージングによる GPCR・GRK5 複合体の動態解析

- (a) 刺激前に細胞膜において AT1R・GRK5 が高次構造体を形成
- (b) AngII 刺激後の細胞膜において AT1R・GRK5 の複合体形成頻度が低下
- (c) TRV027 (AngII+YM) 刺激後の細胞膜において AT1R・GRK5 複合体の寿命が上昇

また、2020 年度に検討したモデル HaloTag 融合 GPCR の染色手法を用いて 96 ウェルプレートによる自動計測を開始した。しかしながら、GPCR 間の発現量のばらつきや HaloTag リガンドの非特異結合の影響により、多くの GPCR では良好な撮影ができなかった。また、V2R では C 末端領域への HaloTag の融合が、アレスチンの安定な結合を阻害することが明らかになり、他の蛍光標識手法の模索が必要となった。そこで、蛍光化 HiBiT ペプチドを用いた LgBiT 融合 GPCR の標識を検討し、従来法と比較して良好な自動計測できる条件を確立した。

2022 年度は、AT1R・V2R をモデルとし、シグナル伝達分子(アレスチン・クラスリン・Raf)との相互作用を 3 色同時 1 分子イメージングにより解析した。その結果、GPCR とアレスチンの結合様式に応じて、受容体のエンドサイトーシスと ERK 応答のバランスが変化することが分かった。また、細胞膜上でアレスチンは触媒的に Raf を膜移行させ、ERK 応答を引き起こしていることが示唆された。

また、2021 年度に確立した GPCR の蛍光ペプチド標識手法を用いて 96 ウェルプレートによる自動計測を開始した。パイロット実験の結果、手動計測時と同様、多くの GPCR に共通して拡散係数が低下する現象が自動計測でも再現できることを確認した。また、アレスチンをロックアウトした培養細胞では、拡散動態変化が抑制されることが示され、アレスチン結合が拡散動態変化を規定する主要因であることが明らかになった。

以上の研究から、多様な GPCR に共通した拡散動態変化はアレスチン結合と主に連関することが示唆された。GPCR に対するアレスチン結合の様式は少なくとも 3 種類あるが、GPCR のみの 1 分子動態計測でこれらを見分けるのは困難であることが本手法の限界として示された。したがって、1 分子動態計測に基づく高精度な化合物評価には GPCR・アレスチンの同時計測が必要であることが明らかになった。2021 年度中に新規蛍光標識法の開発が必要になったため、本研究で当初予定していた網羅的計測は途上である。しかしながら、研究目的としていた GPCR の拡散動態を規定する要因の解明は進んでおり、今後は GPCR に対するアレスチンの結合様式を見分けるプローブ開発が、本研究のさらなる発展に必要であることが示唆された。

また、本研究で開発した細胞内 1 分子計測・解析のワークフローを用いて、共同研究を実施し、上記以外に 5 件の原著論文を発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Maeda Ryo, Tamagaki-Asahina Hiroko, Sato Takeshi, Yanagawa Masataka, Sako Yasushi	4. 巻 135
2. 論文標題 Threonine phosphorylation regulates the molecular assembly and signaling of EGFR in cooperation with membrane lipids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.260355	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 Kawakami Kouki, Yanagawa Masataka, Hiratsuka Suzune, Yoshida Misaki, Ono Yuki, Hiroshima Michio, Ueda Masahiro, Aoki Junken, Sako Yasushi, Inoue Asuka	4. 巻 13
2. 論文標題 Heterotrimeric Gq proteins act as a switch for GRK5/6 selectivity underlying -arrestin transducer bias	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28056-7	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 Abe Mitsuhiro, Makino Asami, Murate Motohide, Hullin-Matsuda Françoise, Yanagawa Masataka, Sako Yasushi, Kobayashi Toshihide	4. 巻 37
2. 論文標題 PMP2/FABP8 induces PI(4,5)P2-dependent transbilayer reorganization of sphingomyelin in the plasma membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109935 ~ 109935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109935	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 Kojima Keiichi, Matsutani Yuki, Yanagawa Masataka, Imamoto Yasushi, Yamano Yumiko, Wada Akimori, Shichida Yoshinori, Yamashita Takahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Evolutionary adaptation of visual pigments in geckos for their photic environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abj1316	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 Kuwashima Yutaro, Yanagawa Masataka, Abe Mitsuhiro, Hiroshima Michio, Ueda Masahiro, Arita Makoto, Sako Yasushi	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative Analysis of Single-Molecule Dynamics of TRPV1 and TRPV4 Channels in Living Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8473 ~ 8473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168473	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 Akiyama Momoko, Ueki Ryosuke, Yanagawa Masataka, Abe Mitsuhiro, Hiroshima Michio, Sako Yasushi, Sando Shinsuke	4. 巻 60
2. 論文標題 DNA Based Synthetic Growth Factor Surrogates with Fine Tuned Agonism**	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 22745 ~ 22752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202105314	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 Yanagawa Masataka, Sako Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Workflows of the Single-Molecule Imaging Analysis in Living Cells: Tutorial Guidance to the Measurement of the Drug Effects on a GPCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 391 ~ 441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1258-3_32	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 柳川 正隆, 佐甲 靖志	4. 巻 61
2. 論文標題 Gタンパク質共役型受容体の生細胞1分子計測を薬効薬理評価に応用する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 366 ~ 369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.366	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 柳川 正隆, 佐甲 靖志	4. 巻 53
2. 論文標題 GPCRの細胞内1分子イメージング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 12-15
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 Yanagawa Masataka, Sako Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Total workflows of the single-molecule imaging analysis in living cells: a tutorial guidance to the measurement of the drug effects on a GPCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.06.08.141192	査読の有無 無
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 KOJIMA Keiichi, YANAGAWA Masataka, YAMASHITA Takahiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Molecular mechanism underlying color discrimination ability of frogs and geckos in the dark	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hikaku seiri seikagaku(Comparative Physiology and Biochemistry)	6. 最初と最後の頁 122 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3330/hikakuseiriseika.39.122	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 柳川 正隆, 佐甲 靖志	4. 巻 53
2. 論文標題 GPCRの細胞内1分子イメージング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 12-15
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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 GPCRの細胞内1分子イメージング
3. 学会等名 シンポジウム「光といのち（招待講演）」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masataka Yanagawa
2. 発表標題 Single-molecule imaging analysis of G protein-coupled receptor signalosome
3. 学会等名 2022 Chinese Biophysics Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 Single-molecule imaging analysis of G protein-coupled receptor signalosome
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳川 正隆, 阿部 充宏, 佐甲 靖志
2. 発表標題 膜受容体と脂質ドメインの共クラスター化を評価するための3色SMLM解析ワークフロー
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 CMOSカメラを用いた次世代ハイコンテンツ解析への展望
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 細胞内多色1分子イメージングの自動化による次世代ハイコンテンツ解析への展望
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳川 正隆、桑島 佑太朗、阿部 充宏、廣島 通夫、上田 昌宏、有田 誠、佐甲 靖志
2. 発表標題 細胞膜中のTRPV1・TRPV4チャネルの1分子動態の比較解析
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 膜受容体の細胞内1分子計測を 薬効薬理評価に応用する
3. 学会等名 第13回光塾（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 GPCRの細胞膜中の拡散動態計測を薬効薬理評価に応用する
3. 学会等名 機能物性研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川正隆, 桑島佑太郎, 有田誠, 佐甲靖志
2. 発表標題 脂質膜ドメイン間の分配に基づく 膜受容体のシグナル伝達制御
3. 学会等名 生理学研究所 研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 1分子イメージングによる生細胞膜中のGPCRシグナロソーム計測
3. 学会等名 第58回 日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳川正隆, 桑島佑太郎, 有田誠, 佐甲靖志
2. 発表標題 脂質膜ドメイン間の分配に基づく 膜受容体のシグナル伝達制御
3. 学会等名 生理学研究所 研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 1分子イメージングによるGPCR シグナロソームの細胞内動態解析
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 GPCRの細胞内1分子計測に基づく薬効薬理評価
3. 学会等名 第2回 マルチNGSオミクス解析研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yanagawa Masataka, Sako Yasushi	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 447
3. 書名 Methods in Molecular Biology, Vol. 2274, Sung-Bae Kim (Eds): Live Cell Imaging, 978-1-0716-1257-6, 486558_1_En, (Chapter 32)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>シグナル伝達の「偏り」を生み出すリン酸化機構の解明 https://www.riken.jp/press/2022/20220210_2/index.html smDynamicsAnalyzer https://github.com/masataka-yanagawa/IgorPro8-smDynamicsAnalyzer ImageProcessingSMT https://github.com/masataka-yanagawa/ImageJ-macro-ImageProcessingSMT</p>

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