

<< まえがき >>

膜機能分子構造の柔軟性と分子間直接相互作用による動的機能修飾の解析
---リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の二量体構造の動的変化---

Ligand-induced rearrangement of the intracellular dimeric conformation of
metabotropic glutamate receptor1a.

(日本生理学会推薦)

代表研究者 自然科学研究機構・生理学研究所 久保 義弘

National Institute for Physiological Sciences Yoshihiro Kubo

共同研究者 自然科学研究機構・生理学研究所 立山 充博

National Institute for Physiological Sciences Michihiro Tateyama

自然科学研究機構・生理学研究所 藤原 祐一郎

National Institute for Physiological Sciences Yuichiro Fujiwara

<< 英文サマリー >>

The dimeric conformation of the metabotropic glutamate receptor 1a (mGluR1) is a key determinant of the downstream signaling, since crystallographic analysis has shown that glutamate stabilize the active state of the dimeric conformation of the extracellular domain. We investigated the ligand-induced dimeric rearrangement of the cytoplasmic domain by analyzing the fluorescence resonance energy transfer (FRET) signal obtained from the plasma membrane, where ligands interact with the mGluR1a, using a total internal reflection field microscopy system. Intersubunit FRET efficiency was altered within 9 s after glutamate application, while intrasubunit FRET efficiency was not changed. The effect was dependent on glutamate concentration, inhibited by mGluR1 antagonists and reproduced by polyvalent cations, Ca^{2+} and Gd^{3+} , which are known to activate mGluR1a. We therefore conclude that ligand-induced rearrangement of the extracellular dimeric conformation leads to intracellular dimeric rearrangement without altering the respective monomeric conformations.

<< 本 文 >>

研究目的

代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) は、脳の様々な領域に発現している受容体で、この遺伝子を破壊したマウスは、海馬や小脳のシナプス伝達効率の可塑的変化の異常と、空間記憶や運動学習等において行動異常を示すことが知られている。このことから、mGluR1 は、記憶の鍵を握る重要な分子として注目されてきた。

近年、mGluR1 の細胞外領域の一部分の結晶を用いた X 線構造解析により、2つのサブユニットが会合しホモ二量体として構成されていること、それぞれのサブユニットはグローブ状の構造をしており、グルタミン酸結合によりグローブが閉じるように細胞外領域の構造が変化することが明らかにされた。ところで、代謝型受容体のシグナル伝達は、いうまでもなく細胞内において G 蛋白質を活性化することにより引き起こされる。そのため、mGluR1 のシグナル伝達機構を理解するためには、細胞外領域の構造変化に伴って起こる細胞内領域の構造変化を知ることが必要であるが、この点は未解決であった。特に、ひとつのサブユニット内で構造変化がおこるのか、それとも、2つのサブユニット間の配置が変化するかという点については、知見がなかった。そこで、我々は、光ラベルを用いた膜機能分子の動的構造変化解析という最先端の手法を用いてこの問題にアプローチした。

研究経過

異色の蛍光物質間で、距離が近いほど、エネルギーの受け渡し (FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) 効率) が大きくなることが物理化学的に知られている。我々は、mGluR1 のリガンド投与による構造変化を、FRET 効率の変化として捉えることを計画した (図 1 はこのあたり)。

まず、遺伝子工学的に、mGluR1 の細胞内領域の様々な箇所に、シアン色の蛍光蛋白CFP、もしくは黄色の蛍光蛋白YFP、もしくはその両方を付加し、この分子をHEK293細胞に発現させた。一般的に、膜蛋白ではあっても、細胞に強制発現させた場合、膜上に存在するばかりでなく細胞内に貯留する。我々の目的は、リガンド投与に伴うFRET の変化を測定することなので、細胞内に貯留する分子の放つ蛍光は、変化分を薄めてしまうバックグラウンドとなる。当初、この点について考慮しないまま行っていた、通常の光学システムにより細胞全体から発せられる蛍光を測光していた実験では、信頼できる FRET 効率の変化は検出できなかった。そこで、次のステップとして、エバネセントフィールド顕微鏡を導入して、全反射時に漏れ出るいわゆるエバネセント光により細胞膜上に存在する分子のみを照明し発する蛍光を測光することにした。リガンド投与に伴う FRET 効率の変化を解析したところ以下の知見

が得られた（図 2 はこのあたり）。

(1) 細胞内ループ1 に CFP もしくは YFP を付加したコンストラクトを用いた実験では、グルタミン酸投与により、FRET 値が下がる。すなわち、受容体活性化に伴い、2 量体サブユニットの細胞内ループ 1 は相互に遠ざかる。

(2) 細胞内ループ2 に CFP もしくは YFP を付加したコンストラクトを用いた実験では、グルタミン酸投与により、FRET 値が上がる。すなわち、受容体活性化に伴い、2 量体サブユニットの細胞内ループ 2 は相互に近づく。

(3) ひとつのサブユニットの細胞内ループ2 と C 端細胞内領域にそれぞれ CFP と YFP を付加したコンストラクトを用いた実験では、グルタミン酸投与により、FRET 値は変化しない。すなわち、受容体活性化に伴い、ひとつのサブユニットの内部では明らかな構造変化は起こらない。

これらの知見から、リガンド投与により mGluR1 の細胞内領域においては、個々のサブユニットの構造が変化するというよりは、2 つのサブユニット間の配置がずれ、回転等を伴って変化することが示唆され、この動きが G 蛋白質の活性化を引き起こすと考えられた（図 3 はこのあたり）。

さらに、ループ2 に CFP/YFP を付加したコンストラクトをもちいて、アゴニストである DHPG の作用を見たところ、グルタミン酸の場合と同様な変化を示した。また、FRET 変化 / グルタミン酸濃度のプロットが、競合的アンタゴニスト (s)-MCPG によっては右側にシフトし、非競合的アンタゴニスト CPCCOEt によっては下側に下がる。という結果が得られた。これらの結果は、我々が測定している FRET 効率の変化が、受容体の機能を反映するものであることを裏付けると共に、CFP/YFP 付加 mGluR1 が正常な蛋白質構造を保っていることを示している。

ところで、我々は以前、下流の反応を指標として、グルタミン酸のみならず Ca^{2+} 、 Gd^{3+} などの細胞外多価陽イオンによっても mGluR1 が活性化されることを発表した。その後、 Gd^{3+} の結合部位が、結晶構造解析によって、グルタミン酸結合部位や、我々の同定した Ca^{2+} 感受性の決定に重要な部位とは異なる、2 つのサブユニット間の負電荷を持つアミノ酸に富む領域に明確に同定された。我々は、この部位が機能的に重要であることを、点変異体の解析により明らかにした。今回、ループ2 のコンストラクトにより、細胞外の Ca^{2+} や Gd^{3+} が mGluR1 の構造変化を確かに引き起こすことが確認された。 Gd^{3+} は、脳脊髄液中に存在しないが、これらの結果を考えあわせると、 Gd^{3+} の作用を模倣する生理的物質が脳に存在している可能性を示唆しているようにも思われる。

考察

ゲノムプロジェクトが完了し、今後は、ゲノムのコードする個々の蛋白の構造と機能を解析していくことが求められている。そのため、蛋白の結晶を用いて行う、いわゆる構造解析が精力的に進められているが、膜機能蛋白の場合は結晶化が容易でないため一般に極めて困難である。また、結晶化した構造を知るだけでは、動態に関する情報が欠如しているため、リアルタイムで、生きた細胞における膜機能蛋白の動的構造変化を解析する研究手法が切望されてきた。FRET 法による水溶液中の蛋白構造変化の解析は、既に確立されているが、生細胞で受容体蛋白に適用し成功した例は、極めて少ない。我々の研究は「生細胞における膜機能蛋白分子の動的構造変化のリアルタイム測定」を確立した点において意義があると考えている。ポストゲノムの時代に、蛋白の構造と作動原理を探っていくために、構造生物学的アプローチを相補うものとして、大きな期待が持てるからである。

研究発表

口頭発表

1. Yoshihiro Kubo; “Regulation mechanisms and structural rearrangements of metabotropic glutamate receptor.” Young Researcher Umami Forum (Tokyo, 2004)
2. 立山充博、阿部秀樹、久保義弘; “Ligand-induced rearrangement of the intracellular dimeric conformation of metabotropic glutamate receptor1a: Insights from a FRET study.” 第 81 回日本生理学会大会（札幌、2004）
3. 立山充博、阿部秀樹、中田康裕、斉藤修、久保義弘; “Ligand-induced rearrangement of the dimeric conformation of metabotropic glutamate receptor1a” 第 27 回日本神経科学大会（大阪、2004）
4. 藤原祐一郎、久保義弘; “Density dependent changes of the pore properties of P2X2 receptor channel.” シンポジウム 「Structure and function of ion channels」 第 77 回日本生化学会大会（横浜、2004）

誌上発表

1. Michihiro Tateyama, Hideki Abe, Hiroyasu Nakata, Osamu Saitoh and Yoshihiro Kubo “Ligand-induced rearrangement of the intracellular dimeric conformation of metabotropic glutamate receptor1a.” Nature Structural & Molecular Biology 11, 637-642 (2004)
2. Yuichiro Fujiwara, and Yoshihiro Kubo; “Density Dependent Changes of the Pore Properties of P2X₂ Receptor Channel.” Journal of Physiology 558,

3. 立山充博、久保義弘; 「リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の二量体構造の動的変化」 細胞工学 23, 1062-1063 (2004)

ここで本文終わり。以下に、Figures とその英文の説明を示します。

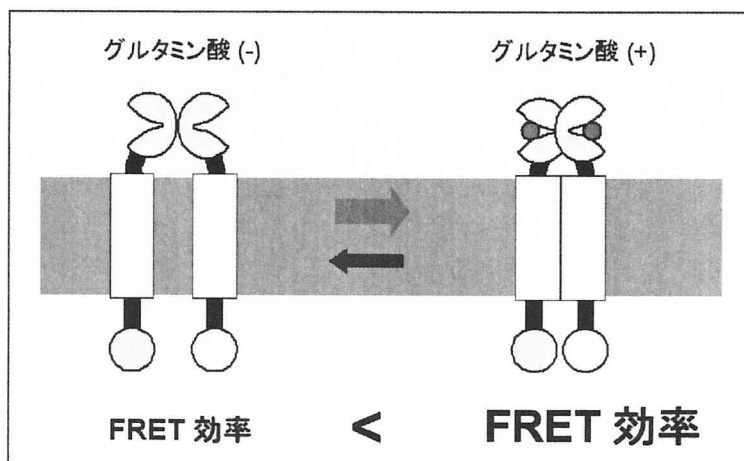


Fig.1 Outline of detection of structural rearrangements by changes of FRET efficiency.
When the distance between two fluorescent proteins is changed, a change of FRET efficiency occurs. Therefore, two subunits of dimeric mGluR1 were labeled with CFP (gray circle) and YFP (white circle) respectively, and the FRET efficiency was monitored.

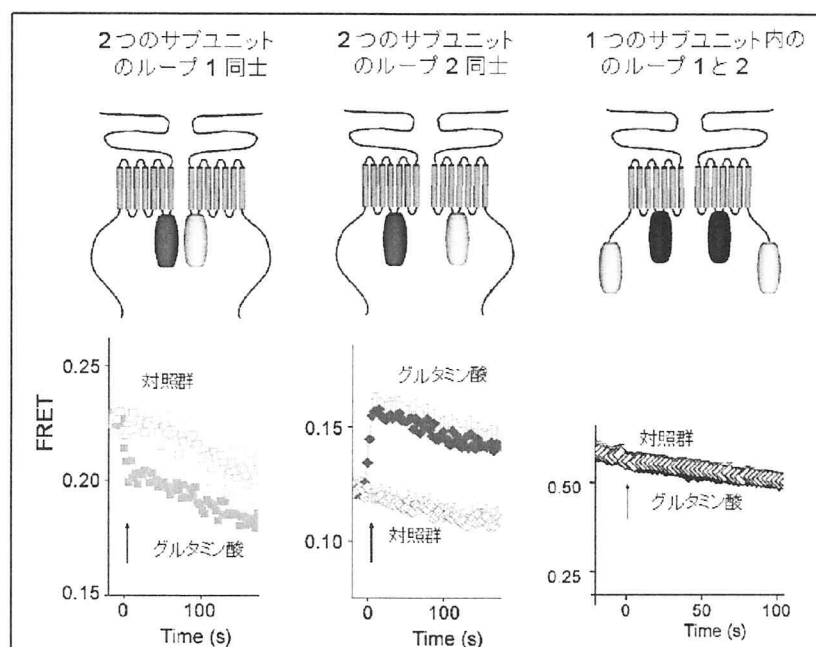


Fig. 2 Glutamate-induced FRET changes of CFP/YFP labeled mGluR1.

(Upper panel) Position in mGluR1 of fluorescent labels, CFP and YFP. (Lower panel) FRET efficiency recordings. Both data with and without application of glutamate are shown

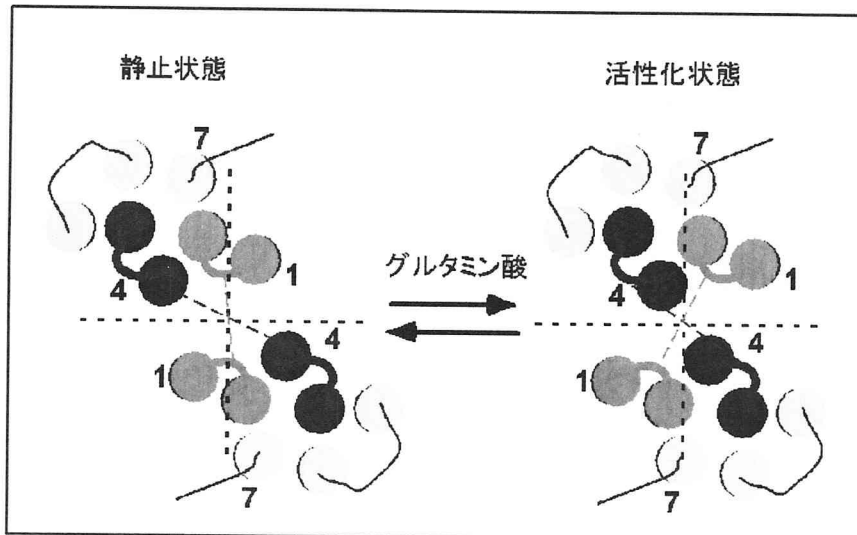


Fig. 3 Glutamate-induced rearrangement of the intracellular dimeric conformation of mGluR1

A schematic drawing of dimeric mGluR1 on the membrane looked up from cytoplasmic side. Circles show seven transmembrane regions. Gray color shows transmembrane region 1,2 and the 1st cytoplasmic loop. Black color shows transmembrane region 3,4 and the 2nd cytoplasmic loop.