

研究終了報告書

「多色 1 分子計測による GPCR シグナロソームの動態解明」

研究期間: 2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者: 柳川 正隆

1. 研究のねらい

G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、7 回膜貫通領域を共通の構造モチーフとして持つ膜受容体タンパク質の総称である。細胞外からの入力を受けた GPCR は G タンパク質とアレシチンを通じて複数の細胞内シグナル伝達経路を活性化する。近年の GPCR を標的とした創薬において化合物のシグナル伝達経路選択性(シグナルバイアス)の評価は重要な工程となっており、現在までに様々な GPCR に対して経路選択性の高いバイアスリガンドが開発されている。しかしながら、1 種類の GPCR が細胞内の複数のシグナル伝達経路を選択的に制御するメカニズムは明確でない。本研究では、「細胞膜においてどのような分子機構で GPCR はシグナルバイアスを制御しているのか」という問いに多色 1 分子イメージングを用いてアプローチする。

申請時の目標として、最大 4 色同時 1 分子イメージングが可能な顕微鏡システムを開発し、GPCR の活性化前後で形質膜上に生じる 2 つのシグナロソーム(GRK/アレシチンシグナロソーム)を解析することを提案した。研究代表者は、当初計画を上回る顕微鏡システムを開発し、GPCR-アレシチンの下流で生じるエンドサイトーシス・ERK 経路間のバイアスがどのように制御されているのかを明らかにした。また、本研究で開発した多色 1 分子計測システムは、GPCR 以外にも形質膜で生じる任意の分子間相互作用の動態を定量できるため、受容体チロシンキナーゼ(RTK)や・イオンチャネルといった GPCR 以外の標的についても幅広い共同研究を展開してきた。将来的には、株式会社 ZIDO との産学連携を通じて多色 1 分子計測に基づく薬効薬理評価系の社会実装へとつなげていきたい。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、4 色 1 分子計測・2 色発光計測を組み合わせたマルチモーダルな自動イメージングが可能な顕微鏡システムを開発した。本顕微鏡システムを用いて、アンジオテンシン受容体 AT1R をモデルとした細胞内 1 分子計測・発光計測を行い、リガンドのシグナルバイアスがどのような空間的な制御を受けて実現しているかを解析した。その結果、Gq タンパク質の活性化の有無で、GRK サブタイプ間の細胞膜ドメインへの分配が変化することが明らかになった。この膜ドメイン中に形成される AT1R/Gq/GRK5/6 からなる GRK シグナロソームの動態変化に基づき、AT1R をリン酸化する GRK のサブタイプ選択性が生じ、アレシチンの下流で生じる ERK 経路へのバイアスが変化することが明らかになった。

次に、アレシチン/Raf 複合体を可視化するプローブの発光イメージングおよび、AT1R/アレシチン/Raf の 3 色同時 1 分子タイムラプス計測を実施し、ERK 活性の起点を担うアレシチン/Raf 複合体の細胞膜上での動態を解析した。この結果、AT1R/アレシチン複合体が特定の様式で結合した場合に、アレシチンに対する Raf の親和性が上昇することが明らかになった。ま

た、アレスチンは Raf と安定な複合体を形成せず、酵素反応的に Raf を膜移行させることで ERK 応答を増幅することが分かった。

上記の研究と並行して、バソプレシン受容体 V2R をモデルとして、アレスチンの GPCR に対する結合様式がシグナルバイアスに与える影響を定量した。V2R/アレスチン/クラスリンの 3 色同時 1 分子イメージングを用いて、V2R/アレスチン間の Full 型・Core 型・Tail 型の 3 様式を比較したところ、Tail 型では V2R がアレスチンと共にクラスリン被覆ピット(CCP)に集積してエンドサイトーシスのみが生じる一方、Core 型ではアレスチンが V2R と一過的に相互作用した後、単独で CCP に集積して ERK 応答のみを惹起することが分かった。また、Full 型はエンドサイトーシス・ERK 経路の双方が惹起された。

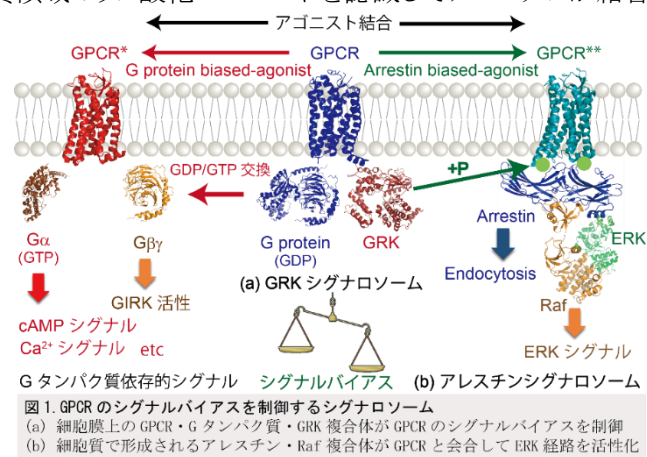
本研究で開発した顕微鏡システム・細胞応答計測手法を用いて、さきがけ領域内外で複数の共同研究を実施し、8 件の原著論文を発表した。2023 年度には高次構造体領域内の下林と共著で本さきがけ研究の将来展望する英文総説を発表した。

(2) 詳細

研究背景・目的

一般に、アゴニストを結合した GPCR は G タンパク質と競合して GRK によるリン酸化を受ける。GRK が付与した GPCR の細胞質領域のリン酸化バーコードを認識してアレスチンが結合し、G タンパク質経路の活性を抑制するとともにアレスチン経路を活性化する(図 1)。

本研究では、最大4色同時1分子イメージングを実現し、細胞内で過渡的に生じる GPCR 高次構造体(シグナロソーム)によるシグナルバイアスの制御機構を解明することを目的とした。具体的には、下記 A-C の課題に取り組んだ。



A) 4 色同時細胞内 1 分子イメージングの計測・解析ワークフローの開発

B) GRK シグナロソームを介したシグナルバイアス制御機構の解明 (図 1a)

C) アレスチンシグナロソームを介したシグナルバイアス制御機構の解明 (図 1b)

A) 4 色同時 1 分子計測システムの構築

当初計画していた 4 色同時 1 分子計測に加え、2 色同時発光イメージングが可能なポートを増設し、同一視野の蛍光・発光イメージングの逐次計測が可能な顕微鏡システムを開発した(図 2)。本システムは、細胞探索 AI・薬液分注ロボット・電動暗箱を搭載しており、96 ウェルプレート中の 1 分子計測に適した領域を自動的に計測することに成功している。

全反射光学系の 4 色化については、当初の計画に基づき速やかに実現した。しかしなが

ら、最も長波長のチャンネルについては 1 分子計測に適した市販の色素が乏しく、特異的標識法から検討する必要があった。スプリットルシフェラーゼアッセイで用いられている LgBiT を GPCR の N 末端に融合することで、ST488/TMR/SF650/SF720(PREX710)標識 HiBiT ペプチドにより任意の波長帯で 1 分子計測できる標識法を開発した。

また、上記の顕微鏡システム開発により撮影可能なデータが飛躍的に増加したため、動画解析の高度・高速化が重要な課題となった。代表者が独自に開発してきた 1 分子動態解析用プログラム(smDynamicsAnalyzer)に、1 分子イメージとバルク TIRF イメージを組み合わせた解析ができるアルゴリズムを実装した。また、固定試料を用いた SMLM 計測動画から観察対象のクラスター形成を可視化・定量するプログラムについても代表者が開発した。

以上の計測・解析ワークフローは、「5.主な研究成果リスト」に挙げる 3 件の代表的な論文をはじめ、研究期間中の共同研究において広く使用されている。

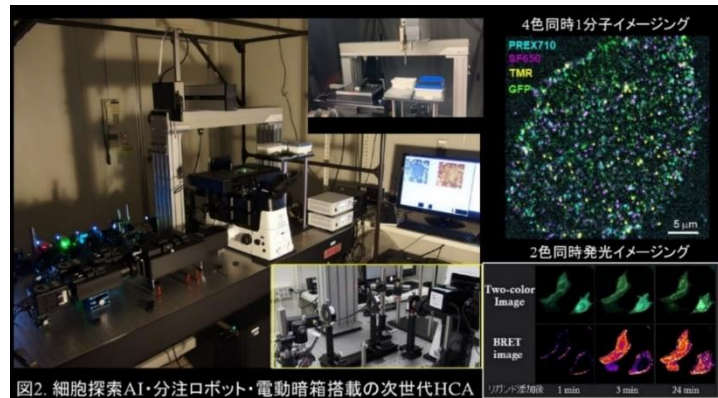


図2. 細胞探索AI・分注ロボット・電動暗箱搭載の次世代HCA

B) GRK シグナロソームを介したシグナルバイアス制御機構の解明

課題 B は当初の計画どおりに進捗し、AT1R/Gq/GRK5/6 複合体によるシグナルバイアス調節機構の論文について、論文発表した(論文 1)。本論文で明らかになったことを図 3 に示す。

まず、2 色同時細胞内 1 分子イメージングと NanoBiT-BRET イメージングにより、薬刺激前から AT1R/Gq/GRK5/6 が細胞膜中の膜ドメインに集積して複合体を形成していることが明らかになった。AT1R の内因性のリガンドである AngII で刺激すると、Gq が活性化する。この時、3 者複合体が解消し、AT1R はより膜ドメインにより集積する一方、GRK5 は膜ドメイン外を単純拡散している成分が増加する。この AT1R と GRK5 の膜ドメインへの親和性の変化を背景として、AT1R-GRK5 間の結合頻度が低下する。一方、GRK2 は Gq 活性化後も AT1R と同じ膜ドメインに集積して AT1R をリン酸化することが分かった。

また、アレスチンバイアスリガンドである TRV027 で刺激をした場合や、阻害剤 YM により Gq の GDP/GTP 交換反応を抑制した状況下で AngII 刺激をした場合は、3 者複合体が膜ドメイン内に維持され、AT1R・GRK5 間の相互作用時間が延びる。これにより GRK5 が選択的に AT1R をリン酸化

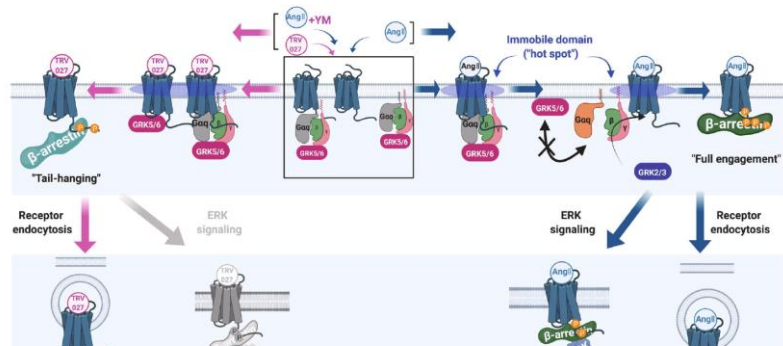


図 3. Gq の活性の有無が AT1R をリン酸化する GRK のサブタイプ選択性を決定し、アレスチンの下流のシグナルバイアスを変化させる。

することが示唆された。これまで GRK2/3 が G タンパク質の $\beta \gamma$ サブユニットを介して GPCR と相互作用することは知られていたが、本研究により Gq α サブユニットも GRK5/6 の細胞膜ドメインへの局在を制御する重要な役割を担うことがはじめて示された。

GRK2/3 と GRK5/6 では AT1R のリン酸化部位が異なる。アレスチンの構造認識抗体と NanoBiT を組み合わせた発光計測から、GRK2/3 でリン酸化された場合は、AT1R とアレスチンがフィンガーloop領域を介して構造変化を伴うコア結合を形成することが明らかになった。一方、GRK5/6 でリン酸化された AT1R は C 末端領域でアレスチンを補足するが、アレスチンの構造変化を惹起しない。このアレスチンの構造変化の有無により、ERK 経路の活性が変化する。

一方、いずれのアレスチン結合様式でも AT1R のクラスリン被覆ピット依存的なエンドサイトーシスは惹起される。以上のように、Gq の活性化の有無が AT1R-アレスチンの下流のシグナルバイアスを制御する新たなメカニズムが明らかになった。

C) アレスチンシグナルソームを介したシグナルバイアス制御機構の解明

C-1) AT1R をモデルとしたアレスチンによる ERK 経路活性化制御機構の解明

本研究では、まず、NanoBiT を用いたアレスチン・Raf 間相互作用を生細胞内で定量できるプローブを開発した。本プローブの発光イメージングにより、細胞質でアレスチンと Raf があらかじめ複合体を形成していることがはじめて明らかになった。AngII または TRV027 刺激により、細胞膜で AT1R が活性化すると、いずれの場合もアレスチン・Raf 複合体が膜移行し、AT1R/アレスチン/Raf の 3 者複合体が増加する。AngII 刺激と TRV027 刺激では、アレスチン・Raf 複合体の細胞膜での親和性が変化し、AngII 刺激ではよりアレスチン・Raf 複合体が増加する一方、TRV027 刺激では減少が認められた。さらに、AT1R/アレスチン/BRAF の 3 者複合体の動態を定量するために 3 色同時 1 分子タイムラプス計測を実施した。

その結果、過去の研究で予想されていたアレスチンと RAF の安定な複合体形成は認められず、AngII 刺激後にのみ BRAF がアレスチンと一過的な相互作用を介して膜移行する様子が観察された。アレスチンは GPCR との特定の結合様式をとることで BRAF との結合頻度が上昇し、BRAF を酵素反応的に形質膜上にリクルートしつづけることで ERK 経路の活性化を促進するという新たな機構を示した。

C-2) V2R をモデルとしたアレスチンの結合状態とシグナルバイアスの連関解明

アレスチンは GPCR の細胞質側コア(Core)とリン酸化 C 末端(Tail)の 2 か所で結合することが知られているが、結合部位と機能の連関は明らかでない。本研究では、GRK 欠損細胞株とアレスチンの Core 結合部位欠損変異体(Δ FLR)を組み合わせて、Core 型・Tail 型・Full 型(Core+Tail)の比較を 1 分子レベルで実施した。アレスチンと安定な結合をする C 末端配列を持つバソプレシン受容体 V2R をモデルとして、V2R/アレスチン/クラスリンの 3 者間相互作用を定量した。その結果、Full 型・Tail 型では V2R とアレスチンが複合体を形成し、クラスリン被覆ピットへの集積しエンドサイトーシスする様子が観察された。一方、Core 型結合のみが生じる条件下では、アレスチンは V2R と一過的な相互作用により弱く形質膜に係留されることが分かっ

た。刺激後 5-10 分で V2R とアレスチンの結合が上昇した後、5 分程度の時間遅れを伴ってアレスチンが単独でクラスリン被覆ピットに蓄積する現象が確認された。ERK の活性化を計測したところ、Core 型に対して Tail 型は高い ERK のリン酸化を引き起こすことが分かった。

したがって、GPCR とアレスチンの Core 型結合は ERK 経路活性化に Tail 型結合はエンドサイトーシスにそれぞれ寄与していることが分かった。さらに Full 型では、Core/Tail が協働的に作用し、エンドサイトーシスと ERK 経路の双方が惹起されることが明らかになった。

3. 今後の展開

本研究で研究代表者が開発した顕微鏡システムの統合制御プログラム AIS は株式会社 ZIDO の協力のもと開発していただいた。一般に、サードパーティの周辺機器を含む顕微鏡システムの統合制御は Nikon 等の大手顕微鏡メーカーへの委託は困難である。本研究では、民間企業にソフトウェア開発を委託すると高額なプログラム開発費を要するところを、ZIDO に依頼することで統合制御プログラム AIS の年間使用ライセンス契約のみでオンデマンドの開発を進めていただいている。一方、計測・解析アルゴリズムについてユーザーの視点からアドバイスをし、実装されたプログラムの検証を研究代表者が実施する形で、ZIDO の製品の改善にもつながっていると自負している。今後、数年間の開発でより安定に、高度・高速な計測・解析を実現していきたいと考えている。

細胞内 1 分子計測・超解像顕微鏡技術を基盤に米国バイオベンチャー eikon therapeutics が設立され、2022 年時点で 66.8 億ドルの資金を調達して創薬を実施しているため、創薬分野においても海外では需要が高まっていると言える。Eikon therapeutics は主に核内の 1 分子計測の自動化を通じた創薬を推進しているため、研究代表者は形質膜およびエンドソームにおける膜受容体を介したシグナル伝達に注力していきたい。まずは、薬理学・創薬における細胞内 1 分子計測の実施例を研究代表者自身が増やすことで、社会的な需要喚起を図る必要があると考えている。

国内においても、1 分子計測・超解像計測が可能な顕微鏡システムは顕微鏡メーカー (Nikon・Evident・シスメックスなど) が開発し市販されているが、96 ウェルプレートで安定な自動多色 1 分子計測ができる装置は存在しない。技術的には、油浸オイル供給の自動化やウェルを跨いだ安定なオートフォーカスの実現が重要な課題である。ZIDO が開発した計測・解析プログラムは年間ライセンス契約で誰もが使用できる状況にあり、本研究で研究代表者が開発した計測・解析フローの部分的な社会実装は段階的に進んでいくと期待される。上記の開発でユーザビリティが向上し、96 ウェルプレートにおける安定かつ高速な多色 1 分子計測が実現した時、次世代ハイコンテント解析システムとしてパッケージ化して販売することを検討したい。

4. 自己評価

4-1) 研究目標の達成状況・研究の進め方

開発目標(2-A)については、顕微鏡システム開発については当初の目標を上回る装置を開発できたと考える。また、蛍光標識法開発・解析プログラム開発の各項目については、当

初計画以上に開発に時間を要したが、目標とし掲げていた4色同時 1 分子計測は期間内に達成した。研究目的(2-B)については、当初の計画どおりに論文発表に至った点で順調であったと考える。また、研究目的(2-C)についても、研究期間内に論文投稿に必要なデータは取得を完了した。今後、論文発表に向けて鋭意努力したい。

4-2) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究の主目的は「GPCR のシグナルバイアス制御機構の解明」であるが、本研究で開発した多色 1 分子計測システムは任意の膜受容体・シグナル伝達分子の計測に応用できる。実際、GPCR・RTK・TRP チャネル等の多様な膜受容体に関わる共同研究を実施し、期間中に 8 件の原著論文を発表・現在 5 件の原著論文を投稿・執筆中である。

産学連携の側面では、3 に記載したとおり、本さがけ研究開始前から進めている株式会社 ZIDO との連携により顕微鏡システム開発を進めている他、開発した装置の宣伝を 2022 年度の第 60 回生物物理学会年会(函館)において浜松ホトニクス社 BP セミナーで実施した。本セミナーで発表した動画に関連し、顕微鏡システム本体の写真および発光イメージは浜松ホトニクス社 HP・カタログで qCMOS カメラ ORCA Quest の撮影例として掲載された (<https://www.hamamatsu.com/jp/ja/product/cameras/qcmos-cameras/C15550-22UP.html>)。さらに、研究代表者が開発した薬効薬理評価系に基づき、製薬ベンチャー企業(アークメディスン)と共同研究を 2021 年度に実施した。本共同研究は、先方の化合物の導出により早期に完了したが、研究代表者の開発している技術の需要を裏付けるものであったと考える。以上の産学連携に基づき、研究代表者は理研桜舞賞(産業連携賞)を 2022 年に受賞した。

以上のように、本さがけ研究は社会的に需要のある薬効薬理評価技術のシーズ開発につながったと考えられるが、産業界で広く使われる技術として普及するには計測・解析の安定性・スループットが不足している。さがけのような個人研究の範疇を超えるため、今後はより大規模な予算を調達して産学でチームを組み、研究・開発にあたる必要があると考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 8件

1. “Heterotrimeric Gq proteins act as a switch for GRK5/6 selectivity underlying β -arrestin transducer bias”
Kouki Kawakami*, Masataka Yanagawa*, Suzune Hiratsuka, Misaki Yoshida, Yuki Ono, Michio Hiroshima, Masahiro Ueda, Junken Aoki, Yasushi Sako, Asuka Inoue
Nature Communications 13(1) 487-487, 2022 (*Co-first)

Class A GPCR のモデルとしてアンジオテンシン受容体 AT1R の細胞内 1 分子計測・発光イメージングを行い、GRK のサブタイプ選択性がシグナロソーム(GPCR・Gq・GRK5/6 が集積した膜ドメイン)の動態変化により制御されることを発見した。Gq 活性化の有無に応じた GRK サブタイプ選択性の違いが AT1R に対するアレスチンの結合様式を変え、アレスチンの下流で生じ

る ERK 応答・エンドサイトーシス間のシグナルバイアスが生じることが示された。

2. “PMP2/FABP8 induces PI(4,5)P₂-dependent transbilayer reorganization of sphingomyelin in the plasma membrane”

Mitsuhiro Abe, Asami Makino, Motohide Murate, Françoise Hullin-Matsuda, Masataka Yanagawa, Yasushi Sako, Toshihide Kobayashi
Cell Reports 37(6) 109935-109935 2021

膜ドメインは膜受容体を介したシグナル伝達の場合として重要な役割を担う。スフィンゴミエリン (SM) は主に脂質二重膜外葉に分布し、コレステロール・内層の PIP₂ とともに脂質ラフトを形成している。また、一部の SM は内葉にも局在し、ナドメインを形成していることが知られているが、どのようにして SM が外葉から内葉に移動しているのかは不明であった。本研究では、遺伝学的スクリーニングから SM の外葉から内葉への移行を促進するタンパク質 PMP2 を同定した。柳川は、超解像・1 分子イメージングを担当し、細胞膜内葉の PIP₂ に PMP2 結合して膜の曲率を変えることで外葉の SM を内葉に移行させるという機序を解明した。また、PMP2 の機能昂進が TRPV4 チャネルの活性に与える影響を評価し、シャルコー・マリー・トゥース病の分子機序の一端を解明した。

3. “DNA-based synthetic growth factor surrogates with fine-tuned agonism”

Momoko Akiyama, Ryosuke Ueki, Masataka Yanagawa, Mitsuhiro Abe, Michio Hiroshima, Yasushi Sako, Shinsuke Sando
Angewandte Chemie International Edition 60(42):22745-22752, 2021

肝細胞増殖因子受容体 Met の活性を段階的に調節可能な DNA アプタマーリガンドを開発し、*in vitro*・*in cell* レベルでの薬効薬理評価を実施した。柳川は、細胞内 1 分子イメージングを用いて、親和性の異なる DNA アプタマーが Met に対して設計したとおりの結合特性を示すことを培養細胞レベルで検証した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数： 0 件 (特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

“Single-molecule imaging analysis of G protein-coupled receptor signalosome”

Masataka Yanagawa

2023 East Asian Single-Molecule Biophysics Symposium, Wenzhou, China. Sep. 22, 2023.

2022 Chinese Biophysics Congress, China (Online), Dec. 3, 2022 (Co-chair)

第 45 回日本分子生物学会年会 日本生物物理学会共催, 2022 年 12 月 1 日

(国際ワークショップ共催・発表)

受賞

“1 分子イメージング技術を用いた GPCR 標的化合物の薬理解析”

柳川 正隆

理化学研究所 桜舞賞(産業連携賞), 2022 年 3 月 23 日

総説

“Multi-dimensional condensation of intracellular biomolecules”

Masataka Yanagawa*, Shunsuke F. Shimobayashi*

The Journal of Biochemistry, mvad095, 2023 (*co-corresponding author)

著書

“Workflows of the Single-Molecule Imaging Analysis in Living Cells: Tutorial Guidance to the Measurement of the Drug Effects on a GPCR”

Masataka Yanagawa*, Yasushi Sako

Methods in Molecular Biology 391-441 2021

(Invited Book Chapter, *Corresponding author)

プレスリリース

“シグナル伝達の「偏り」を生み出すリン酸化機構の解明 ～副作用を切り分けた GPCR 作動薬の開発に貢献～”

https://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20220210_03web_signal.pdf