

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870292

研究課題名(和文) GPCRのヘテロダイマー形成によるシグナル伝達制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the signal transduction mechanisms regulated by heterodimer formation of GPCR

研究代表者

笠井 倫志 (Kasai, Rinshi)

京都大学・ウイルス・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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、機能調節のためにヘテロダイマーを形成する事が報告されているが、実態や制御の仕組みについては長らく不明であった。本研究では、2色同時蛍光1分子観察により、生理的条件下の細胞膜で、二つのGPCR、ドーパミン受容体D1RとD2Rが、寿命約30ミリ秒という極めて動的なダイマーを形成する事を初めて明らかにした。ドーパミン刺激後にも動的ダイマー形成が観察されたが、寿命は約7倍長くなった。一方、ダイマー・モノマーの平衡定数は約2.5倍増加し、動的ダイマーの数は減少した。すなわち、ヘテロダイマーのシグナル産生には、ダイマーの質的・量的な変化が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：G-protein coupled receptor (GPCR) have been thought to form a heterodimer to modulate their functions. However, their existence and functions are not well studied yet. By employing dual color single molecule observation technique, we found that two GPCRs, Dopamine D1R and D2R form a quite transient dimer on the plasma membrane with the lifetime of 30 ms under the physiological conditions. Upon the addition of dopamine, the transient dimer formation was still observed with around seven times longer lifetime, whereas the dimer-monomer equilibrium constant increased by a factor of around 2.5, meaning the decrease of the density of the transient dimers. Therefore, it was suggested that both quantitative and qualitative changes of heterodimers are necessary for a downstream signal production.

研究分野：生物物理学

キーワード：生物物理 1分子計測 生理学 シグナル伝達 バイオテクノロジー G蛋白質共役型受容体 ドーパミン受容体 ダイマー形成

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白質共役型受容体(GPCR)に属する受容体は、ヒトでは約 800 種類ほどあることが知られており、多様な働きをしていることから、創薬の主要な標的分子にもなっている。新たな機能制御の仕組みの一つとして、2000年代以降、ダイマー形成が盛んに議論されていたが、実態については長い間不明のままであった。その後、私の研究によって、(1)GPCR の一つ、フォルミルペプチド受容体は、生細胞膜上で生成解離を繰り返す、動的なホモダイマーを形成している事が明らかになり、さらに、世界で初めて、モノマー・ダイマーの平衡(平衡定数、オフレート、オンレート)を決定することができた。さらに最近、私は、他の GPCR、2 アドレナリン受容体や D2 ドーパミン受容体も、動的なホモダイマーを繰り返し形成することから、(2)動的なダイマー形成は GPCR に共通する性質の一つであるという仮説を提案するに至った。これに加えて、驚くべきことに、(3)活性化に伴ってダイマーは安定化し、下流の 3 量体 G 蛋白質を活性化するシグナル単位として働くことが明らかになってきている。

一方で、GPCR のヘテロダイマー形成は、シグナルの分岐や多様性を生み出すために極めて重要であると考えられているにも関わらず、動的な性質や、機能など、その実態はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

本研究ではまず、生細胞膜中で 2 種類の受容体を 1 分子ずつ直接観察する事でダイマーが形成・解離する様子を検出する。生理的条件下で、ヘテロダイマーの動的性質を定量し、平衡を解明することで、シグナル入力前でのヘテロダイマーの割合や動態を明らかにする。さらに、刺激入力後にダイマーの動的な性質などが変化する様子を調べて、GPCR のヘテロダイマーがシグナルユニットであるという仮説を検証する。

3. 研究の方法

受容体など、2 種類以上の分子を生細胞中で同時に蛍光 1 分子ビデオ観察し、輝点の重なり合いの時間と頻度を解析する事で、分子同士の相互作用を直接検出する。GPCR のヘテロダイマー形成など、蛋白質の結合頻度や結合時間を定量する事で相互作用のキネティクスを決定する。刺激依存的なパラメータの変化を捉えることで、ヘテロダイマー形成の意義を解明する。

4. 研究成果

(1)受容体のラベル法の確立

初めに、2 種類の受容体分子を同時に蛍光 1 分子観察するために、分子の蛍光ラベル法を検討した。2 色同時観察の場合には、蛍光の検出チャンネル間で蛍光や励起レーザー光

のモレがわずかに起こるため、単色での観察の場合よりも明るく、光褪色に強い蛍光色素が求められる。そのため有機蛍光色素による蛋白質ラベル法を検討した。

こうしたラベル法では、タグ蛋白質で受容体をラベルした後にも細胞膜に輸送されること、蛍光色素で受容体を 1 : 1 でラベルできること、細胞質側にタグ蛋白質を導入する場合は蛍光基質が細胞膜を透過すること、タグ蛋白質によって分子の機能が阻害されないこと、が必要である。それらを考慮して、現在利用可能な 5 つのタグ蛋白質の中から適切な物を選定し、二つのドーパミン受容体 D1R と D2R を、それぞれ異なる蛍光色素で選択的に染め分けることができた。

(2)D1R と D2R は、それぞれ単独で一過的なホモダイマーを形成する

まず、D1R と D2R をそれぞれ単独で細胞に発現させ、30 Hz で蛍光 1 分子観察したところ、刺激前にはどちらの受容体も細胞膜上で寿命 100 ミリ秒以下の一過的なダイマーを形成している事が分かった。どちらも、ほかのクラス A の GPCR と同様に、動的なホモダイマーを形成するが、他の研究グループの報告を含めても、また、今まで私が調べてきた GPCR の中でも最も短寿命のダイマー寿命を持つらしいことが分かった。

リガンド刺激後にも、一過的なダイマー形成は見られたが、特に D2R では、ダイマー寿命が約 50% 長くなることが分かった。刺激によってダイマーがやや安定に存在する事、また、このことからダイマー形成がシグナル生成に関連があるらしいことが示唆された。リガンド刺激後にダイマーがやや安定化する現象は、私が観察しているほかの GPCR でも見られており、広く GPCR に保存された性質である可能性があることも分かった。

(3)D1R と D2R は、一過的なヘテロダイマーを形成する

次に、D1R と D2R を同じ細胞に発現させ、2 つの異なる蛍光色素で染め分けた D1R と D2R を二色同時に 30 Hz で蛍光 1 分子観察を行った。D1R と D2R それぞれの輝点像は、色素の蛍光波長ごとに分けた後に別のカメラで撮影した。それぞれのチャンネルで得られた輝点像を時間追跡し、D1R と D2R の軌跡の重なり合いから共局在を機械検出した。ここでは、別の実験から、輝点間の距離が 200 nm 以下に近づいた場合を共局在と定義している。また、軌跡の重なり合いから分子の相互作用を検出するためには、輝点の偶然の重なり合いを引き算する、新たな解析アルゴリズムを用いた。即ち、まず、画像を正しく重ねた場合に、共局在のイベント数と共局在時間を調べ、次に、軌跡を時間・空間的にシャッフルして同様の解析を行う。さらに、D1R と D2R が特異的に結合する成分を求めるため、正しく重ね合わせた場合から、シャッフルした場合を

引き算することで、真の共局在のイベント数と、真の共局在時間を求めた。

この結果、刺激前の状態で、D1R と D2R が動的なヘテロダイマーを形成し、寿命が約 40 ミリ秒である事が分かった。GPCR のヘテロダイマー形成を、蛍光 1 分子観察法によってはじめて捉えることができた。

(4) 刺激後は、動的なヘテロダイマーの寿命が増加するが、割合は減少する

さらにリガンドを加えたときのヘテロダイマー寿命の変化を調べた。刺激後でも、一過的なヘテロダイマーは観察されたが、寿命は 7 倍以上長くなる事が分かった。これは、ホモダイマーの場合に得られた結果と傾向が一致した。

さらに、ダイマーを形成している分子の割合を調べるため、ペアコリレーション解析を応用して、輝点同士の距離の分布からダイマー密度を解析する新たな方法を開発した。これは、D1R と D2R を 2 色同時蛍光 1 分子観察した画像を用いて、D1R と D2R の輝点すべての組み合わせで計算した距離の分布から、ヘテロダイマー量を比較する方法である。この方法を用いて様々な発現密度で測定することで、二次元でのモノマー・ダイマー平衡定数を比較することができる。リガンド刺激前後で比較すると、刺激後は平衡定数が約 2.5 倍増加し、平衡がモノマー側に移動することが分かった。すなわち、刺激後には動的なダイマーが減少することが分かった。

活性化によって動的なダイマーは減少するものの、安定に存在するようになること、すなわち、ダイマーの質的・量的な変化の両方がシグナル生成に関連があることが分かった。

(5) ヘテロダイマー形成の制御の仕組みを検討した

D1R と D2R の相互作用部位として同定されているアミノ酸領域の一つは、D1R では C 末端の 404/405 の 2 つのグルタミン酸と、D2R では 3 番目の細胞質ループの 245/246 の 2 つのアルギニンある (O' Dowd et al., 2012)。この領域同士が相互作用することを防ぎ、ヘテロダイマー形成を阻害すると、細胞内シグナルが伝わらないことが報告されている (Hasbi et al., 2014)。ダイマー形成を制御する仕組みを調べるために、これら全てをアラニンに置換したモノマー変異 D1R とモノマー変異 D2R を作製し、2 色同時蛍光 1 分子観察を行って同様の解析を行った。その結果、予想に反して、これらの変異体同士でも動的なヘテロダイマーを形成する事が分かった。具体的には、変異 D1R と変異 D2R の組み合わせでも、刺激前の野生型ペアで観察された場合とほぼ同じ、約 30 ミリ秒のヘテロダイマー寿命を持つことが分かった。さらに、モノマー・ダイマーの平衡定数を野生型ペアと比較すると、野生型ペアの場合よりも、約 2.5

倍増加し、平衡がモノマー側に移動することが分かった。すなわち、モノマー変異体のペアでは、野生型のペアと同じ発現量下で比較すると、動的なダイマーの数密度が少なくなることの意味している。このことから、今回用いたモノマー変異ペアでは、ダイマー形成のオンレートが減少する事でダイマー量は減っているものの、一度ダイマーを形成してしまえば、野生型ペアと同様の寿命を持つことを示している。すなわち、D1R と D2R のダイマー形成のうち、ダイマーのオフレートを決定する領域は、今回調べたモノマー変異体にも保存されている別の領域で制御されているらしいことが示唆された。

(6) ヘテロダイマー形成と機能制御の仕組みの解明と今後

様々な変異体の作製を行い、同様の解析を行うことで、ヘテロダイマーのオフレートを制御する領域を同定する。

さらに、ヘテロダイマーにリクルートする分子を観察し、結合頻度や結合の制御の仕組みを調べて、ダイマーが解離することの意義の解明を進める。このためには、作製したモノマー変異体も使う。

また、本研究から、D1R と D2R はヘテロダイマーを形成して存在するだけでなく、それぞれがモノマー、あるいは、ホモダイマーとして存在していることが分かった。こうした混在状態の中で、特に、ヘテロダイマー形成に注目して、その機能解明を行うためには、モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマーの各量比を明らかにする事が重要である。そこで、刺激の前後に分けてこれらの量比や平衡定数を決定し、ダイマー形成の意義、さらには、受容体が多様な存在形態をとる意義の解明につなげたい。

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)

笠井倫志 “G 蛋白質共役型受容体の過渡的なダイマー形成 – 1 分子観察法による研究” 医学のあゆみ GPCR 研究の最前線 2016 企画 飯利太郎 槇田紀子 256: 379-384 医歯薬出版株式会社 (2016)

<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=286490&AC=15946>

Hiramoto-Yamaki N, Tanaka KA, Suzuki KG, Hirose KM, Miyahara MS, Kalay Z, Tanaka K, Kasai RS, Kusumi A, Fujiwara TK. Ultrafast diffusion of a fluorescent cholesterol analog in compartmentalized plasma membranes. *Traffic*. 15: 583-612 (2014) [査読有]
DOI: 10.1111/tra.12163

Kusumi A, Kasai RS. Class A GPCRs' transient homodimers might be important for some of their key functions. *J. Physiol.* 592 Online Session "CROSSTALK" 15 (2014)
<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1113/jphysiol.2014.274233/asset/supinfo/tjp6151-sup-0001-Comments.pdf?v=1&s=c789d7d1efefeb4858be53f84a18e05f443cd574>

Kusumi A, Tsunoyama TA, Hirosawa KM, Kasai RS, Fujiwara TK. Tracking single molecules at work in living cells. *Nat. Chem. Biol.* 10: 524-532 (2014) [査読有]
DOI: 10.1038/nchembio.1558

Kasai RS, Kusumi A. Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 27: 78-86 (2014) [査読有]
doi: 10.1016/j.ceb.2013.11.008

笠井倫志 “G タンパク質共役型受容体の動的な二量体・単量体平衡：1 分子計測法を用いたアプローチ” 生体の科学 [増大特集] 生命動態システム科学 65: 392-393 医学書院 (2014)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.11477/mf.2425200005>

[学会発表](計 1 1 件)

Kasai RS. Transient GPCR dimers trigger basal signals as revealed by single-molecule imaging
Gordon Research Conference, Molecular Pharmacology, “GPCRs: From Single Molecules to New Forms of Treatment”
2017年 3月 13日 Il Ciocco, Italy
[国際学会・招待講演]

Kasai RS, Kusumi A. Dynamic homo- and hetero-dimerizations of G-protein coupled receptors: An analysis by dual-channel single fluorescent molecule observation.
第 54 回日本生物物理学会 年回
2016年 11月 27日 筑波
[国内学会・ポスター発表]

笠井倫志、楠見明弘 “Dynamic dimer formation of G-protein coupled receptor in the live plasma membrane: An approach by using single molecule observation”
第 54 回日本生物物理学会 年回 シンポジウム “Unraveling the regulation mechanisms of signal transduction in nano- and meso-scale domains in cell membranes”
2016年 11月 25日 筑波
[国内学会・招待講演]

Kasai RS, Kusumi A. Dynamic monomer-dimer equilibrium of GPCRs as characterized by single-molecule tracking. I.M.A. workshop on neural imaging in neuroscience
2016年 3月 21日 Cambridge, England
[国際学会・ポスター発表]

Kasai RS, Kusumi A. Constitutive signaling without ligation characteristic with GPCRs is triggered by transient GPCR dimers.
第 53 回日本生物物理学会 年回
2015年 9月 13日 金沢
[国内学会・口頭発表]

Kasai RS. Transient GPCR dimers trigger basal signals as revealed by single-molecule imaging
The 18th iCeMS International Symposium and The 15th International Membrane Research Forum Featuring Meso-Scale Molecular Complexes and Domains and Synaptic Membranes
2015年 3月 3日 京都
[国際学会・招待講演]

笠井倫志 “蛍光 1 分子観察法による G タンパク質共役型受容体のモノマー・ダイマー動的平衡の解明”
東北大学多元物質科学研究所 セミナー
2015年 2月 9日 仙台
[国内・招待講演]

Kasai RS. Dynamic monomer-dimer equilibrium of G-protein-coupled receptors as detected by single-molecule tracking
「細胞のメゾスケール構造機能」シンポジウム: Symposium on the cellular meso-scale structures and their functions
2014年 12月 13日 京都
[国際学会・招待講演]

Kasai RS, Fujiwara TK, Kusumi A. Dynamic monomer-dimer equilibrium of G-protein-coupled receptors as detected by single-molecule tracking.
「細胞のメゾスケール構造機能」シンポジウム: Symposium on the cellular meso-scale structures and their functions
2014年 12月 13日 京都
[国際学会・ポスター発表]

Kasai RS, Kusumi A. Dynamic monomer-dimer equilibrium of G-protein-coupled receptors as detected by single-molecule tracking.
ComBio2014 “Lipids and Membranes”
2014年 9月 29日 Canberra, Australia

[国際学会・招待講演]

Kasai RS, Kusumi A. Dimers are the key trigger for the GPCR's basic signaling without ligation.

第 52 回日本生物物理学会 年回

2014 年 9 月 26 日 札幌

[国内学会・ポスター発表]

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 倫志 (KASAI, Rinshi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・
助教

研究者番号： 2 0 4 4 7 9 4 9

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし