

1 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

(日本分析化学会推薦)

代表研究者 東京大学

吉村 英哲

The University of Tokyo

Hideaki YOSHIMURA

G protein-coupled receptors (GPCRs) transduce extracellular signals to the inside of the cells through interacting with downstream signal molecules of G proteins and arrestins. Emerging evidence suggests that GPCRs on the plasma membrane are in a dynamic equilibrium between among monomers, dimers, and oligomers. Nevertheless, the role of the higher-order oligomer formation in the GPCR signal transduction remains unclear. Using dual- and triple-color single-molecule imaging, we investigated a dynamic interconversion between monomer, small and large oligomer states of a chemoattractant GPCR, Formyl Peptide Receptor 1 (FPR1), and its signal efficacy through G protein interaction. Full agonist stimulation increased a fraction of large FPR1 oligomers, which resulted in prolonged FPR1-G protein interaction. The G protein interaction with FPR1 was most stabilized at the full agonist-binding large FPR1 oligomers, demonstrating that G protein-mediated signal transduction is regulated synergistically by the ligand-binding and FPR1 oligomerization. Cooperative signal control induced by receptor oligomerization is anticipated as a target for drug discovery.

研究目的

本研究は細胞膜受容体を通じて細胞内に導入されるシグナル伝達について、受容体と下流分子の1分子動態検出に基づきシグナル入力量を評価し、シグナル伝達機構を解明することを目的としている。

細胞は外部からのシグナル入力に適切に応答することで生命を維持している。分子生物学・生化学研究により、個々のシグナル伝達に関与する分子の同定は進み、同定されたシグナル伝達分子（リン酸化酵素など）の活性化は単離精製した試験管内でも再現できる。一方、細胞内のシグナル伝達分子は入力の種類によりシグナルを伝える下流分子を選択する特異性を有し、また極めて鋭敏な感度や幅広いダイナミックレンジなど、均一系における単純な分子間相互作用のみでは説明できない。特徴を有している。これらシグナル伝達の特徴は試験管内では再現できず、機構も理解されていない。この機構を理解するためには、単離精製した系とは異なる、細胞内での分子集合・動態を解析する、新たな分析法が必要である。

私は細胞内ならではの機能発現機構を解明する分析法として、生細胞内1分子追跡法に注目した。従来1分子動態追跡法は生細胞への適用は多く見られなかった。しかし近年、生細胞内分子に対しても1分子動態追跡を行い、その分子の機能発現機構の解明を目指す研究が散見されるようになってきた。

最近の代表体な例として、CalebiroらはGPCRの生細胞1分子イメージングによりGPCRの拡散運動が停止し下流分子が集合する“hot spots”が存在することを提唱している(Nature 550, 543-547, 2017)。この報告ではおよそ100万個のGPCRについて動態解析を行い、分子運動（特に拡散係数）評価を基にGPCRの状態変化を検出した。その可逆的な状態変化の速度定数を求めることで、刺激入力からシグナル伝達に至る、言わば素反応について考察している。Calebiroらは状態変化というアナログな指標について、状態数と状態間遷移を評価するために100万個にも及ぶ1分子解析を行ったが、これは様々な刺激に対して各種上流・下流分子へのシグナル伝達を評価する際には、スループットの観点から不利である。

また 100 万個もの分子を単一細胞で解析はできないため、複数細胞からの結果を積算することになる。すなわち細胞間の個性は平均化により失われることになる。すなわち Calebiro らの報告は、“hot spots”という均一溶液中では生じない特異点の存在を生細胞内で示したことについて高く評価されるが、一方で、シグナル伝達そのものの機構について詳細な評価は十分に成し遂げられていない。一方本申請研究は、まずは拡散運動には注目せず、1 分子動態により初めて検出できる分子ごとの共局在形成/解離というデジタルな反応に注目した。すなわち分子数の計数および共局在イベントの検出という整数で表されるデジタルな指標をシグナル測定に用いることで、同じ 1 分子イメージングでありながら圧倒的に簡便で、かつ細胞ごとおよび空間的なばらつきも評価できる新たなシグナル測定法を提案する。また、本研究においてもシグナル伝達の時空間分布は解析可能であるため、hot spots の検出が実現する。その後 hot spot 形成の過程と機構を解明するために拡散係数などの分子運動について経時変化解析を行うことは有用である。

これらの背景を踏まえ、本研究では受容体を通じて細胞内へとシグナルを入力する現象について、そのシグナル量を 1 分子観察により評価することで、シグナル伝達機構を理解することを試みた。具体的な標的分子としては GPCR の 1 つである FPR1 を選び、下流の G タンパク質と FPR1 のリガンドの 3 種の分子を生細胞中で同時に 1 分子観察した。その結果を基に、受容体へのリガンド結合および受容体集合他の形成とシグナル伝達についての考察を行った。

研究経過

まず、標的分子である FPR1 と G タンパク質を蛍光顕微鏡下で 1 分子可視化するためのプローブを作製した。FPR1 にはベンジルグアニン修飾した有機分子を共有結合により標識できるタンパク質タグである SNAPf タグを N 末端側（細胞外ドメイン）に融合したもの（SNAP-FPR1）の遺伝子を構築した。G タンパク質の標識には、G α サブユニットを対象として、過去に緑色蛍光タンパク質を挿入しても活性を保持したことが報告されている中間部位に春歩かと共有結合を形成するタンパク質タグ Halo タグを挿入したもの（G α -Halo）をコードした遺伝子を作成した。これら遺伝子を組み込んだ発現プラスミドをベクタ

ーとして HEK293 細胞に遺伝子導入し、細胞が本来発現しているのと同等の FPR1 発現量（約 2 分子/ μm^2 ）を示す安定発現株を選抜した。作成した安定発現株を今後の実験に用いた。これらタグ付き FPR1 および G α を共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、SNAP-FPR1 は細胞膜に、G α -Halo は細胞膜にも局在しつつ細胞質にも分布した。この局在は野生型 FPR1 および G α の局在と童謡である。すなわちタグを付加することで FPR1 および G α の局在には影響は現れなかった。タグ付き FPR1 および G α の活性能については、シグナル伝達の下流で生じる cAMP の検出実験（cAMP アッセイ）を行い、いずれも野生型と同様の活性を有していることを確認した。また、SNAP-FPR1 の活性については、G α と G $\beta\gamma$ 間の FRET 測定によって、野生型と同様の活性時間変化を示すことも確かめた。

続いて、SNAP-FPR1 と G α -Halo をそれぞれ Setau647 とテトラメチルローダミン（TMR）で染色し、全反射蛍光顕微鏡を用いて生細胞 1 分子蛍光観察を行った。観察された動画から、FPR1 蛍光輝点の蛍光強度の分布を評価した。その結果、Setau647-SNAPf-FPR1 はガラス上にまいた 1 分子 Setau647 の蛍光強度分布と比較し、より高輝度側に広い分布を示した。この結果は、一部の FPR1 が細胞膜上で集合体を形成していることを示している。また、FPR1 と G α -Halo の 1 分子共局在時間を評価したところ、単量体、集合体どちらの FPR1 に対しても共局在時間に有意差は見られなかった。この細胞に FPR1 のリガンド fMLP を作用させ、同様の評価を行った。その結果、リガンド刺激後には FPR1 集合体の個数が増加した。一方で、FPR1 と G α -Halo の相互作用時間については、単量体/集合体間および刺激前/刺激後の間でいずれも有意差は見られなかった。また、リガンドの代わりに阻害剤を添加した場合においても、集合体の割合は増加し、単量体/集合体間で FPR1 と G α -Halo との共局在時間に有意差は見られなかった。

FPR1 と G α -Halo の 2 色のみの観察では、いずれの FPR1 にリガンド刺激が入力されているのかを判別することができない。そこで、蛍光色素修飾を施したリガンドを用いて、FPR1、G α -Halo、リガンドの 3 色同時生細胞 1 分子観察実験を行った。この観察では、SNAP-FPR1 には Setau647 を、G α -Halo には R110 を、リガンドには TMR を用いてそれぞれ蛍光

標識を施した。リガンドとの共局在が検出された(すなわちリガンドが結合していることが確認できた) FPR1 とリガンドの共局在が検出できなかった FPR1 とで、集合状態や Gα-Halo との共局在時間について比較した。その結果、リガンドが結合した FPR1 の方が集合体の割合が有意に多かった。また、リガンドの結合が確認されなかった単量体、リガンドの結合が確認されなかった集合体、リガンドの結合が確認された単量体、リガンドの結合が確認された集合体の4状態において Gα-Halo との共局在時間を評価した。その結果、リガンドの結合が確認されなかったものでは共局在の時定数は 45.6 ± 0.9 msec (単量体) と 49.4 ± 1.3 msec (集合体) であったのに対し、リガンドの結合が確認されたものでは 53.0 ± 3.5 msec (単量体) と 67.2 ± 5.2 msec (集合体) であった。これらの中で、リガンド結合が検出された集合体のみが、他の3状態と比較して有意差が認められた。すなわち、リガンドが結合した集合体のみが有意に共局在時間が延長していることが明らかとなった。

考察

本研究では2色および3色同時生細胞1分子イメージング実験を行い、FPR1 と Gα、およびリガンドの生細胞上での集合と共局在について可視解析を行った。その結果、刺激前から FPR1 は単量体と集合体が共存しており、リガンドを加えた際には集合体の割合が増加した。集合体の割合の増加はリガンドのみならず、阻害剤を加えた際にも検出された。また、刺激入力前と刺激入力後の集合体との間で Gα との共局在時間には有意差は検出されなかった。

この結果を基に、FPR1 の活性化様式について考察する。一般に GPCR の G タンパク質へとシグナルを伝える機構としては2つのモデルが考えられていた、1つは非活性状態で GPCR と三量体 G タンパク質が結合している複合体モデル、もう1つは活性・非活性状態共に GPCR と G タンパク質が確率論的な衝突を繰り返すとされるランダムコリジョンモデルである。本研究で行った生細胞1分子観察の結果からは、FPR1 と Gα との間に、数 10 msec 程度の共局在が観察された。この結果はすなわち相互作用は安定な複合体形成とは異なるもので、すなわちランダムコリジョンモデルを支持する結果となった。

次に FPR1 の活性状態について考察する。従来は、

集合体の形成と受容体の活性化は同値であり、集合体の形成そのものが受容体の活性化を示していると考えられていた。一方、本研究の結果からは集合体形成自体が高い活性性能を示すために十分なものではないことを示している。一方で、リガンドが結合した単量体も、リガンド刺激前と比較して Gα との共局在時間に有意な変化は見られなかった。すなわち、リガンドが結合することも FPR1 の活性化に対して十分条件とはいえない。唯一 Gα との共局在時間に有意な変化を示したものはリガンドが結合している FPR1 集合体であった。この結果はすなわち、リガンドが結合することと集合体を形成することの2つが揃って初めて FPR1 が十分な活性状態を示すことを表している。

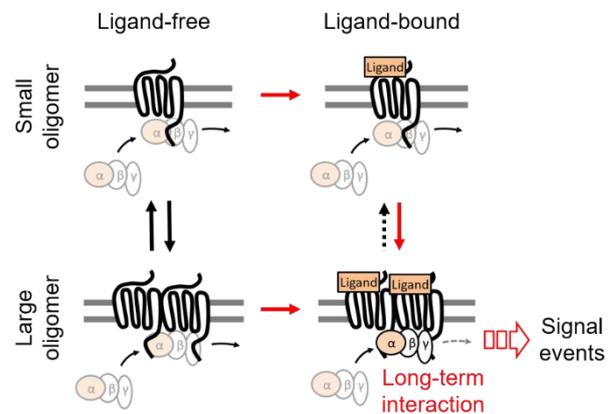


Figure. Schematic of the 2 step activation model of FPR1 proposed from the present single-molecule imaging study.

FPR1 は免疫系における走化性センサーとして機能することが知られている。一方で、表皮細胞などで FPR1 の過剰発現が生じその活性が暴走すると、ステーブンジョンソン症候群による重要躍進の原因となる。すなわち FPR1 は非常に微弱なリガンド濃度勾配を検知する高い感度を有しつつ、その活性を厳密に抑制するという、相反する性質を持つ必要がある。本研究で行った1分子イメージングから得られた2段階活性化モデルによって活性が制御されることで、感度と安定性という相反する性質が実現されていると考えられる。

研究の発表

口頭発表 (いずれも招待講演)

1. "The roles of receptor oligomerization for signal

- transduction - A study through single-molecule live-cell imaging-",
13th International Symposium on Nanomedicine, 2019.12.5, Kobe, Japan.
2. 「分子動態からメカニズムを探る -生細胞 1 分子イメージングを用いたアプローチ-」, 第 11 回光塾, 2019.11.13, 神戸
 3. "Novel optical techniques to explore biological function in single cells",
The 4th STEPS Symposium on Photon Science, 2019.3.21, Tokyo, Japan.
 4. 「1 分子動態解析による細胞内分子作動機構の解明-生細胞 1 分子イメージングによるアプローチ-」, 第 95 回創薬科学セミナー, 2019.2.22, 名古屋
 5. "A single molecule imaging approach to understand signal transduction on the plasma membrane in living cells",
12th International Symposium on Nanomedicine, 2018.12.7, Yamaguchi, Japan.
- 誌上発表
1. Synergetic roles of Formyl Peptide Receptor 1 oligomerization in ligand-induced signal transduction, Tomoki Nishiguchi, Hideaki Yoshimura, Rinshi S. Kasai, Takahiro K. Fujiwara, Takeaki Ozawa, ACS. Chem. Biol., under minor revision.