

17. GPCR シグナル伝達系の動的符号化原理の解明

京都大学・大学院生命科学研究科 細胞周期学分野 教授 青木 一洋

概要

ヒトのゲノムに約 800 種類もコードされている GPCR が、どうやって 4 種類の Gα タンパク質のみで情報を符号化するのかという問いには十分には答えられていない。本研究では、GPCR の下流の動的な変化に情報が符号化される「動的符号化 (dynamic encoding)」を実証することを試みた。GPCR の下流シグナル (cAMP、Ca²⁺、ERK、RhoA) を可視化し、GPCR によって駆動される下流シグナルの動態を観察した。その結果、期待通り GPCR の活性化は多様な下流シグナル動態を生み出すことを見出した (一過的、持続的、パルス、振動など)。さらに、この多様な下流シグナル動態を生み出す仕組みは GPCR 自身の 6 番目と 7 番目の膜貫通ドメインが重要であることを示唆する結果を得た。本研究で示された結果は、新たな創薬の標的として貴重な示唆を与えるものであるとともに、遺伝子発現ネットワークや代謝ネットワークといったネットワーク構造にも適応できる概念であり、本研究の波及効果が期待される。

背景および目的

細胞は様々な種類の刺激を「入力」として受容し、細胞内でその情報を処理して、適応的な遺伝子発現や表現型を「出力」することで細胞自身や組織、個体としての恒常性を維持する。G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は多様な細胞外のリガンドを感知する受容体群である。ヒトのゲノムには約 800 種類もの GPCR がコードされている。GPCR の下流で機能する G タンパク質は主に Gas、Gai、Gaq、Gα12/13 の 4 種類であり、それぞれ cAMP 合成の促進、cAMP 合成の阻害、Ca²⁺シグナル、RhoA シグナルといったシグナル伝達を引き起こす。しかしながら、どうやって細胞はたった 4 種類の細胞内シグナル伝達タンパク質のみで約 800 種類もの受容体の情報を符号化するのか、そもそもどれくらいの情報を細胞は得ることができるのかという問いには十分には答えられていない。

近年、シグナル伝達タンパク質の ON/OFF ではなくその動的な変化に情報が符号化される「動的符号化 (dynamic encoding)」というアイデアが我々を含め複数のグループから提唱されてきた。私たちはこのアイデアを GPCR シグナル伝達にも適応できるのではないかと仮説を立て、本研究でそれを実証することを試みた。本研究で示された結果は、新たな創薬の標的として貴重な示唆を与えるものであるとともに、遺伝子発現ネットワークや代謝ネットワークといった別のネットワークにも適用可能な概念であり、本研究の波及効果が期待される。

方法

GPCR シグナル伝達系の動的符号化を示すためには、①実際に様々な GPCR をリガンドで刺激し、下流のシグナル伝達系の動的変化が実際に多様な動態を示すのか、②GPCR がどうやって多様な下流のシグナル伝達動態を生み出すのか、③GPCR の下流の多様な動態がどうやって複雑な表現型へと逆符号化されるのか、の 3 点を示す必要がある。本研究では、①、②に絞って解析を行った。

①に関しては、GPCR の下流シグナルとして代表的な cAMP、Ca²⁺、ERK、RhoA の 4 種類の分子を選択し、これらの動態を細胞内で可視化する蛍光バイオセンサーを安定的に発現する HeLa 細胞を樹立した。この HeLa 細胞にヒトの GPCR のうちリガンドが明確に分かっている 80 種類をピックアップし、一つずつ過剰発現し、リガンドで刺激した際の応答をタイムラプス生細胞イメージングにより取得した。これらの画像データから動的な情報を画像解析により抽出し、動態の特徴量を計算した。②に関しては、得られた時系列データを解析し、同じリガンドで同じ Gα タンパク質を活性化することが知られているが異なる動態を引き起こす GPCR を標的とした。GPCR のどのドメインが異なる動態を生み出すのかを調べるため、各ドメインをスワッピングし、下流のシグナル伝達動態を可視化した。

結果および考察

cAMP、Ca²⁺、ERK、RhoA を可視化するための蛍光バイオセンサーを安定的に発現する HeLa 細胞をまず樹立した。この細胞株を用いることで、GPCR の下流の動態を効率よく可視化できる系を確立した。次に、標的とする 80 種類の GPCR について、それぞれのリガンドをこの HeLa 細胞に添加し、応答するものに関しては内在性の GPCR が発現しているものとし、応答が起きた下流シグナルに関しては解析から除外した。次に、各 GPCR を HeLa 細胞に発現させ、リガンドで刺激したときの応答を観察した。その結果、期待通り多様な下流シグナルの応答を観察することができた。cAMP、RhoA に関しては、一過的な応答から持続的な応答が、Ca²⁺に関しては一過的な応答、持続的な応答だけでなく、振動現象を引き起こす GPCR も多数観察された。ERK に関しては、不活性化した後、活性化するような動態を引き起こす GPCR 群が観察された。これらの時系列データを基に、活性化のピーク、積分値、平均値、変動係数といった時系列データの特徴量を抽出し、定量化した。また、Inoue らの解析から、どの GPCR がどの Gα サブユニットと結合するかというデータが得られている (Inoue, Cell, 2019)。そこで、我々のデータと比較したところ、Gα タンパク質と下流のシグナルはある程度相関があるものの、GPCR と Gα タンパク質との結合は必ずしも下流シグナルの応答を引き起こすわけではないという意外な結果が得られた。さらに Gα タンパク質のサブタイプと下流シグナルの応答とは関連がないことが分かった。この結果は、下流シグナルの異なる動態は Gα タンパク質の階層ではなく、GPCR の階層で決まっていることを示唆していた。

そこで、GPCR がどのようにして異なる下流シグナルの動態を引き起こしているのかを検討した。進化的に近く、同じリガンドで活性化され、同じ Gα タンパク質と結合するが異なる動態を生み出す ADRA1A と ADRA1B に着目した。前者はノルアドレナリン刺激で持続的な Ca²⁺応答を示すが、後者はパルスや振動様の Ca²⁺応答を示す。そこで、ADRA1A と ADRA1B のスワッピング変異体を作製し、Ca²⁺応答を観察した。その結果、6 番目と 7 番目の膜貫通ドメインが異なる Ca²⁺の動態を引き起こすために重要であることを見出した。この結果は、GPCR の配列自体に下流シグナル動態を決めることを示唆している。データを蓄積することで、機械学習的手法により判別器を作成することができるのではないかと考えている。

本研究成果は、膨大な種類の GPCR がどのようにして限られた細胞内シグナル伝達分子を使って情報を符号化するのかという問いに対して、動的符号化という可能性を示す結果である。本研究で示された GPCR の 6 番目と 7 番目の膜貫通ドメインが下流シグナルの動態に重要であるという結果は、新たな創薬の標的として貴重な示唆を与えるものであると考える。また、このような膨大な上流と限られた数の中間層、膨大な下流層という「蝶ネクタイ」のようなネットワーク構造は GPCR のような細胞内シグナル伝達系だけでなく、遺伝子発現ネットワークや代謝ネットワークにも頻繁に見出される構造である。こういった蝶ネクタイ構造は、シンプルな ON/OFF の情報のやり取りだと情報量が欠損することが情報理論的に示されるが、動的な情報を使うことで下流に十分な情報量を伝えることができると考えられ、本研究の波及効果が期待される。

謝辞

本研究をサポートいただき、感謝いたします。本研究成果はまだ論文化に至っていませんが、近いうちに必ず論文として発表します。また、本助成期間中に、基礎生物学研究所から京都大学生命科学研究科に研究室を異動

するという個人的な事情が発生し、多大なご迷惑をおかけしました。引っ越しの際に故障した機器の修理代をこの研究助成から出すことをお許しいただき、とても助かりました。

(完)

引用文献

- 1) Asuka Inoue, Francesco Raimondi, Francois Marie Ngako Kadji, Gurdeep Singh, Takayuki Kishi, Akiharu Uwamizu, Yuki Ono, Yuji Shinjo, Satoru Ishida, Nadia Arang, Kouki Kawakami, J Silvio Gutkind, Junken Aoki, Robert B Russell. Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. Cell, 2019, 177(7):1933-1947.