

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790239

研究課題名 (和文) Gタンパク質活性検出 FRET プローブの開発

研究課題名 (英文) Development of FRET probe for detection of G protein activity.

研究代表者

増田 一之 (MASUDA KAZUYUKI)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号：20345151

研究成果の概要 (和文)：本研究では生細胞において GPCR を介した三量体 G タンパク質の活性化を検出する FRET プローブの開発を目的としている。開発した FRET プローブは野生型 G タンパク質と同様に GPCR に共役し、リガンド依存的な FRET シグナルを示した。また、細胞走化時の三量体 G タンパク質活性化の検出を可能とし、G タンパク質活性化後の細胞膜伸張が明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of this study is to develop FRET probe for detecting the activation of heterotrimeric G protein in living cells. The developed FRET probe couples to GPCR like as wild type G protein, shows ligand-induced FRET signal. The leukemia cell line expressed the FRET probe shows membrane protrusion subsequently to G protein activation during chemotaxis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,394,405	420,000	1,814,405
年度			
年度			
年度			
総計	3,294,405	990,000	4,284,405

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：受容体・チャンネル・輸送系・シグナル伝達・RGS

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に発現する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、細胞外からのリガンドと特異的に結合することにより細胞内の三量体 G タンパク質を GDP 結合型から GTP 結合型へ変換する。RGS (Regulator of G protein signaling) は GTP 結合型の G タンパク質と結合し、G タンパク質の GTPase 活性を上昇させる。

生細胞で GPCR による三量体 G タンパク質活性化を測定する場合、これら G タンパク質のシグナル伝達の下流である各種エフェク

ター分子の活性を検出することによる間接的な測定が主である。生細胞におけるシグナル伝達の時間的・空間的な解析を可能とするために、G タンパク質の活性化を直接観察するための FRET プローブの開発が期待されている。これまで FRET プローブについて、GPCR の二量体化やリガンド結合による構造変化、あるいは三量体 G タンパク質の活性変化に伴うサブユニットの解離・結合についての観察が報告されているが、多くの GPCR への汎用性が低く生理的なシグナル測定が出来ていない。

我々はロイコトリエン B_4 (LTB $_4$)受容体BLT1を発現させた細胞においてリガンド刺激により細胞内で活性化された三量体Gタンパク質およびRGSの相互作用をFRET(蛍光共鳴エネルギー転移)により検出するプローブの作成に成功した。またアドレナリン受容体 $\alpha 2A$ を定常発現させた293細胞へFRETプローブを発現させた場合、エピネフリン刺激による同様のFRETシグナル変化が検出できた。作成したFRETプローブがGi共役型のGPCR活性検出に汎用的に利用できることが示唆されるとともに、より改良を進めることにより生理的な応答におけるシグナル測定が可能であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、GPCRへのリガンド結合による三量体Gタンパク質活性化を、各種RGSとGタンパク質の相互作用により検出するFRETプローブの開発を目的としている。とくに生きた細胞において、活性化された三量体Gタンパク質およびRGS相互作用をFRETにより検出し、生理的なGPCRシグナル伝達の時間的・空間的な解析を行う。

三量体Gタンパク質はGiクラスの他にGq、Gs、G12/13クラスがあり、各クラスのGタンパク質ごとに様々なシグナル伝達が行われ生理活性が引き起こされる。また、活性化したGタンパク質と結合するRGS分子もGタンパク質のクラスおよびサブクラスごとに存在する。本研究ではこれらの特異的な組み合わせを利用し、GiクラスGタンパク質の他、GqおよびG12/13クラスGタンパク質の活性化・不活性化を直接検出できるFRETプローブの作成を目指す。

FRETプローブを用いた生細胞内での局在および活性変化についてリアルタイム・イメージングでの解析を進め、同時にFRETプローブの改良を行う。また機能的スクリーニングによるRGS制御因子の探索を試みる。三量体Gタンパク質はGPCRを介する様々な生理活性の初発的な分子である一方で、シグナル伝達の多様性について解析が進んでいない。FRETプローブを用いたシグナル伝達制御因子の探索により、GPCRごとのシグナル伝達の多様性解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) FRETプローブの構築および改良

RGSドメインとG α サブユニット間をリンカーペプチドで接続した分子内FRETプローブにより有効なFRETシグナル変化を得ており、これを基本としたプローブデザインの最適化を進めた。具体的には、Gタンパク質の定常的活性化型変異(G α i1 Q204L mutant相当)およびRGS非相互作用変異(G α i1 G183S mutant相当)の改変体を平行して作成・測定

し、FRETシグナルとして有効なダイナミックレンジを各コンストラクトの組み合わせで比較した。また、Gタンパク質とGPCRの共役に対する蛍光タンパク質の立体障害を回避するため、とくにtetra-cysteineタグ配列結合蛍光色素(TC-F1AsH)を用いたFRETプローブによる検討を進めた。FRET測定に用いる一群のRGSについて約120アミノ酸残基からなるRGSドメインに注目し、このドメイン間での比較を行った。蛍光タンパク質を導入した5種類のRGS(RGS2, RGS4, RGS9, RGS10, GAIP)とGiクラスGタンパク質との相互作用について、Gタンパク質をA1F $_4^-$ で直接活性化した場合のFRETシグナルの上昇の比較測定を行った。RGS10を利用したFRETプローブではGPCRを介したリガンド刺激依存的FRETシグナル変化の測定に成功しており、さらに他のRGSでの実験条件の検討を進めた。また、Gqの活性化についてG α qとRGS2およびRGS3を用いたFRETプローブの作成を進めた。

(2) FRETプローブの生化学的活性測定

RGS10のRGSドメインおよびG α i1サブユニットを用いたFRETプローブ(R10-Gi)について、HEK293細胞に一過性に発現させ、目的タンパク質の発現確認を行った。FRETプローブを構成するG α i1サブユニット部分は百日咳毒素(PTX)非感受性変異を導入し、内在性のGiによる活性の関与はPTX処理を行うことにより除いている。Gi共役型GPCRであるBLT1をモデル受容体として用いた。BLT1定常発現HEK293細胞(BLT1-HEK293細胞)へR10-Giを一過性に発現させ、BLT1のリガンド結合活性、およびR10-Giのリガンド濃度依存性のGタンパク質活性化について測定し、GPCRシグナル伝達におけるFRETプローブ構成分子による作用を調べた。

(3) イメージングによるFRETシグナルの測定

FRETシグナルの測定について、倒立型蛍光顕微鏡および倒立型レーザー走査型共焦点顕微鏡を用いたイメージングにより行った。倒立型蛍光顕微鏡へはフィルターチェンジャーおよびビームスプリッターを組み込んでおり、それぞれ3フィルターでのCollected FRETおよびレシオイメージングを可能にしている。レーザー走査型共焦点顕微鏡ではEmission filterおよび取得する波長域の分光により3フィルター法と同様の画像取得あるいはレシオイメージングを行った。とくに細胞膜に局在するFRETプローブのイメージングでは共焦点顕微鏡による画像を解析に用いた。

さらに生細胞での局所的シグナル伝達と細胞走化性について測定を行った。ヒト白血球由来HL-60細胞は好中球様に分化すること

により、LTB₄に対する走化性を示す。マイクロピペットを用いて溶液中にリガンド濃度勾配を作成し、FRETプローブを発現させた分化型HL-60細胞の応答についてイメージングによる解析を行った。細胞走化時の細胞膜部分の動的なFRETシグナルおよび移動速度の解析は、Active Contourモデルによる輪郭抽出およびElectrostatic Contour Migration法による測定点の追跡を行い、得られたデータについて相関係数を求めた。また相関係数についてブートストラップ法により平均値および信頼区間を求めた。

4. 研究成果

(1) FRETプローブの構築および改良

FRETプローブとして、蛍光色素結合Gαi1サブユニットと蛍光タンパク質を融合したRGSドメインをリンカーペプチドにより連結し一分子化したものを作成した。作成したFRETプローブはBLT1-HEK293細胞に一過性に発現させ、生化学活性測定およびイメージングによるFRETシグナル測定を行った。

RGSドメインについて、5種類のRGS (RGS2, RGS4, RGS9, RGS10, GAIP)を用いて3フィルターによる定量的FRETシグナルの比較を行った結果、RGS10のRGSドメインを用いたFRETプローブ (R10-Gi)の場合に、Gタンパク質活性化によるFRETシグナルの増強が最も大きかった (図1)。R10-Gi発現細胞の膜画分によるウェスタンブロッティングから、人工的に構成しているFRETプローブが目的長で発現していることを確認した。

またGαqについて、同様にRGS2あるいはRGS3を用いたFRETプローブの作成を行い、HEK293細胞に発現させた場合、A1F₄刺激により若干のFRETシグナルの上昇が確認できた。

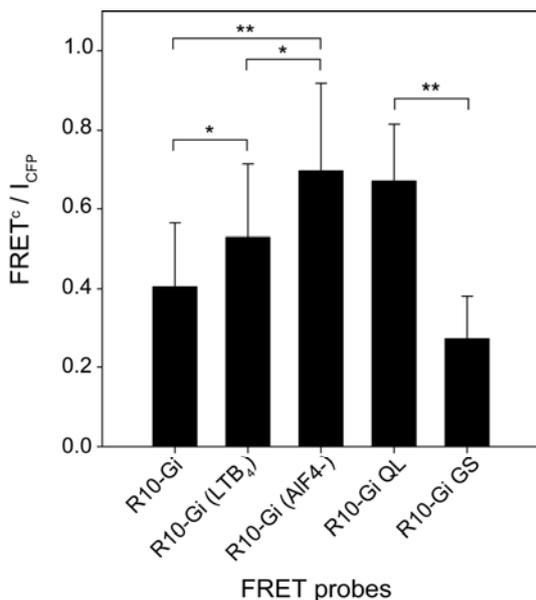


図1. BLT1-HEK293細胞におけるR10-Giおよび

びGタンパク質活性変異体FRETプローブのFRET比

(2) FRETプローブの生化学的活性測定

R10-Gi FRETプローブを発現したBLT1-HEK293細胞の膜画分は、野生型Gタンパク質を発現させた場合と同様にLTB₄濃度依存的GTPγS結合活性を示した (図2)。

またR10-Gi FRETプローブを発現させたBLT1-HEK293細胞の膜画分場合におけるLTB₄結合について、野生型Gタンパク質を発現させた場合と同程度の高親和性リガンド結合活性を確認した (図3)。

これらの結果は、R10-Gi FRETプローブは野生型Gタンパク質と同様に細胞膜でGPCRと共役してGPCRのリガンド結合活性を高親和性にするとともに、リガンド結合GPCRによって活性型であるGTP結合型に変換されることを示している。

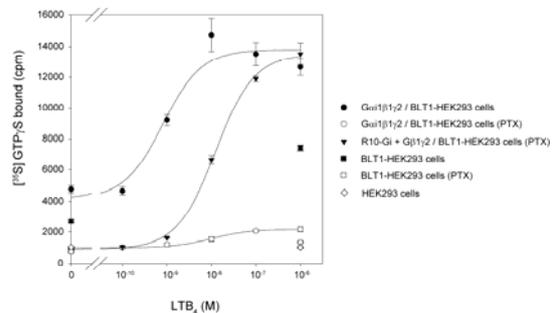


図2. リガンド濃度依存的[³⁵S]GTPγS結合活性

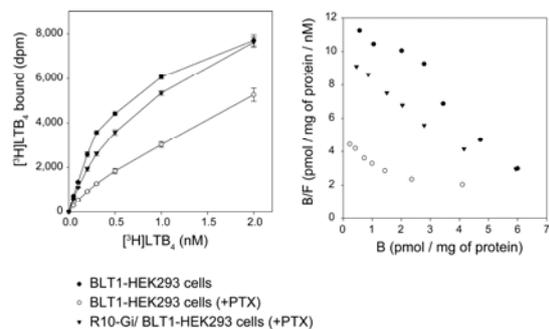


図3. BLT1-HEK293細胞膜画分における[³H]LTB₄結合活性

(3) イメージングによるFRETシグナルの測定

①BLT1-HEK293細胞におけるFRET測定

R10-Gi発現BLT1-HEK293細胞を用いて、3フィルターによる定量的FRET測定 (図1)の他、FRETレシオイメージングによる経時的活性変化の測定を行った。R10-Gi FRETプローブ

ブを発現させた BLT1-HEK293 細胞に LTB_4 を含む緩衝液を灌流させた場合、リガンド結合依存的な FRET シグナル増強を確認した (図 4 上段)。G タンパク質の定常的活性化型変異 ($G\alpha_{i1}$ Q204L mutant 相当) および RGS 非相互作用変異 ($G\alpha_{i1}$ G183S mutant 相当) の各変異体を用いた FRET プローブの場合 FRET シグナルの変化は示さなかった (図 4 中段、下段)。また細胞を BLT1 のアンタゴニストで前処理を行った場合は FRET シグナルの変化を示さなかった。これらの結果から、測定した FRET シグナルの変化は GPCR を介したリガンド結合依存的信号であることを確認した。

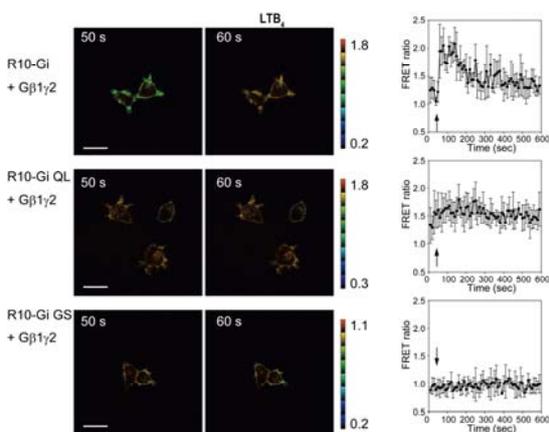


図 4. R10-Gi 発現 BLT1-HEK293 細胞の経時的 FRET シグナル

②分化型 HL-60 細胞における走化性と FRET シグナル

ヒト白血球由来 HL-60 細胞は好中球様に分化することにより、内在性の BLT1 発現量が上昇し、 LTB_4 に対する走化性を示す。今回、生細胞における局所的な G タンパク質活性化と生理活性について観察するため、分化させた HL-60 細胞へ R10-Gi FRET プローブを発現させ、細胞走化性における FRET シグナル変化について測定を行った。マイクロピペットを用いて溶液中にリガンド濃度勾配を作成し、FRET プローブを発現させた分化型 HL-60 細胞の応答について画像測定および画像解析を行った。

FRET プローブを発現させた HL-60 細胞はリガンド濃度勾配に従った走化性を示すとともに、局所的刺激に応じた FRET シグナルを示した (図 5-1)。走化方向における細胞膜の伸長速度と FRET シグナルの強度について相関係数を求めた場合、相関係数のピークは相対時刻 0 より 20 秒程度正にあることが確認できた (図 5-2)。

本研究により、開発した FRET プローブによる生理的な状態での G タンパク質活性の可視化に成功し、細胞走化時における局所的リガンド刺激に応じた GPCR を介する三量体 G

タンパク質の活性化部位およびこれに続く細胞膜伸展の経時変化が明らかとなった。

今後、FRET プローブを用いたシグナル制御因子の探索が期待される。

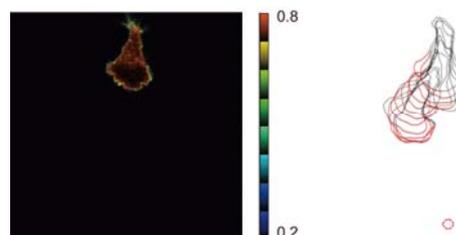


図 5-1. R10-Gi 発現分化型 HL-60 細胞の FRET 画像および細胞輪郭の経時変化
右図赤小丸はマイクロピペット先端部

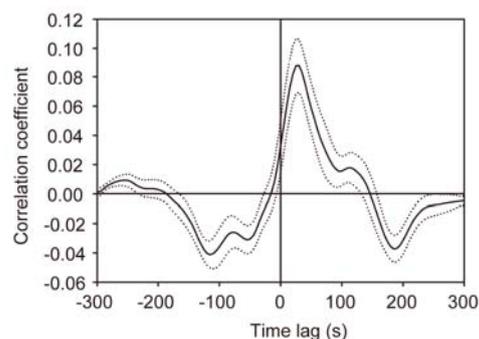
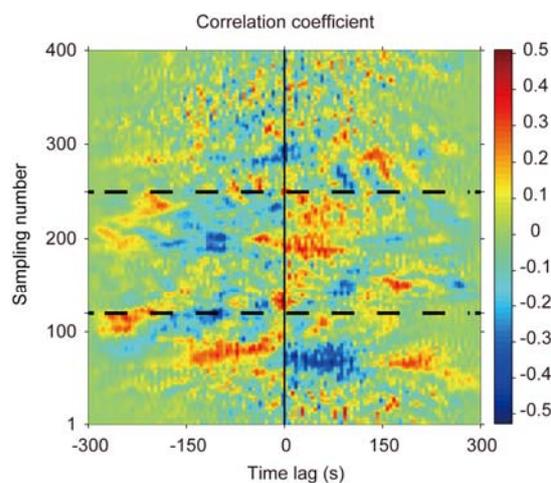


図 5-2. 細胞走化における細胞膜伸展速度と FRET シグナルの相関係数

上図は図 5-1 の相関係数の例

下図は細胞走化方向における相関係数の平均および信頼区間

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Motoyoshi Baba, Tohru Kozasa, Takao Hamakubo, Hiroto Kuroda, Kazuyuki Masuda, Shin Yoneya and Tatsuhiko Kodama, Soft X-ray Laser Microscopy of Lipid Rafts towards GPCR-Based Drug Discovery Using Time-Resolved FRET Spectroscopy, Pharmaceuticals, 2011, 4(3), 524-550

〔学会発表〕 (計 1 件)

増田一之, 三量体Gタンパク質活性化とRGS相互作用のFRETによる生細胞イメージング, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 2010年12月10日, 神戸ポートアイランド

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lsbm.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 一之 (MASUDA KAZUYUKI)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号 : 20345151