

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770120

研究課題名(和文)1分子観察法を用いたGPCRダイマーの機能の解明

研究課題名(英文)Elucidating the function of GPCR dimerization by single-molecule observation

研究代表者

笠井 倫志 (Kasai, Rinshi)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：20447949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：2 アドレナリン受容体(b2AR)の蛍光1分子観察を行った結果、1) b2ARは刺激前から、ダイマー・モノマーの動的な平衡状態にあり、2) ダイマー寿命は、刺激前では約80ミリ秒であったが、3) 受容体の刺激後に約40%増加する事が分かった。一方、下流の三量体Gタンパク質とb2ARを同時に1分子観察すると、三量体Gタンパク質は、b2ARのモノマーとダイマーの両方に約20ミリ秒という極めて短時間結合し、刺激前後で変化しない事が分かった。これらの結果から、シグナル伝達の際には、GPCRのダイマー・モノマー変換や、三量体Gタンパク質との結合解離が極めて素早く繰り返されているらしいことが分かった。

研究成果の概要(英文)：As a result of the single fluorescent molecule observation of beta 2 adrenergic receptor (b2AR), we found that 1) it's under the dynamic dimer-monomer equilibrium in the plasma membrane even at the resting state, 2) the dimer lifetime is ~80 milliseconds, 3) agonist stimulation increases the dimer lifetime by 40%. By observing trimeric G-protein together with b2AR at the single molecule level, it was further found that trimeric G-protein temporarily binds to b2AR monomers as well as dimers with comparable lifetimes, ~20 milliseconds. These reversible binding-unbinding processes were not affected by agonist stimulation. The results obtained here indicate that G-protein signaling is regulated in such a dynamic manner.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：生物物理 1分子計測 Gタンパク質共役型受容体 ダイマー形成

1. 研究開始当初の背景

三量体 G タンパク質共役型受容体(G-protein coupled receptor, GPCR)は、生体内で極めて多様な働きをしている受容体ファミリーの総称である。そのほぼ全てが、細胞膜を 7 回貫通し、また、三量体 G タンパク質という細胞内シグナル分子を活性化するという、共通したシグナル伝達の仕組みを備えている。GPCR は従来、単量体、すなわちモノマーで働くと考えられてきたが、最近、二量体、すなわちダイマーを形成する事で、シグナルの強度や経路の調整を行っているらしいことが示唆されてきた。ところが、こうしたダイマーそのものが、実際の細胞でどの程度存在するのか、その動的な性質はどのようなものか、といった物理化学的な知見はほとんど得られておらず、ダイマーの機能を調べる研究を進めるうえでの大きな障害になっていた。しかし近年、私の研究によって、GPCR のダイマー・モノマーの動的平衡を生細胞膜上で記述することができたので、本研究では、ダイマーがシグナル伝達にどのような機能を及ぼしているのかについて、GPCR と三量体 G タンパク質との相互作用を実際に 1 分子ずつ調べ、明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

(1) GPCR ダイマーにリクルートしてくる三量体 G タンパク質の結合時間や頻度から、シグナル伝達効率を評価し、モノマーと比較することで、ダイマーがシグナル伝達効率にどのような機能を及ぼしているのかを明らかにすることを目的とする。そのためには、定常状態と、アゴニスト刺激による受容体の活性化に伴って、三量体 G タンパク質の結合時間や頻度にどのような変化がみられるのかを観察し、具体的なシグナル出力の比を、定常状態と活性化状態のそれぞれで、モノマーとダイマーごとに分けて定量的に評価する。

(2) この際、GPCR ダイマーの研究で、安定なダイマーを形成すると考えられているクラス C と呼ばれる GPCR ではなく、ダイマーについての議論が多く、また、約 85% の GPCR が属する、クラス A と呼ばれるサブファミリーの GPCR を用いて、ダイマーの性質や機能を解明する事にした。

3. 研究の方法

(1) GPCR と三量体 G タンパク質との分子レベルでの相互作用を調べるために、蛍光 2 色同時 1 分子観察法を用いて、異なる二つのシグナル分子をそれぞれ、ピデオレート(時間分解能 30 ミリ秒/フレーム)で 1 分子観察した。観察後に画像を重ね合わせて輝点の重なり合いから、分子同士の相互作用を検出する方法を用いた。蛍光 2 色同時 1 分子観察のためには、従来から本研究室で開発して用いていた、対物レンズ型の全反射蛍光顕微鏡を改造して用いた。

(2) 実験ために用いたのは、代表的なクラス A の GPCR である 2 アドレナリン受容体である。蛍光 1 分子観察のために、有機蛍光色素 1 分子で正確に 1 つの受容体分子をラベルする、ACP タグを用いたタンパク質ラベル法を用いた。これは、ACP タグと呼ばれるタンパク質を、受容体の細胞外 N 末端に遺伝子工学的に結合させた改変受容体を細胞に発現させてから、後で蛍光色素分子を ACP タグに共有結合で導入することで受容体を観察する方法である。ACP タグと色素の導入効率は極めて高いので (>95%)、この際、2 アドレナリン受容体をもともと発現していない培養株細胞を用いることで、受容体のラベル効率をほぼ 100% にして、ダイマーを定量的に検出することができる。

(3) 三量体 G タンパク質を可視化するためには、三量体 G タンパク質の内の、サブユニット、もしくはサブユニットにラベルとして GFP を導入し、受容体と同時に発現させて観察した。これらの変異タンパク質は生理的な機能が保たれていることが報告されているものである。

4. 研究成果

(1) まず、蛍光色素 1 分子観察法をもちいて、生細胞膜上の 2 アドレナリン受容体(以下、受容体と略す)を 1 分子ずつ観察したところ、受容体は細胞膜上をほぼランダムにブラウン運動しており、その中で、受容体は寿命約 100 ミリ秒の動的なダイマーを形成しており、モノマーとダイマーの絶え間ない変換を繰り返す状態 = 動的平衡状態にあることが分かった。これは、過去に私たちの研究で用いた別の GPCR である、フォルミルペプチド受容体と極めて似た振る舞いであった。また、私たちが調べた幾つかの GPCR についてだけでなく、他の研究グループも同様に GPCR がモノマーとダイマーの動的平衡状態を取ることを報告している事から、これは、とくにクラス A に属する GPCR に共通した性質の一つである事が示唆された。

(2) 過剰量のアゴニストを加えて受容体を活性化すると、ダイマーの寿命が約 40% 長くなり、ダイマーが、やや安定化して存在するようになることが分かった。これは、受容体の活性化と、ダイマー形成が密接に関連していることを示唆している。

(3) さらに、三量体 G タンパク質 サブユニットを、受容体と同時に 1 分子観察すると、三量体 G タンパク質 サブユニットは、受容体のモノマーにも、ダイマーにも同様にリクルートされ、極めて短時間だけ結合する様子を繰り返していることが分かった。三量体 G タンパク質 サブユニットが受容体に結合する時間は、ダイマーに対しても、モノマー

に対してもほとんど変わらず、どちらも約200ミリ秒であった。こうした結果は、三量体Gタンパク質サブユニットを用いてもほぼ同じであったので、上記の結合時間は、三量体Gタンパク質と受容体との相互作用を正しく測った結果である事を示している。さらに、二つの異なる三量体Gタンパク質が同時にダイマーにリクルートしてくる様子は見えなかった。ダイマーが同時に活性化できる三量体Gタンパク質は最大1個であると予想される。また、これと併せて考えると、三量体Gタンパク質がダイマーに結合する時間は、ダイマー寿命と比べると約1/4~1/6程度であったので、1回のダイマー形成あたり、最大約6個の三量体Gタンパク質が活性化されうると予想される。すなわち、ダイマー形成そのものがシグナル伝達のクロック・パルスとして働いているが、同時に、シグナル増幅については抑制的な性質を持ち合わせているという極めて興味深い結果を示唆している事が分かった。

(4) また、三量体Gタンパク質は、従来知られていたように細胞膜にずっと存在しつづけているわけではなく、細胞質と細胞膜の間で交換しているらしいことも明らかになった。上記(3)のように、三量体Gタンパク質が受容体と相互作用をする際も、細胞質から直接受容体へ結合するよう見えたり、逆に、受容体と結合したあとに、細胞質へ直接去るよう見えたりする例が観察された。こうした現象の意義はまだよくわからないが、三量体Gタンパク質の新しいシグナル伝達様式を示唆している可能性がある。

(5) 三量体Gタンパク質が受容体へリクルートされ結合する様子は、受容体の活性化前から観察されたが、驚いたことに、アゴニストを用いて受容体を活性化した後も、これらの頻度や結合時間に大きな変化は見られなかった。すなわち、三量体Gタンパク質の活性化は極めて短時間で起きるか、あるいは、受容体から三量体Gタンパク質が解離したのちに起きるか、あるいはまた、活性化しても三量体Gタンパク質の解離が起きないか、など、いくつかの可能性が考えられる。

(6) 以上の結果から、GPCRのダイマー・モノマー変換、さらにそこにリクルートしてくる三量体Gタンパク質との結合・解離のすべては、約100ミリ秒程の時間スケールで起こっており、受容体を活性化してもダイマー寿命が40%長くなる以外に大きな変化はなく、これらの分子が絶え間なく結合と解離を繰り返しながら、シグナルを下流に伝えていることが分かってきた。ただし、こうした、一見、複雑で激しい分子同士の結合解離反応であっても、ダイマーに一度にリクルートしてくる三量体Gタンパク質が一つである事、一回のダイマー形成について、4~6個の三

量体Gタンパク質が活性化されうる事など、いくつかの厳密なルールがあることが分かってきた。こうしたことによって、上述の様に、ダイマー寿命の変化をシグナルとして下流に伝えるような、巧妙に働くシグナル伝達システムの構築が可能になっていると予想される。ここで得られた知見がGPCR、およびGPCRダイマーのシグナル伝達の仕組みの理解を大きく進める糸口になると期待している。

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8件)

Kasai RS, Kusumi A, Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization, *Current Opinion in Cell Biology*, 査読有, Vol. 27, 2014, pp. 78-86

Nagata KO, Nakada C, Kasai RS, Kusumi A, Ueda K, ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, Vol. 110, 2013, pp. 5034-5039

Nishimura H, Ritchie K, Kasai RS, Goto M, Morone N, Sugimura H, Tanaka K, Sase I, Yoshimura A, Nakano Y, Fujiwara TK, Kusumi A, Biocompatible fluorescent silicon nanocrystals for single-molecule tracking and fluorescence imaging, *Journal of Cell Biology*, 査読有, Vol. 202, 2013, pp. 967-983

Suzuki KGN, Kasai RS, Fujiwara TK, Kusumi A, Single-Molecule Imaging of Receptor-Receptor Interactions, *Methods in Cell Biology*, 査読有, Vol. 117, 2013, pp. 373-390

Cho KJ, Kasai RS, Park JH, Chigurupati S, Heidorn SJ, van der Hoeven D, Plowman SJ, Kusumi A, Marais R, Hancock JF, Raf inhibitors target ras spatiotemporal dynamics, *Current Biology*, 査読有, Vol. 22, 2012, pp. 945-955

Kusumi A, Fujiwara TK, Chadda R, Xie M, Tsunoyama TA, Kalay Z, Kasai RS, Suzuki KGN, Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*,

査読有、 Vol. 28、 2012、 pp. 215-250

Kusumi A、 Fujiwara TK、 Morone N、 Yoshida KJ、 Chadda R、 Xie M、 Kasai RS、 Suzuki KGN、 Membrane mechanisms for signal transduction: the coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes、 Seminars in Cell & Developmental Biology、 査読有、 Vol. 23、 2012、 pp. 126-144

Suzuki KGN、 Kasai RS、 Hirosawa KM、 Nemoto YL、 Ishibashi M、 Miwa Y、 Fujiwara TK、 Kusumi A、 Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function、 Nature Chemical Biology、 査読有、 Vol. 8、 2012、 pp. 774-783

〔学会発表〕(計 5 件)

Kasai RS、 Fujiwara TK、 Kusumi A. GPCR dimers as active signal triggers: inverse agonist effects revealed by single-molecule imaging analysis. 第 51 回日本生物物理学会 年回 2013 年 10 月 30 日 京都

Kasai RS、 Kusumi A. Transient GPCR dimers trigger signaling as revealed by single-molecule imaging. The 2013 Cold Spring Harbor Asia Conference “NEW ADVANCES IN OPTICAL IMAGING OF LIVE CELLS & ORGANISMS” 2013 年 8 月 22 日 蘇州 中国

Kasai RS. Dynamic Monomer-Dimer Equilibrium as a General Property of the Class A GPCR: Single-Molecule Imaging Study. The 14th Membrane Research Forum 2013 年 3 月 16 日 京都

Kasai RS、 Fujiwara TK、 Kusumi A. Dynamic monomer-dimer equilibrium as a general property of the class A GPCR: detection by single-molecule imaging. The 2012 American Society for Cell Biology Annual Meeting / ASCB 52th Annual Meeting 2012 年 12 月 16 日 サンフランシスコ アメリカ

Kasai RS. Single-molecule imaging revealed acceleration of trimeric G-protein turnover by transient dimerization of liganded 2-AR. 第 50 回日本生物物理学会 年回 2012 年 9 月 22 日 名古屋

〔図書〕(計 2 件)

笠井倫志、 中外医学社、“1 分子イメージングにより明らかになった、GPCR のモノマー・ダイマーの動的な交換”、 Clinical Neuroscience 月刊 臨床神経科学、 2013、 31、 1118-1119

藤原敬宏、 笠井倫志、 楠見明弘、 東京化学同人、“超高速・超解像 1 蛍光分子顕微鏡”、 現代化学、 2013、 508、 50-51

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 倫志 (KASAI, Rinshi)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：20447949

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：