

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670024

研究課題名(和文)細胞から細胞へ伝達するGPCRシグナルの証明および伝達機構の解明

研究課題名(英文)Transmission of GPCR signals among cells

研究代表者

服部 満 (HATTORI, Mitsuru)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20589858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：顕微鏡観察より導き出された仮説“GPCR活性が細胞間を伝達する”を証明するために、より高感度で短時間のGPCR活性変化を追跡できる観察系を確立した。リアルタイム発光イメージングを実行することで、GPCR活性の伝達メカニズムの解明を目標とした。既存のルシフェラーゼの100倍以上の発光強度を誇るNanoLucルシフェラーゼをベースとしたタンパク質再構成法によるプローブを新規に開発し、それぞれのプローブペアを細胞に導入して発光イメージングシステムにて発光値の変動を観察した。経時的な観察の結果、GPCR活性と細胞活動の協調性を見出した。

研究成果の概要(英文)：G protein coupled receptors (GPCRs) are one of the remarkable targets for the design of therapeutic drugs. Many of screening methods have been developed to identify effective agents for GPCR signaling. We previously developed a bioluminescence measuring system to detect the interaction of GPCR with β -arrestin based on split luciferase fragment complementation. During the observation of bioluminescence, there is one of the hypotheses that GPCR signals transmit among cells. To demonstrate the hypothesis, we developed new bioluminescence imaging technique for the temporal monitoring of GPCR- β -arrestin interaction in living cells. Simultaneous imaging of GPCR activity and cell movements indicated that GPCR activity linked the stage of cell proliferation.

研究分野：分子生物学

キーワード：GPCR ルシフェラーゼ 細胞

1. 研究開始当初の背景

G protein-coupled receptor (GPCR) は7回膜貫通型の膜レセプタータンパク質である。現在、臨床レベルで使用されている薬剤のおよそ半数は GPCR をターゲットとしており、創薬研究においても極めて重要なターゲットとなっている。我々は、主に発光タンパク質ルシフェラーゼを用いた再構成法を用いて、GPCR 活性を生きた細胞にて定量的に検出する方法を開発してきた (Hattori et al., *Mol. BioSyst.*, 2013)。開発したルシフェラーゼプローブにて顕微鏡下で発光シグナルによる GPCR 活性の観察を行う過程で、細胞中の GPCR 活性を示す発光輝点の挙動が興味深いものであることに気づいた。細胞膜上の輝点、隣接する細胞に新規に現れる輝点の位置と相関している場合があり、通常の GPCR 活性の反応とは全く別のシステムの存在が予想された。

2. 研究の目的

顕微鏡観察より導き出された仮説“GPCR 活性が細胞間を伝達する”を証明するために、より高感度で短時間の GPCR 活性変化を追跡できる観察系を確立する。リアルタイム発光イメージングを実行することで、GPCR 活性の伝達メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

GPCR 活性の変化を迅速に検出するために、高い発光強度を誇る新規ルシフェラーゼ GPCR プローブを開発する。顕微鏡をベースとしたリアルタイム発光イメージングシステムを構築し、GPCR 活性の細胞間伝達の証明に必要なデータを取得する。最終的に GPCR 活性伝達における細胞増殖因子の関与および伝達メカニズムについて明らかにする。

4. 研究成果

(1) NanoLuc を基盤とした GPCR プローブの開発

これまで我々が開発してきた GPCR 活性を検出する発光プローブは、主に細胞集団に対して用いる目的であったため、発光強度としては1細胞レベルでの変化を追跡するには不十分である。そこで、近年開発された既存のルシフェラーゼの100倍以上の発光強度を誇る NanoLucルシフェラーゼをベースとしたタンパク質再構成法によるプローブを新規に開発した。NanoLucアミノ酸配列を任意の位置で分割し、その再構成効率をFKBP-FRB系に繋げることで再構成の効率を確認した。Rapamycin添加により相互作用

用が起こるFKBP-FRBを利用してNanoLucの再構成を誘導すると、明確な発光値の上昇が確認された。またこの発光の上昇及び最大発光値は、NanoLuc断片とFKBP-FRBとの繋ぎ方、順序によって大きく変化した。最も発光値変化を示した構造では、既存の発光再構成系と比較して、100倍以上の値を示した。

NanoLuc再構成系が十分な反応を示したため、同断片をそれぞれGPCRおよびarrestinに融合させて、GPCR活性を測る発光プローブを作製した。原理としてGPCRが特異的なリガンドに結合した場合に細胞内のarrestinがGPCRと結合し、NanoLucの再構成が起こる。同プローブをHEK293細胞に導入して、GPCR特異的なリガンドを添加することでその発光変化を確認した。96穴プレートリーダーを用いた測定では、リガンド添加により細胞溶解液にて著しい発光の上昇が検出された。また、生きた細胞中においても、リガンド添加により発光輝点が観察され、細胞膜上およびER等に輝点が移動する様子が観察された。それぞれの発光像の撮影時間は1枚あたり1秒以下であり、細胞間でのGPCR活性の相関を観察するために十分な輝度であった。

(2) 発光イメージングシステムの構築

NanoLucを用いたGPCR発光プローブをより高感度で高速に検出するため、顕微鏡をベースとした発光イメージングシステムを構築した。既存の倒立蛍光顕微鏡をベースにして、高感度なEM-CCDカメラを設置した。また観察サンプル上の細胞位置を正確に記録するため、電動XYステージも設置した。すべての装置を暗箱で囲うことで一切の外部光を遮断した観察環境を整えた。顕微鏡システムは外部から発光観察用のシステムにより制御した。モデルサンプルを使用して同システムのパフォーマンスを確認した。我々が以前に開発した正立型の発光用顕微鏡での観察データと比較して、より細胞の形状が明瞭に観察された。倒立型顕微鏡は観察ディッシュの底面より観察するため、リガンド刺激等により変化する細胞形状に対してフォーカスがずれにくいという利点もある。従い、長時間の撮影に適した観察環境を設定出来るようになった。

発光イメージングに加えて、細胞小器官や各種インジケータを捉えるための蛍光観察を同時に遂行するため、蛍光観察用のシステムも準備した。励起光源及び分光フィルターを設置した。

(3) 発光イメージングの実施、複数因子の

同時観察

新しく構築した発光イメージングシステムでのGPCRプローブの観察においては、細胞間コミュニケーションを証明するための別の指標が必要である。GPCR-arrestinの相互作用だけでなく、細胞間密度を認識し細胞分裂を制御するタンパク質因子YAP2に着目した。まずYAP2活性による遺伝子発現の促進を検出するために、YAP2と転写関連因子TEAD2それぞれにNanoLuc断片を繋げた新規のプローブを準備した。また、これまでに報告例がないYAP2-GPCR間の相互作用が実際に起きているかどうかを確認するために、このペアに対してもプローブを作製した。発光プレートリーダーを用いて細胞集団での発光値を測定した結果、細胞密度の異なる状況でYAP2-TEAD2相互作用及びYAP2-GPCR相互作用それぞれの程度が変化することが明らかとなった。

開発したそれぞれのプローブペアを細胞に導入して発光イメージングシステムにて発光値の変動を観察した。YAP2-TEAD2間の相互作用は細胞密度が低いと活発化して細胞分裂を誘導するシグナルへとつながるが、密度が高くなると相互作用は低下することが知られている。プローブからの発光値の計測結果も、細胞が高密度の状態に比べて低密度の方が高い発光値を示した。また、GPCRシグナルはこのYAP2-TEAD2シグナルとつながっていることから、GPCR特異的なリガンド添加時の発光についても測定した。リガンドの種類によってYAP2-TEAD2相互作用からの発光が上昇する場合と低下する場合があります。細胞抽出液を用いた*in vitro*の解析結果と一致した。したがってこの発光プローブの原理はYAP2-TEAD2相互作用のタイミング及び量を正確に反映していると結論付けた。

本研究では、複数の細胞でのGPCR活性の発光検出、さらに細胞の密度を検知して増殖シグナルを誘導するYAP2-TEAD2相互作用の発光検出に成功した。この検出法は細胞間での活性の伝達を行う上で不可欠な、細胞接着認識シグナルをモニターすることに繋がるため、伝達様式の詳細な解明に向けた大きな成果である。研究期間にて開発したNanoLucを基盤としたタンパク質活性検出プローブの原理、複数のイベントを同時観察可能な発光イメージングシステムは、様々な細胞現象に適用が可能であり、既存の検出法と比較して、より生きた状態での正確な反応を追跡できる利点がある。さらなる応用が期待できる。

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6件)

①Endo, M., Hattori, M., Toriyabe, H., Ohno, H., Iino, Y. and Ozawa, T.
Optogenetic activation of axon guidance receptors controls direction of neurite outgrowth. *Sci. Rep.*, **6**, 23976 (2016)
DOI; 10.1038/srep23976, 査読有り

②Tamaru, T., Hattori, M., Honda, K., Nakahata, K., Sassone-Corsi, P., van der Host, G. T. J., Ozawa, T. and Takamatsu, K.
CRY drives Cyclic CK2-mediated BMAL1 Phosphorylation to control the mammalian circadian clock. *PLoS Biol.*, **13**, e1002293 (2015)
DOI; 10.1371/journal.pbio.1002293, 査読有り

③Hattori, M. and Ozawa, T.
High-throughput live cell imaging and analysis for temporal reaction of G protein-coupled receptor based on Split luciferase fragment complementation. *Anal. Sci.*, **31**, 327-330 (2015)
DOI; 10.2116/analsci.31.327, 査読有り

④Takamura, A., Hattori, M., Yoshimura, H. and Ozawa, T.
Simultaneous Time-Lamination Imaging of Protein Association Using a Split Fluorescent Timer Protein. *Anal. Chem.*, **87**, 3366-3372 (2015)
DOI; 10.1021/ac504583t, 査読有り

⑤Hattori, M. and Ozawa, T.
Bioluminescent tools for the analysis of G-protein-coupled receptor and arrestin interactions. *RSC Adv.*, **5**, 12655-12663 (2015)
DOI; 10.1039/C4RA14979C, 査読有り

⑥Hattori, M. and Ozawa, T.
Split luciferase complementation for analysis of intracellular signaling. *Anal. Sci.*, **30**, 539-544 (2014)
DOI; 10.2116/analsci.30.539, 査読有り

[学会発表] (計6件)

①服部満, 小澤岳昌
生物発光イメージングシステムを利用した生細胞ハイスループット解析法の開発
日本化学会第96春季年会
2016年03月24日 同志社大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市)

②Hattori, M. and Ozawa, T.

Live cell imaging and in vitro analysis for temporal reaction of G protein coupled receptor using split luciferase complementation
Pacifichem2015
2015年12月18日 ホノルル ワイキキビーチ
マリオット (ハワイ・アメリカ)

③Hattori, M. and Ozawa, T.
Bioluminescence analysis in living cells using NanoLuc luciferase based probes
Pacifichem2015
2015年12月18日 ホノルル シェラトンワイ
キキ (ハワイ・アメリカ)

④Hattori, M. and Ozawa, T.
Imaging system for monitoring of intracellular acidification in living tissues by photo-controllable luciferase
Pacifichem2015
2015年12月16日 ホノルル ハワイコンベン
ションセンター (ハワイ・アメリカ)

⑤服部満, 小澤岳昌
生物発光イメージングを利用したハイスル
ープット解析システムの開発
日本分析化学会第64年会
2015年09月11日 九州大学伊都キャンパス
(福岡県・福岡市)

⑥Hattori, M., Hideo T. and Ozawa, T.
Development of bioluminescent probes for analysis of intracellular environment and signaling
日中若手化学者フォーラム
2014年08月05日 北京大学 (北京・中国)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 満 (HATTORI, Mitsuru)
東京大学・大学院理学系研究科・特任研究
員
研究者番号: 20589858

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし