

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590270

研究課題名(和文) FRETによるG蛋白質活性化過程の高時間分解能解析

研究課題名(英文) High time resolution FRET analysis of the activation of G protein

研究代表者

立山 充博 (TATEYAMA, Michihiro)

生理学研究所・分子生理研究系・准教授

研究者番号：30276472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：G蛋白質共役型受容体(GPCR)は神経伝達物質やホルモンなどと結合し、G蛋白質を介して様々な細胞応答を引き起こす膜蛋白質である。本研究では、GPCRやG蛋白質の活性化過程の詳細について、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用して解析を行った。生きた細胞の膜上で起こる受容体の活性化・脱活性化、および受容体とGタンパク質の会合・解離に関する高時間分解能FRET解析から、G蛋白質は活性型受容体と結合してその構造を安定させるとともに受容体の脱活性化過程に遅延をもたらすことを明らかにした。また、安定化作用の大きさは、結合する受容体の種類により異なることも見出した。

研究成果の概要(英文)：G protein coupled receptors (GPCRs) are the important signaling molecules which are activated upon the binding with the specific ligand and trigger the downstream signaling through activating G protein. These initial processes of GPCR signaling, the activation of receptor and the following G protein binding, were analyzed by using a fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique. With the high time resolution FRET analysis, we found that binding of G protein stabilizes the active conformations of GPCRs and slows the deactivation of the activated receptor. Further FRET studies revealed that the effects of G protein binding differ depending on the type of the coupled receptors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 FRET Gタンパク質

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膜タンパク質である。多様な生理活性物質に対して特異的結合を示すGPCRがそれぞれ存在し、生理機能との対応もよく調べられていることから、GPCRは創薬における重要な標的タンパク質でもある。受容体の活性化は生理活性物質や作用薬との結合により起こるが、これによりGタンパク質との結合・活性化が可能となり、多様な細胞応答をもたらすことになる。これらの過程は、従来、定量性に優れた生化学的手法により解析されてきたが、時間分解能の制限があり、脱活性化などの解析にも難点を抱えていた。これらの問題に対して、蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)効率の計測が有効な方法であるという可能性が示されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生きている細胞の膜上で起こる「GPCRの活性化と脱活性化」、および「GPCRとGタンパク質の会合と解離」をFRET計測により可視化し、それぞれの過程について高時間分解能FRET解析を行い、GPCRシグナリングの初期過程の詳細を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

GPCRの活性化・脱活性化を可視化するために、受容体の細胞内第3ループとC末端に、それぞれYellow蛍光タンパク質(YFP)とCyan蛍光タンパク質(CFP)を付加し、両者でのFRET効率の変化を経時的に計測した。また、GPCRとGタンパク質の会合・解離は受容体細胞内領域に付加したC/YFPとGタンパク質の各サブユニットに付加したC/YFPの間で起こるFRET効率の増加・減少として捉え、これを解析した。実験では、ガラスボトムディッシュ上で培養したHEK293細胞に各種コンストラクトを発現させ、i) 全反射照明下にてCFPを励起しCFP蛍光画像とFRET蛍光画像を低周波(0.33 kHz)で同時取得する方法と、ii) 通常の蛍光照明にてCFPを励起しCFP蛍光強度とFRET蛍光強度を二本の光電子増倍管を用い高周波(5 kHz)で同時に計測する方法を用いた。

受容体の活性化・脱活性化は薬剤の投与・除去により制御されるが、受容体の構造変化が速いのにに対して、薬剤の投与・除去に要する時間が遅くなると、受容体の構造変化を捉えることが難しくなってしまう。そこで、本研究ではステップモーターと微小灌流法を組み合わせ、薬液の切り換えを20ms以内に行うよう実験系を確立した。

4. 研究成果

(1) ムスカリン性アセチルコリン受容体1型(M₁R)の活性化構造に対するGqタンパク質および膜電位の作用

M₁Rの細胞内第3ループにYFPをC末端にCFPを付加したコンストラクト(図1)を作製し、蛍光タンパク質間で起こるFRET効率を計測した。

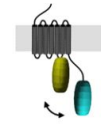


図1 FRETコンストラクト

その結果、FRET効率は作用薬投与により減少し、作用薬除去により回復した。FRET効率の減少は、細胞内第3ループが細胞内C末端領域から離れると解釈できるが、これは、近年のアドレナリン受容体2型の結晶構造解析から提示されているモデルと一致するものであった。

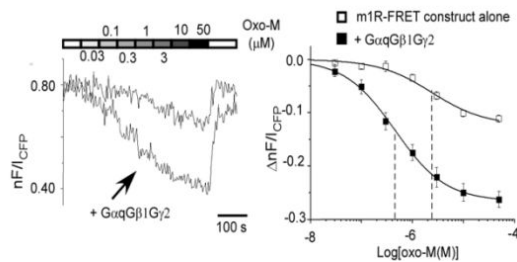


図2 Gqタンパク質共発現によるリガンド濃度依存的FRET変化の増大

我々の作製したコンストラクトは、Gqタンパク質との結合能を保持した機能性コンストラクトであったため、Gqタンパク質共発現時でのFRET効率の変化も計測した。Gqタンパク質の共発現は、作用薬結合によるFRET効率の減少を増大させ、濃度作用曲線を左にシフトさせた(図2)。最大濃度の作用薬存在下でFRET効率の減少量が增大するという結果は、Gqタンパク質結合により活性化型構造が安定化することを示唆するものである。また、濃度作用曲線が左にシフトするという結果は、受容体が活性化型構造になる速度が増大するか、静止型構造に戻る脱活性化の速度が減少することによって考えられた。

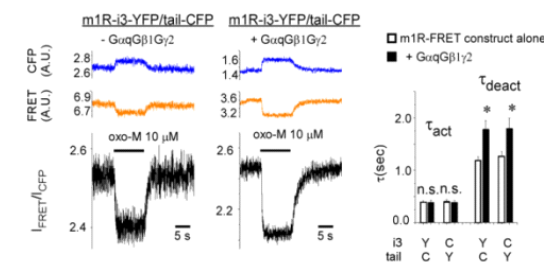


図3 高時間分解能FRET解析

そこで、高時間分解能FRET解析を行い、活性化・脱活性化について調べた。作用薬投与によりCFPの蛍光強度(I_{CFP}; 図3左上、青線)が増大しFRETの蛍光強度(I_{FRET}; 図3左上、黄線)は減少した。FRET効率(I_{FRET}/I_{CFP}; 図3、黒線)の減少は受容体の活性化を示すが、これはGqタンパク質の共発現により変化しなかった。一方、作用薬除去時の

FRET 効率の回復は受容体の脱活性化を示すが、これは Gq タンパク質共発現時に有意に遅延した。以上の結果から、Gq タンパク質との結合により M₁R の活性化構造が安定となること、また、受容体の脱活性化には Gq タンパク質が受容体から解離する過程が含まれることが示された。これらの知見は、放射性同位体リガンドを用いた結合実験などから得られた結果と一致するものである

近年、M₁R を介するシグナリング効率が細胞の膜電位に依存すること、および M₁R が細胞膜の脱分極に伴う電荷移動（ゲーティングチャージ）を示すことから、M₁R は膜電位の変化に対応して構造変化を起こすと考えられている。そこで、我々は、M₁R の FRET コンストラクトを発現した細胞の膜電位を脱分極あるいは過分極に固定した状態で、受容体の活性化過程および脱活性化過程を解析した。

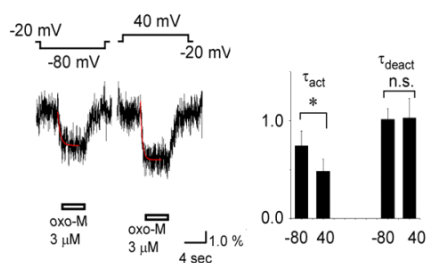


図4 膜電位固定下での高時間分解能FRET解析

図 4 に示すように、作用薬結合による FRET 効率の減少（活性化）は、膜電位を脱分極電位（+40 mV）に固定した時の方が、過分極電位（-80mV）に固定した時よりも速かったが、脱活性化には差異が見られなかった。また、これらの結果は、Gq タンパク質の共発現により影響を受けなかった。以上により、M₁R は脱分極による微細な構造変化を起こし作用薬との結合を容易にするが、脱分極そのもので大きな構造変化は起こさないと考えられた（発表論文 2）。一方、Gi/o 共役型受容体では過分極時に脱活性化の遅延が報告されているため、GPCR の膜電位依存性は多様性を示すものと考えられ、興味深い。

(2) Gq タンパク質の受容体活性化構造安定化作用は、結合する受容体の種類により異なる

Gq タンパク質との結合による受容体活性化構造安定作用は M₁R では見られたが、他の種類の受容体については不明であった。そこで、種類の異なる Gq 共役型受容体の FRET コンストラクトを作製し実験を行った。数種類の受容体について、FRET コンストラクトを作製したが Gq タンパク質との結合能を保持していたのは、代謝型プリン受容体 1 型（P2Y₁R）とムスカリン性アセチルコリン受容体 3 型（M₃R）のみであった。そこで、これらの FRET コンストラクトを用い、作用薬投与による FRET 効率の変化が Gq タンパク質により影響を受けるかどうかについて調

べた。

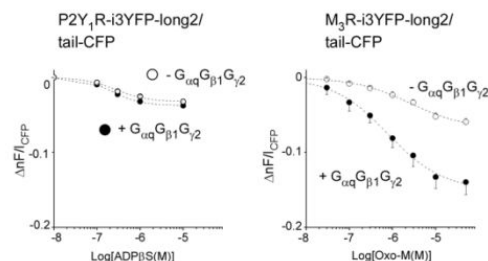


図5 リガンド濃度依存的FRET変化

図 5 に、濃度作用曲線を示す。M₃R では、M₁R と同様に、Gq タンパク質により FRET 効率の減少量が増大し、濃度作用曲線が左にシフトした（図 3 右）。これに対して、P2Y₁R では、Gq タンパク質共発現時に顕著な変化は見られなかった（図 3 左）。以上の結果から、G タンパク質との結合による受容体活性化構造の安定化は、受容体の種類により異なることが示された（発表論文 1）。

(3) Gi/o 共役型受容体の活性化構造に対する Gi タンパク質の作用

これまでは、Gq タンパク質と Gq 共役型受容体の相互作用を中心に行ってきたが、受容体の活性化構造の安定化が、Gi/o 共役型受容体と Gi/o タンパク質においても見られるかどうかについて検討した。受容体として、アデノシン受容体 1 型（A₁R）、ドパミン受容体 2 型およびムスカリン性アセチルコリン受容体 2 型の FRET コンストラクトを作製し、その Gi/o タンパク質結合能について調べた。その結果、A₁R の FRET コンストラクトのみが Gi/o シグナリング経路を活性化したことから、A₁R を用いて解析を行った。A₁R のコンストラクトを単独で発現させた場合、作用薬投与による FRET 効率の微かな減少が認められた。これに対し、Gi1 タンパク質を共発現した時には、作用薬投与による FRET 効率の減少が顕著に増大した。この結果は、A₁R の活性化構造は不安定であり、作用薬との結合だけでは細胞内領域の G タンパク質結合ポケットは十分に開けないが、細胞内領域で Gi/o タンパク質と結合することで full open の状態、即ち、安定な活性化構造となる可能性が示された。現在、本研究についてまとめており、2014 年中に投稿する予定である。

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 4 件)

1) Tateyama, M. & Kubo, Y.

Analyses of the effects of Gq protein on the activated states of the muscarinic M₃ receptor and the purinergic P2Y₁ receptor. *Physiol. Rep.*, 査読有 1, (2013) e00134, doi:10.1002/phy2.134

2) Tateyama, M. & Kubo, Y.

Binding of Gq protein stabilizes the activated state of the muscarinic receptor type 1
Neuropharmacol., 査読有 65, (2013) p173-181,
doi:10.1016/j.neuropharm.2012.10.006

3) 立山充博、松下真一、久保義弘

GABA_B受容体の構造と機能 臨床神経科学、
査読無し 30 巻第 12 号、(2012) p1349-1351
中外医学社

4) Tateyama, M. & Kubo, Y.

The intra-molecular activation mechanisms of the dimeric metabotropic glutamate receptor 1 differ depending on the type of G proteins.
Neuropharmacol. 査読有 61, (2011) p832-841,
doi:10.1016/j.neuropharm.2011.05.031

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 立山充博、松下真一、久保義弘

FRET analysis of G protein coupled receptors.
シンポジウム「イメージングより明らかにされた G タンパク質共役型受容体のダイナミクス」第 134 回日本薬学会年会、札幌 (2012 年 3 月 30 日)

2) 立山充博、久保義弘 The intra-molecular activation mechanisms of the dimeric metabotropic glutamate receptor1 differ depending on the type of the coupled G-protein. シンポジウム「GPCR シグナル伝達の構造と機能：創薬への新たな展開」第 84 回日本生化学大会、京都 (2011 年 9 月 22 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等、なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立山 充博 (TATEYAMA, Michihiro)
生理学研究所・分子生理研究系・准教授
研究者番号：30276472

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

久保 義弘 (KUBO, Yoshihiro)
生理学研究所・分子生理研究系・教授
研究者番号：80211887