

# 分子動態検出に基づく細胞内シグナル伝達量測定法の開発

## Single molecule analysis-based quantification of intracellular signal transduction

東京大学 吉村 英哲

細胞内シグナルは、上流分子と下流分子の相互作用時に生じる構造変化の伝播やリン酸化などの化学反応により伝達される。すなわち、上流分子と下流分子の相互作用頻度や継続時間を細胞全体で定量することにより、その細胞が受容したシグナル量を見積もることが可能であると考えられる。本研究では細胞内シグナル伝達をになう受容体分子とその下流分子について、生細胞内 1 分子動態解析を行うことで細胞内に入力されたシグナル量を測定する手法開発を目指した。さらにその手法を用いて、受容体が効率的にシグナル入力を行うための分子機構について考察した。

本研究で対象とした受容体は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の 1 つであるホルミルペプチド受容体 (FPR1)、下流分子としては FPR1 に結合してシグナルを細胞内に伝達する G タンパク質  $G\alpha$  を選んだ。FPR1 の細胞外末端に SNAPf タグを融合したもの (SNAP-FPR1)、および  $G\alpha$  のループ領域に Halo タグを融合したもの ( $G\alpha$ -Halo) の遺伝子をそれぞれ作製し、ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 細胞に遺伝子導入して発現させた。発現した SNAP-FPR1 および  $G\alpha$ -Halo をそれぞれ深赤色蛍光色素 Setau647 および緑色蛍光色素 R110 で標識した。この生細胞サンプルにテトラメチルローダミン (TMR) で標識した FPR1 アゴニストを添加し、自作の 3 色同時 1 分子観察蛍光顕微鏡システムを用いて細胞膜上での SNAP-FPR1、 $G\alpha$ -Halo、アゴニストの運動を同時可視化解析した。

1 分子蛍光イメージングを行った結果、SNAP-FPR1、 $G\alpha$ -Halo、アゴニストのいずれもが細胞膜上で拡散運動を示す蛍光輝点として観察された。SNAP-FPR1 の蛍光輝点について、各輝点の輝度を解析した結果、アゴニストの添加前後どちらでも FPR1 はモノマー状態とオリゴマー状態が共存しており、アゴニスト添加によりオリゴマー状態をとる FPR1 の割合が増加することがわかった。さらに、各 FPR1 について  $G\alpha$  との共局在時間を解析した結果、アゴニスト添加前では FPR1 モノマーと FPR1 オリゴマーとの間で有意差はなかったのに対し、アゴニストが結合した FPR1 では、オリゴマーと  $G\alpha$  との共局在時間が有意に延長した。アゴニストの代わりにアンタゴニストを添加した場合は、オリゴマーの増加は見られた一方、モノマーとオリゴマーの間に  $G\alpha$  との共局在時間に有意差はなかった。以上の結果より、アゴニストが結合した FPR1 オリゴマーがより強く細胞内にシグナルを伝達する状態であることが強く示唆された。

これまで受容体はアゴニストと結合することでモノマーからオリゴマーへと変化し活性化すると考えられてきた。しかしこのモデルのみでは鋭敏なアゴニスト認識や広いダイナミックレンジを有するアゴニスト検知の機構について十分に説明ができなかった。本研究では細胞膜上でのアゴニスト、受容体、下流分子の動態を同時 1 分子観察することで、そもそも受容体はモノマー-オリゴマーの平衡状態に有り、アゴニストと結合した受容体オリゴマーが効率的にシグナルを伝達していることを見出した。本研究で構築した 1 分子動態解析に基づくシグナル伝達評価法をさらに確立することで、様々な受容体機能についてシグナル伝達量の定量やシグナル伝達機構解明に資することができると期待される。

### 【参考文献】

- Kasai, R.S., Kusumi, A., *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 27, 78-86, 2014
- Yamada, T., Yoshimura, H., et al., *Sci. Rep.*, 6, 38910, 2016