実験技術

GPCR の構造変化を FRET により捉える FRET による G タンパク質共役型受容体活性化過程の可視化

立山 充博, 久保 義弘

要約：G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は細胞間情報伝達における主要なシグナリング分子である。GPCR の三次元構造の詳細はこれまで不明であったが、近年、X 線結晶構造解析により複数の機能的状態に対応する β アドレナリン受容体の構造が解かれた。一方、GPCR が各構造を遷移する過程、すなわち活性化や脱活性化は、蛍光タンパク質を付加した受容体の蛍光共鳴エネルギー移動 (Förster/fluorescence resonance energy transfer : FRET) の効率を計測することにより捉えることが可能となっている。例えば、family A GPCR では、細胞内第 3 ループと C 末端に蛍光物質を付加した FRET コンストラクトがアゴニスト投与により FRET 効率の減少を示すことが多くの受容体で報告されている。また、GPCR の多くは多量体化することが知られているが、アゴニスト結合が GPCR の多量体形成に与える影響についても、分子間距離の変化を高感度に検出できる FRET 計測により解析可能である。さらに、我々は、G タンパク質活性化機能を有する FRET コンストラクトを用いて G タンパク質による GPCR 活性化構造の安定化作用を示し、また、蛍光タンパク質を付加する部位を工夫することで family C GPCR の活性化様式が family A GPCR とは大きく異なることを示した。これらの研究を中心に、FRET 効率の計測から受容体の状態を捉えることのメリットやその応用などについて紹介したい。

1. 背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は多様な刺激を受容しヘテロ三量体 G タンパク質を介してその情報を細胞内に伝達する膜タンパク質である。GPCR は共通して 7 回膜貫通領域 (7-transmembrane : 7-TMD) という構造的特徴を有するが、family A GPCR ではこの 7-TMD がリガンド結合部位を構成し、また、

7-TMD の細胞質側は G タンパク質に対する選択的結合部位を構成する。近年、Dr. Kobilka のグループによる β アドレナリン受容体 (β AR) の X 線結晶構造解析から、阻害薬結合型構造、アゴニスト結合型構造およびアゴニスト・Gs タンパク質結合型構造が明らかとなり (1-4)、各構造の比較をもとにした受容体活性化モデルや G タンパク質活性化モデルも提示されている。今後、GPCR に関する詳細な構造情報は結晶構造解析によりさらに蓄積されていくものと思われる。

GPCR が各構造を遷移する過程は、ロドプシンでは光依存性活性化・不活性化の遷移状態を分光学的に解析することにより調べられてきたが、ロドプシン以外では下流のシグナリング解析による GPCR 活性化を中心に研究されてきた。現在、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) や生物発光共鳴エネルギー移動 (bioluminescence resonance energy transfer : BRET) を計測することにより、GPCR の構造変化を直接的に捉えることが可能となっている。FRET や BRET を利用した GPCR 活性化およびそのシグナリング解析については、Dr. Lohse による総説に詳細にまとめられている (5)。本稿では、FRET による GPCR 活性化過程の可視化について、我々の研究を中心に紹介したい。

2. FRET

FRET は、隣接する蛍光物質間で起こるエネルギー移動のことで、ドナー蛍光物質が励起エネルギーを隣接するアクセプター蛍光物質に与えるという現象である。そのため、FRET が起こるとドナーの蛍光が減りアクセプターの蛍光が増加する。FRET 効率は、ドナー・アクセプター間の距離 (およそ 10 nm 以内) と発光・吸収遷移モーメントの相対的配向に強く依存するため、FRET 効率の計測から対象とする分子の構造変化や二分子間の会合・解離を捉えることが可能となる

(6). 実際, シグナリング研究に FRET を利用したセンサーなどが用いられている.

現在, 多様な蛍光タンパク質が開発され入手可能となっており, 色々な蛍光タンパク質の組み合わせによる FRET 計測が考えられるが, CFP の蛍光波長と YFP の励起波長の重なりが大きいことや, 対応するダイクロイックミラーやフィルターの入手が容易であることから, 我々は CFP や YFP を受容体に付加した FRET コンストラクトを作製して実験を行っている. そこで, 以降は CFP と YFP の組み合わせでの FRET 計測について記述する. FRET の経時的計測には, ドナーを励起した時のドナーの蛍光強度 (I_{donor}) とアクセプターの蛍光強度 (I_{FRET}) をそれぞれ測定し, その比 ($I_{\text{FRET}}/I_{\text{donor}}$) を算出するレシオ測定法を用いるのが一般的である. 実験では, HEK293 細胞などを poly-L-lysine でコートしたガラスボトムディッシュにて培養し, これに FRET コンストラクトを発現させ, 倒立型蛍光顕微鏡を用いてその蛍光を測定している. 我々は, 各蛍光強度 (I_{donor} と I_{FRET}) を同時に計測するために, ①2 分割光学系 (浜松ホトニクス の w-view, オリンプスの U-SIP など) と CCD カメラを組み合わせたイメージング法, あるいは, ②ダイクロイックミラー (505 nm), 蛍光フィルターおよび二本の光電子増倍管 (photomultiplier tube : PMT) を組み合わせた高時間分解能記録法を用いている. イメージング法は画像のサンプリングに時間的制約があるが, 解析の段階で背景光や CFP 蛍光の持ち込み (bleed-through) など FRET に関与しない成分を除いた正味の FRET 効率 (net FRET, nF) を算出できるため, FRET 効率 (nF/I_{CFP}) に信頼性が保てるという利点がある (7). 一方, PMT を用いる場合, 計測されるのは細胞の自家蛍光や背景光といった FRET に関与しない成分も含んだ蛍光強度 (I_{CFP} と I_{FRET}) であるため, ベースレベルの FRET 効率 ($I_{\text{FRET}}/I_{\text{CFP}}$) の解釈には注意を要するが, セットの立ち上げが安価で済むことと FRET 効率の経時変化を高い時間分解能で記録することが可能であり速度論的解析を行えるという利点がある.

ところで, アゴニスト結合など受容体の活性化過程に関与しない蛍光成分として, 細胞膜に発現せず細胞内に貯留しているコンストラクトからの蛍光が問題となる. 我々は全反射照明顕微鏡 (total internal reflection fluorescence microscope : TIRFM) を利用しエバネッセント光にて細胞膜から数 100 nm 以内を照明する方法により, この問題を解消している.

3. FRET による family A GPCR 活性化の可視化

1) Protomer 内および protomer 間 FRET 効率の測定

アドレナリン受容体などに代表される family A GPCR は, そのリガンド認識部位を 7-TMD に有する. Dr. Lohse らのグループは, α アドレナリン受容体 2 型 ($\alpha_2\text{AR}$) の細胞内第 3 ループ (i3) と C 末端にそれぞれ CFP と YFP を付加し, その FRET 効率がアゴニスト投与により顕著に減少することを初めて報告した (8). この結果は i3 と C 末端の距離が大きくなることを意味するが, βAR の結晶構造解析から明らかとなった構造変化のモデル (i3 に連なる第 6 番目の TM が受容体中心部から離れるように動く) とよく一致するものであり, GPCR の活性化に対応するものと考えられる.

GPCR の多くは単量体として機能すると考えられているが, いくつかの GPCR では多量体化することも知られている. しかしながら, 機能的な単量体 (以下 protomer と記す) の活性化状態が多量体の形成や解離にどのような影響を及ぼすかについては, いまだ議論のあるところである. FRET 解析は protomer の構造変化のみならず protomer 間の会合・解離についても適用できるため, 我々は, 多量体を形成することが知られているムスカリン性アセチルコリン受容体 1, 3 型 ($M_1\text{R}$, $M_3\text{R}$) や代謝型プリン受容体 1 型 ($P2Y_1\text{R}$) について FRET 解析を行った. まず, 各受容体の i3 に YFP を挿入し C 末端に CFP を付加した FRET コンストラクトを作製し FRET 計測を行った. すべての FRET コンストラクトにおいて, アゴニスト投与による FRET 効率の減少が認められた (図 1 左に $M_3\text{R}$ の結果を示す) (9, 10). この結果は i3 と C 末端が離れることを意味するが, ①同一 protomer の i3 と C 末端の距離の増大 (protomer の構造変化), あるいは②隣接する protomer の i3 と C 末端の距離の増大 (多量体から単量体への再構成) によって起こりうる. この点を明らかにするために, i3 に YFP を付加したコンストラクトと C 末端に CFP を付加したコンストラクトをそれぞれ作製し protomer 間での FRET 効率を記録したところ, baseline での FRET 効率も低く ($\text{nF}/I_{\text{CFP}} = 0.023 \pm 0.011$), アゴニスト投与による変化も観察されなかった (図 1 右). したがって, FRET 効率の減少はアゴニスト結合による① protomer 内の構造変化を反映するものであると考えられる. また, $M_3\text{R}$ の i3 に CFP もしくは YFP を付加したコンストラクト間での FRET 効率 ($\text{nF}/I_{\text{CFP}} = 0.067 \pm 0.014$) は多量体形成を示すものであったが, アゴニスト投与による変化は見られなかったことから, アゴニスト結合は $M_3\text{R}$ 多量体の形成

図1 Protomer 内と protomer 間の FRET 解析

(上) ムスカリン性アセチルコリン受容体3型 (M_3R) の FRET コンストラクト。(下) アゴニスト (oxotremorineM : oxo-M, $10 \mu M$) 投与時の FRET 効率 ($nF/ICFP$) の変化。アゴニスト投与により, protomer 内 (左図) での顕著な FRET 効率の減少が見られたが, protomer 間 (右図) では FRET 効率は変化しなかった。(文献9の図3, 4から改変して引用)

や解離に影響を与えないものと考えられる。

2) G タンパク質による GPCR 活性化構造安定化作用

GPCR はアゴニスト結合により活性型構造となり, さらに G タンパク質と結合する。G タンパク質との結合は, binding assay におけるアゴニスト解離時間の遅延や高親和性アゴニスト結合部位の出現を招くことから, 受容体の活性型構造を安定化するものと考えられている。このような G タンパク質の作用も, G タンパク質との結合能を保持した FRET コンストラクトを用いることで解析が可能である。第3細胞内ループなどに蛍光タンパク質を挿入すると, そのサイズの問題から G タンパク質との結合能が消失することが知られているが(11-13), この問題は蛍光タンパク質と M_3R や $P2Y_1R$ の細胞内領域をリンカーでつなぐことにより解消された(9)。リンカーの使用は G タンパク質との結合能の保持という点から有効な手法であると考えられるが, GGS リピートのような flexibility の高い配列はリンカーとして適さないようである(9)。Gq 経路を活性化できる M_3R の FRET コンストラクトを単独で発現させたところ, アゴニスト (oxo-M, $10 \mu M$) の投与により濃度依存的な FRET 効率の減少を示した。次に, FRET コンストラクトと Gq タンパク質を共発現させて FRET 計測を行ったところ, アゴニスト投与による FRET 効率の減少量は顕著に増大し, 濃度作用曲線も左にシフトした (図2)。これらの結果は Gq タンパク質の結合により M_3R の活性型構造が安定化したことを示すものと考えられる。最大濃度のアゴニストによる FRET 効率減少の大きさが Gq タンパク質の有無により異なるという結果は, Gq タンパク質結合

型と非結合型に構造的な差異があることを示唆する。

β アドレナリン受容体では, アゴニストが結合しても細胞内側の結合ポケットは full open の状態には至らず, G タンパク質との結合により full open になるというモデルが提唱されているが(14), M_3R の結果はこのモデルを支持するものである。

Gq タンパク質により濃度作用曲線が左にシフトするという結果から結合・解離速度定数の変化が示唆されたため, FRET 効率の経時変化を記録し速度論的解析を行った。このような解析では, 溶液の切り換えに要する時間が律速となりうるため, 我々はステップモーターを用いた微小灌流法により, 溶液の切り替え時間を 20 ms 以内に短縮して実験を行った。図3には, M_3R での実験結果を示すが, アゴニスト投与による急速な FRET 効率の減少 (活性化, τ_{act}) とアゴニスト除去による FRET 効率の回復 (脱活性化, τ_{rec}) が認められた。Gq タンパク質を共発現させた場合, 活性型への移行速度は変化しなかったが, 脱活性化速度は有意に遅延した。脱活性化時間の延長は, G タンパク質が活性型受容体から解離する過程が含まれるために現れたものと考えられる。

4. FRET による family C GPCR 活性化の可視化

代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor : mGlu) および $GABA_B$ 受容体 ($GABA_B R$) は family C に分類され, リガンド結合部位を有する大きな細胞外領域を有し二量体として機能することの特徴としている。その構造的特徴からも明らかのように, family C GPCR の活性化様式は複雑である。例えば,

図2 Gq タンパク質との結合によるアゴニスト依存性 FRET 変化の増強

(上) ムスカリン性アセチルコリン受容体 3 型 (M₃R) の FRET コンストラクト. (下) Gq タンパク質共発現の有無における, oxo-M (10 μM) 投与時の FRET 効率 (nF/I_{CFP}) の変化 (左) とその濃度作用曲線 (右). Gq タンパク質の共発現により, アゴニスト依存性 FRET 減少量が增大し, 濃度作用曲線も左にシフトした. (文献 9 の図 3, 6 から改変して引用)

図3 速度論的 FRET 解析

(左) ムスカリン性アセチルコリン受容体 3 型 (M₃R) の FRET コンストラクトを用いた速度論的解析. Gq タンパク質共発現の有無における, oxo-M (10 μM) 投与時の FRET 効率 (nF/I_{CFP}) の変化. (右) アゴニスト投与による FRET 効率の減少およびアゴニスト除去による FRET 効率の回復過程を single exponential function にてフィットし (白線), その値 (τ_{act} および τ_{rec}) をまとめたもの. Gq タンパク質の共発現により, 受容体が活性化状態から静止状態に戻る時間が有意に増大した. (文献 9 の図 7 から改変して引用)

ホモ二量体である mGlu では, 一つのサブユニットの細胞外領域にアゴニストが結合すると, アゴニスト結合・非結合サブユニットのそれぞれが G タンパク質を活性化出来ることが知られている (15, 16). また, GB1 と GB2 からなるヘテロ二量体の GABA_BR では, リガンド結合部位は GB1 の細胞外領域のみに存在し G タンパク質の活性化は GB2 のみを介して起こるため, サブユニット間でのクロストークが想定されている. 興味深いことに, GB1 と GB2 の細胞外領域を入れ替えても機能することも知られている (17, 18). このような family C GPCR の活性化様式を説明できる機構はいまだに解明されていない.

Family C GPCR の活性化機構を考える上で, mGlu1

の細胞外領域を用いた X 線結晶構造解析の結果, 即ち, アゴニスト結合により細胞外領域において二量体間の配置転換が起こるという知見は重要である (19). そこで, 我々は, 7-TMD においても配置転換が見られるのかどうかを明らかにするために, family C GPCR の細胞内ループに CFP あるいは YFP を付加したサブユニットを作製し, サブユニット間の FRET 効率を計測した. その結果, アゴニスト投与により有意な変化を示す組み合わせを見出した (図 4). ホモ二量体の mGlu1 では, ①ループ 1 間での FRET 効率は減少, ②ループ 2 間の FRET 効率は逆に増加し, ③ C 末端間では変化はなかった (13). 一方, ヘテロ二量体の GABA_B 受容体では, GB1 のループ 2 と GB2 のループ

図4 Family C GPCRにおけるサブユニット間FRET効率の変化

代謝型グルタミン酸受容体1型(mGlu1)と代謝型GABA受容体(GABA_BR)におけるサブユニット間FRET解析の結果。各サブユニットの細胞内ループ(i1, i2, i3)に、CFPまたはYFPを挿入し、FRET効率を計測した。アゴニスト(glutamate 1 mM for mGlu1, baclofen 100 μM for GABA_BR)投与によるFRET変化を下に示す(点線、FRET効率変化なし; 黒矢印、FRET効率減少; 白矢印、FRET効率上昇)。(文献12, 13の結果に基づいて作製)

1あるいはループ2の間でのみ顕著なFRET減少が観察された(図4)(12)。また、FRETの減少はGB1とGB2の細胞外領域を入れ替えても起こることも確認している。単一サブユニットにCFPとYFPを付加したコンストラクトのサブユニット内FRET効率は、mGlu1においてもGABA_BRにおいてもアゴニスト投与により変化しなかったことから、family C GPCRではアゴニスト結合により7-TMDにおいてもサブユニット間での配置転換が起こるが7-TMDの構造は大きく変化しないことが示された。ただし、mGlu1とGABA_BRでは配置転換の様式が異なると考えられる。近年、mGlu1のC末端同士を結合させてC末端の自由度を減らした状態においては、細胞内第2ループとC末端に付加した蛍光タンパク質間でのサブユニット内FRET効率の減少が報告された(20)。サブユニット内FRETの変化速度がサブユニット間FRETの変化速度より遅いことから、二量体間での配置転換後に7-TMDの構造変化が起きるというmGlu1活性化モデルも提示されている(20)。

5. まとめ

GPCRの静止状態・活性状態など各状態における構造の詳細については、X線結晶構造解析などにより解明が進むものと思われる。一方、各状態間の遷移、即ちGPCRのダイナミックな構造変化を解析する上でFRETを利用した研究は極めて有用であると考えられる。本稿では述べなかったが、FRET効率の変化を指標として多様なアゴニストの効果を比較・検討する研究もなされている(21-23)。また、GPCRシグナリングの各素過程(GPCRの活性化、GPCRとGタンパク質の相互作用、Gタンパク質の活性化、Gタンパク質とeffectorの相互作用など)についてもFRET解析は適用できるため(5)、解析から得られた速度定数を用いてGPCRシグナリングをシミュレートする研究も行われている(11, 24, 25)。今後、FRETによるGPCR活性化も含んだGPCRシグナリングの可視化は、GPCRシグナリングの統合的理解に大きく寄与するものと期待される。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Rasmussen SG, et al. Nature. 2011;469:175-180.
- 2) Rasmussen SG, et al. Nature. 2011;477:549-555.
- 3) Rosenbaum DM, et al. Science. 2007;318:1266-1273.
- 4) Rosenbaum DM, et al. Nature. 2011;469:236-240.
- 5) Lohse MJ, et al. Pharmacol Rev. 2012;64:299-336.
- 6) Miyawaki A. Dev Cell. 2003;4:295-305.
- 7) Xia Z, et al. Biophys J. 2001;81:2395-2402.
- 8) Vilardaga JP, et al. Nat Biotechnol. 2003;21:807-812.
- 9) Tateyama M, et al. Physiological Rep. 2013;1:e00134.
- 10) Tateyama M, et al. Neuropharmacology. 2013;65:173-181.
- 11) Jensen JB, et al. J Gen Physiol. 2009;133:347-359.
- 12) Matsushita S, et al. J Biol Chem. 2010;285:10291-10299.
- 13) Tateyama M, et al. Nat Struct Mol Biol. 2004;11:637-642.
- 14) Nygaard R, et al. Cell. 2013;152:532-542.
- 15) Brock C, et al. J Biol Chem. 2007;282:33000-33008.
- 16) Tateyama M, et al. Neuropharmacology. 2011;61:832-841.
- 17) Galvez T, et al. EMBO J. 2001;20:2152-2159.
- 18) Margeta-Mitrovic M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:14643-14648.
- 19) Kunishima N, et al. Nature. 2000;407:971-977.
- 20) Hlavackova V, et al. Sci Signal. 2012;5:ra59.
- 21) Markovic D, et al. PLoS One. 2012;7:e29946.
- 22) Nikolaev VO, et al. J Biol Chem. 2006;281:24506-24511.
- 23) Tateyama M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:1124-1128.
- 24) Falkenburger BH, et al. J Gen Physiol. 2010;135:81-97.
- 25) Falkenburger BH, et al. J Gen Physiol. 2010;135:99-114.