

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460307

研究課題名(和文) Gq共役型受容体の膜電位依存性に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of the voltage dependence of Gq coupled receptors

研究代表者

立山 充博 (MICHIMIRO, TATEYAMA)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・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

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体はリガンド結合により活性化されるが、幾つかの受容体ではリガンドに対する親和性が膜電位に依存して変化することが報告されている。これまで、機能解析法の問題からGq共役型受容体の膜電位依存性についての研究は少なかった。我々は、Gq共役型受容体により機能制御を受けるイオンチャネルの機能解析および受容体とGqタンパク質の相互作用についての光学的解析から、代謝型プリン受容体P2Y1Rを介するシグナリングが膜電位依存性を示すことを見出した。また、膜電位依存性には、P2Y1Rの膜貫通部位に位置する荷電性アミノ酸が重要であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that the ligand affinities of several G protein coupled receptors are changed depending on the membrane potential. Here we investigated the effects of Gq coupled receptors on the KCNK13 channel current and found that in the purinergic P2Y1R concentration-response relationships were different when the holding potential was different. The voltage dependent difference was abolished when the aspartate residue at the transmembrane domain was mutated to alanine or asparagine. Similar results were obtained from the analysis of FRET between P2Y1R-YFP and CFP-Gq. FRET efficiency was increased by the application of agonist in a concentration dependent manner, and the concentration-FRET curve was leftward shifted by the depolarization of the membrane potential. The shift was not observed when the aspartate residue was mutated to asparagine.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 FRET 膜電位依存性

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重要な膜タンパク質であり、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、多様な細胞応答を惹起する。このため、GPCRは創薬における標的分子としても位置付けられており、GPCRを介するシグナリング(GPCRシグナリング)の研究は重要な意味を持っている。GPCRシグナリングはリガンドとの結合により受容体が活性化されることで始まるが、近年、シグナリング効率が膜電位により変化するという「膜電位依存性」を示す複数のGPCRが報告されている。GPCRの膜電位依存性の研究は、膜電位を制御して機能解析を行うという実験上の問題から、内向き整流性カリウムチャンネルを活性化するGi/o共役型受容体を中心に研究が進められてきた。一方、Gi/o以外のGタンパク質に共役する受容体の膜電位依存性に関する研究が俟たれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膜電位依存性を示すGq共役型受容体を見出し、各受容体の構造を比較することにより膜電位依存性の構造基盤を明らかとすることである。膜電位を固定した状態で受容体機能を解析できる実験系の開発が必須であるため、これも目的の一部としている。さらに、膜電位の変化に対応する受容体構造変化を検出し、膜電位依存性の解明を目指したい。

3. 研究の方法

本研究はGq共役型受容体の膜電位依存性の解明を目的としている。そのため、異なる膜電位に保持した状態での受容体の機能解析が必要となる。当初、Gqシグナリング下流に位置するphospholipase Cの活性化をHEK293細胞に発現させたphospholipase C FRETセンサーの光学的計測により解析する計画を立てていたが、定量的解析を行うのに十分なFRET変化が得られなかった。そこで、HEK細胞にKCNK13チャンネルとGq共役型受容体を発現させ、受容体活性化によるチャンネル電流増加作用を解析した。ホールセルパッチクランプ法により、細胞の膜電位を-80 mV(過分極)および+40 mV(脱分極)に固定した状態でランプパルスを加え、これに対応する全細胞電流を記録した。この時、各GPCRに対する作用薬を多様な濃度で投与し、受容体活性化による電流の増加から濃度作用曲線を得た。各電位における濃度作用曲線の比較から電位依存性の有無を検討した。

電位依存性を示す受容体を見出した後、分子生物学的手法により受容体のアミノ酸残基に変異を導入し、その機能解析から膜電位依存性に関与する部位の検索を試みた。

さらに、受容体とGqサブユニットに異なる蛍光タンパク質を付加したFRETコンストラクトをHEK293細胞に発現させ、作用薬投

与によるFRET効率変化を受容体構造変化、あるいは、受容体とGqタンパク質の相互作用とみなし、パッチクランプ法とFRET計測を併用し膜電位依存性に関する解析を行った。

4. 研究成果

(1) Gq共役型受容体の膜電位依存性

下の図1に示すように、Gq共役型受容体であるムスカリン性アセチルコリン受容体M1Rの活性化によりKCNK13チャンネル電流は、濃度依存的に増加を示した。これは、このチャンネルがGq共役型受容体についての定量的機能解析を可能とすることを示すものである。興味深いことに、膜電位を0 mVに保持した時の方(図1の右図)が-80 mVに保持した時(図1の左図)より、低濃度の作用薬により電流増加作用がみられた。濃度作用曲線の解析から、0 mVでのEC₅₀は18 ± 9 nM (n= 4)、-80 mVでのEC₅₀は57 ± 9 nM (n= 6)と有意に異なるという結果を得た。これは、過分極時に比べ脱分極時の方が高いシグナル伝達効率を示すという結果であり、これまでの研究報告と一致するものである。

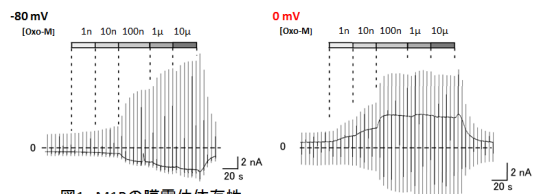
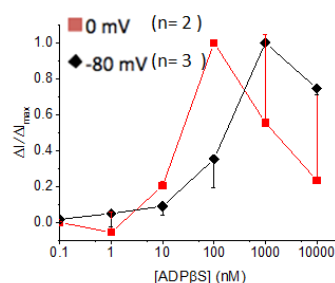


図1. M1Rの膜電位依存性

この実験系を用い、さらに、アドレナリン受容体1B-ARやセロトニン受容体5-HT2ARの電流増加作用を調べた。1B-ARへのアドレナリン投与、あるいは、5-HT2ARへのセロトニン投与により、濃度依存的な電流増加作用がみられた。しかしながら、膜電位を脱分極に保持したときに得られた濃度作用曲線と、過分極に保持したときに得られた濃度作用曲線の間に差は見られなかった。以上の結果は、各受容体が、それぞれの作用薬に対して電位依存性がないことを示すものである。

次に、代謝型プリン受容体であるヒトP2Y1Rを試したところ、作用薬であるADPPSの最大作用は、膜電位を脱分極に保持した時(図2の赤線)の方が過分極に保持した時(図2の黒線)より低濃度で現れることを見出した。

図2. P2Y1Rの膜電位依存性



同様の膜電位依存性は、マウス P2Y1R でも見られたことから、P2Y1R に共通する性質であると考えられた。また、P2Y1R は ATP によっても活性化されることが知られている。そこで、ATP を用いて同様の実験を行ったところ、濃度作用曲線は膜電位を脱分極に保持することで左側（低濃度側）にシフトしたことから、P2Y1R シグナリングの膜電位依存性は ADP および ATP の両者においても共通して見られるということが明らかとなった。人工的化合物である作用薬 2MeSADP でも様の膜電位依存性が観察されたことから、i) 脱分極が各作用薬の結合を同様に促進するような影響を与えるか、ii) 各作用薬結合によって起こる共通の構造変化に対して影響を与えることでシグナリング効率を高めるという可能性が示唆された。

(2) P2Y1R の膜電位依存性の構造基盤

P2Y1R の膜電位依存性に重要な働きを持つアミノ酸残基を同定するために、アミノ酸変異体を用いた機能解析を行った。膜電位の変化を感知する可能性の高いアミノ酸残基として膜貫通部位に位置する荷電性アミノ酸残基に着目し、荷電をなくす目的でアラニン変異を導入した。これまでの研究から、膜貫通部位に位置し陽性荷電を持つアミノ酸残基の多くがアラニン変異により作用薬との結合を消失させることが報告されている。そこで、これらの残基については荷電の強さを変化させる変異を導入して機能解析を行った。その結果、膜貫通部位に位置する二つのアスパラギン酸残基をそれぞれアラニンに変異させると、作用薬に対する感受性は大きく変化させないが、膜電位依存性が消失することが明らかとなった。そのうちの一つの残基では、荷電のみを消失させるアスパラギン酸への変異でも膜電位依存性の減弱が見られたことから、膜貫通部位に位置するアスパラギン酸残基の負電荷が膜電位依存性に重要な働きを持つことが示唆された。

(3) 膜電位依存性に関する FRET 解析

P2Y1R シグナリングの膜電位依存性の解析に用いた KCNK13 チャネル電流増加作用は、Gq タンパク質活性経路の下流に位置する。そこで、シグナリング経路のより上流に位置する反応に関する膜電位依存性を検討するために、作用薬結合による受容体構造変化および受容体と Gq タンパク質の結合について FRET 解析を行った。

まず、受容体の構造変化を捉えるために、受容体の細胞内領域の異なる部位に異なる蛍光タンパク質を付加し、両者の間で起こる FRET 効率の変化を計測した。作用薬投与による FRET 効率の減少は観察されたが、その変化の大きさはベースラインの FRET 効率の 0.5% 未満であり、定量的解析を行うに十分な変化ではないものであった。

次に、P2Y1R と Gq タンパク質の会合を解析

するために、P2Y1R-YFP と CFP-G_q の間で起こる FRET 効率を G_q と G₂ 共発現下で計測した。その結果、アゴニスト投与により比較的大きな FRET 効率の増加がみられた（最大 2% 程度）。また、この変化は濃度依存性であった。そこで、パッチクランプ法により、FRET コンストラクトを発現する細胞を異なる膜電位に保持した状態で FRET 計測を行ったところ、脱分極時の方（図 3 左点線）が過分極時よりも低い EC₅₀ の値を示した（図 3 左）。また、アスパラギン酸残基をアスパラギンに変異させた P2Y1R-YFP の変異体ではこのような変化はみられなかった（図 3 右）。

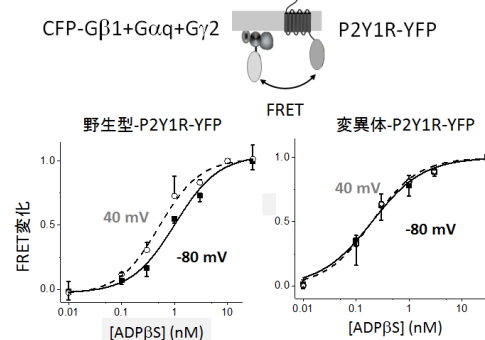


図3

以上の FRET 解析により、P2Y1R シグナリングは G タンパク質との結合過程においても膜電位依存性を示すことが明らかとなった。また、この膜電位依存性には膜貫通部位に位置するアスパラギン酸残基が重要な働きを持つことが示された。

本研究で得られた結果は、Gq 共役型受容体である P2Y1R が膜電位依存性を有すること、および膜貫通部位に位置するアスパラギン酸残基が膜電位依存性に重要な働きを持つことを強く示唆するものである。この膜電位依存性が P2Y1R 自身に由来することを明らかにすることにより、GPCR の膜電位依存性についての解析が大きく進展するものと期待される。

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 3 件)

Tateyama, M., Kubo, Y. (2016) Stabilizing effects of G protein on the active conformation of adenosine A1 receptor differ depending on G protein type. *Eur J Pharmacol* 査読有 788: 121-131. doi:10.1016/j.ejphar.2016.06.025

Kurogi, M., Kawai, Y., Nagatomo, K., Tateyama, M., Kubo, Y. & Saitoh O. (2015) Auto-oxidation products of epigallocatechin gallate activate TRPA1 and TRPV1 in sensory neurons. *Chem Senses* 査読有 40: 27-46. doi: 10.1093/chemse/bju057

立山充博、久保義弘 (2014)
「GPCR の構造変化を FRET により捉える」
日本薬理学雑誌、査読有 143 巻第 5 号、
P.249-253、doi.org/10.1254/fpj.143.249

[学会発表](計 8 件)

立山充博、久保義弘
FRET analyses of voltage dependence of
P2Y1Rs. 第 94 回日本生理学会大会、アクト
シティ浜松 (静岡県浜松市)(2017 年 3 月
30 日)

王 培冰、立山充博、久保義弘
Analyses of the voltage dependence and
its structural determinant of the P2Y1
purinergic receptor. 第 93 回日本生理学
会大会、札幌コンベンションセンタ - (北
海道札幌市)(2016 年 3 月 22 日)

立山充博、久保義弘
Regulation of KCNK13 channel by Gi/o or
Gq coupled receptors. 第 93 回日本生理
学会大会、札幌コンベンションセンタ - (北
海道札幌市)(2016 年 3 月 22 日)

Tateyama M、Kubo Y
The Gi/o coupled muscarinic receptors
form complex with the G protein gated
inwardly rectifying potassium channel.
8th FAOPS、Bangkok (Thailand)(2015 年
11 月 23 日)

立山充博、久保義弘
The Gi/o coupled muscarinic receptors
form complex with the G protein gated
inwardly rectifying potassium channel
for the efficient channel activation.
第 38 回日本神経科学大会、神戸国際展示場
(兵庫県神戸市)(2015 年 7 月 28 日)

松原美紀、立山充博、久保義弘
The KCNK13 channel current is increased
by the activation of either the Gi/o- or
the Gq-coupled receptor. 第 92 回日本生
理学会大会、神戸国際展示場 (兵庫県神戸
市)(2015 年 3 月 21 日)

立山充博、久保義弘
The Gi/o coupled muscarinic receptors
form signaling complex with the G
protein dependent inwardly rectifying
potassium channel. 第 92 回日本生理学会大
会、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)(2015
年 3 月 21 日)

立山充博、久保義弘
Activation efficiency of the G protein
gated inwardly rectifying potassium
channel depends on distance from the Gq
but not Gi/o coupled receptors. 第 37 回

日本神経科学大会、パシフィコ横浜 (神奈
川県横浜市)(2014 年 9 月 11 日)

[図書](計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
立山 充博 (TATEYAMA Michihiro)
生理学研究所・分子細胞生理研究領域・
准教授
研究者番号：30276472

(2) 研究分担者
()
研究者番号：

(3) 連携研究者
中條 浩一 (NAKAJO Koichi)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80390699

(4) 研究協力者
()
研究者番号：