

# News Release

2011年2月8日

京都大学 物質-細胞統合システム拠点

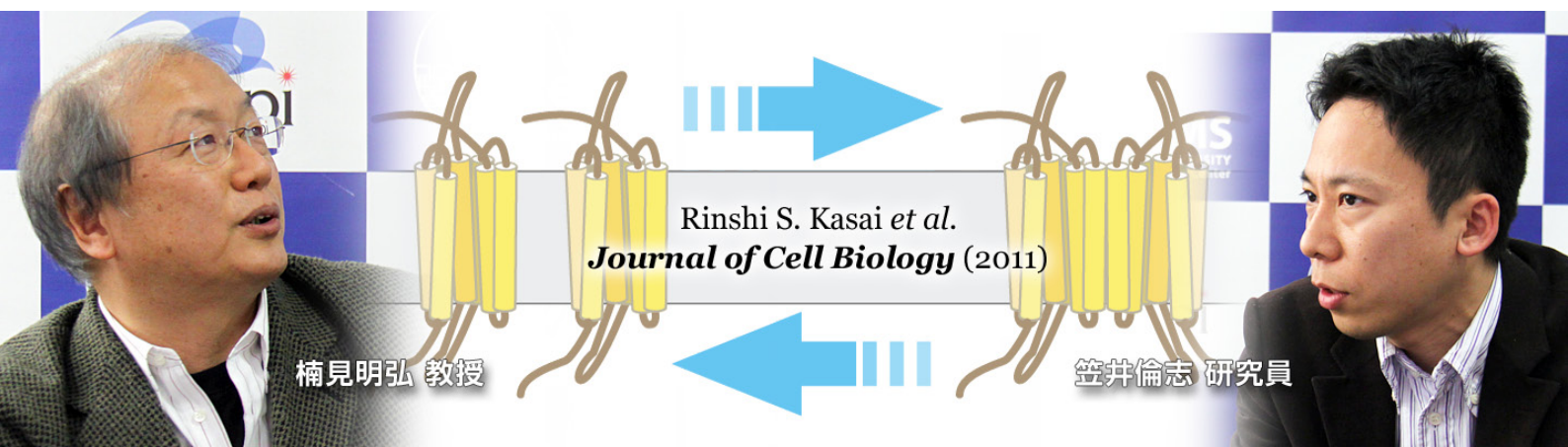
## 受容体 GPCR の 2 分子結合・解離の定量計測に成功 — 分野横断的な薬剤開発研究に道を拓く —

**楠見明弘** 京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) 教授、**笠井倫志** iCeMS 研究員、**エリック・プロスニツ** ニューメキシコ大学教授らの研究チームは、細胞膜での 2 分子結合の定量計測法の開発に世界で初めて成功し、医薬分野で最も重要な受容体クラス GPCR の 2 分子結合の決定にも成功しました。

G タンパク質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor = GPCR) には、約 1000 種類のものがあり、ヒトゲノムの 3% を占める一番大きなスーパーファミリーを形成しています。認知・情動・感覚・代謝・内分泌・循環・炎症・免疫などの多様な生理的機能に関与しています。GPCR の重要性は GPCR の異常が多くの深刻な疾患の原因となることから明らかでしょう。実際、全世界の新薬開発費用のおよそ半分が、GPCR に結合する新薬開発にあてられています。

GPCR は、1 分子がソロで働くとすると説明が難しい働きをしたり、異種 GPCR 2 分子の間でシグナルをやりとりするように見えることが広く知られていました。しかし、2 分子で働くという確たる証拠は得られず、このように重要な受容体でありながら、2 分子のペアで働くのか、1 分子がソロで働くのかは、この 15 年来の重要課題でした。この問題に、1 分子イメージングのメスを入れることにより、非常に明解に、この問題が解決されました。すなわち、GPCR は 1 秒間に 4 回くらい相手を変えながら 2 分子対を形成し、1 分子と 2 分子の 2 つの状態の間を行き来していたのです。

本研究で開発された方法により、他の膜分子の結合・解離も調べられるようになりました。このような定量解析が進むことによってはじめて、受容体とシグナルネットワークのシステム生物学・薬学の大きな進展が可能となり、さらに、細胞膜でのシグナル伝達という重要な現象が、物理・化学・工学・生物学・医学薬学などの分野横断的な研究対象となり得ます。また、新しい薬剤デザインとして、GPCR を 2 量体だけに、あるいは、単量体だけにするという道が示されました。



楠見明弘 教授

笠井倫志 研究員

本成果は、独立行政法人科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 ICORP（国際共同型）研究「膜機構プロジェクト」（研究総括：楠見明弘、Satyajit Mayor）と、JST 同事業さがけ（個人型）研究「生命システムの動作原理と基盤技術」（領域総括：中西重忠）の支援を受け実現したもので、米科学誌『ジャーナル・オブ・セルバイオロジー』オンライン版に2011年2月7日付で公開されました。誌面では2011年2月11日号に掲載予定です（ともに米国東部時間）。

## はじめに（全体概要）

受容体には、細胞外からの伝令分子が結合した後、単分子（ソロ）が結合して2分子でペアを作って働くもの（デュオ、ペア、コンビ）が多数あります。しかし、GPCRは、細胞外からの命令分子が結合する前からデュオを作っている可能性、異種のGPCR同士でもデュオを作っている可能性が指摘され、この15年くらい、GPCRがソロかデュオかという熱い論争が続いています。上記のように1000種もの受容体の働き方や制御薬剤の開発にかかわる、重要な問題だったのです。

私たちは、9年間の努力を重ねた結果、1蛍光分子追跡法を用いて、この15年来の難問の解決に成功しました。しかも、非常に本質的な解決をおこない、細胞膜のすべての分子について、結合を定量的に計測することが出来るようになりました。GPCRについては、単に、ソロかデュオかというのではなく、ソロとデュオの間の「平衡定数（解離定数）」の決定に成功しました。すなわち、細胞膜上のGPCR分子の個数を決めればソロとデュオの個数を計算できるようになったのです。

GPCRの代表選手として、走化性受容体であるフォルミルペプチド受容体FPRを選びました。生理的条件下では、一つの細胞の細胞膜には約6000分子のFPRがありますが、そのうち2000分子はソロ、4000分子はデュオ（デュオの数は2000個）であることがわかりました。つまり、ソロとデュオの両方が存在していたのです。このような「平衡」という、分子の世界では当たり前過ぎる概念が、生物学・医学の領域では忘れられていて、混乱を招いていたのです。

さらに、1分子イメージングによる定量を、超高速の4ミリ秒毎（1秒間に250コマ）に行うことに成功しました。そこから特別に面白いことがわかりました。デュオの寿命は0.1秒しかなく、デュオはすぐにソロになってしまうのです。こんなに早くデュオがソロに分解すると、デュオはなくなってしまいそうですが、ソロはすぐに（0.15秒程度で）またデュオになります。分解されても、次々とデュオが作られてくるのです。FPRは、デュオを作ったと思ったらすぐにソロに分解し、また別のソロとデュオを作り、それもすぐに分解してしまうけれどまた別のソロとデュオを作る、これを、1秒間に4回というスピードで行っていたのです。時間分解能4ミリ秒（0.004秒）で1分子ずつを追跡する方法が開発できたので、このような、ソロとデュオの激しい変換が、世界で初めて見えてきたのです。これでは、今までの方法では、ソロとデュオがよくわからなかったのも、無理はありませんね。それで、今の方法を、「スーパー定量法」と、名付けました。

結果を、簡単に素っ気ない科学の言葉でまとめると、以下のようになります。

「生細胞の細胞膜中で、FPR 2 量体（デュオ）の 2 次元の解離定数（2D-KD）として、3.6 個/ $\mu\text{m}^2$  を得た。さらに、2 量体の解離速度定数 ( $k_d$ )= $11.0 \text{ s}^{-1}$ （2 量体寿命=91 ミリ秒）、2 量体の単量体（ソロ）からの生成速度 ( $k_a$ )= $3.1 [\text{個}/\mu\text{m}^2]^{-1} \text{ s}^{-1}$  を得た。これは、細胞膜上で、2 量体の 2 次元解離定数と、2 量体の形成と解離の速度定数が決定された最初の例である。」

これだけのために、9 年間が必要だった理由は、新しい方法開発が必要だったからです。1 蛍光分子イメージング法を基礎とした観察法を用いましたが、（1）画面上の全ての輝点を同定して数を数える方法の開発、（2）単なる見かけの 2 量体の数の引き算、（3）高速観察法の開発などが必要でした。さらに、このように 1 個ずつ観察しても、さらに以下の 3 つの問題を解決する必要がありました。（1）すべての目的分子を標識することができない、（2）標識率  $f$  を求めるのが難しい、（3） $f$  を求めても、画像中で見えている輝点の数から、実際の分子の数へと変換するのが難しい。本研究では、これらを全て解決し、1 蛍光分子画像の高速連続撮像によって、FPR の単量体と 2 量体が次々と入れ替わり生成するという挙動を、完全に定量化して記述することに成功したのです。

そのほか、シグナル伝達の仕組みの本質に関わる、以下のポイントが重要です。

- （1）細胞膜のような 2 次元空間では、分子の会合が極めて起こりやすい。細胞膜は液体であり、熱揺らぎが大きく働くので、2 量体はすぐに単量体が変わる。
- （2）FPR 分子がペアを作ることで、それぞれの分子の構造が特定の構造に収斂されている可能性がある。FPR のソロ分子が、別の FPR 分子とペアを組み替えていくことで、全ての FPR 分子を、特定の構造に落とし込んでいる可能性がある。
- （3）異種の GPCR 分子が会合し、A という GPCR に細胞外からの伝令分子が結合したとき、B という異種の GPCR が活性化する例が知られている。これも、本研究で見いだされたように、GPCR 同士が次々とペアを変えていくことによって、シグナルが増幅されている可能性がある。

## 1. 研究の背景と経緯

### • 細胞膜での受容体によるシグナル伝達の機構：デュオの関与

細胞膜の最も重要な働きの一つは、外界からやってきた「増殖せよ」「分化せよ」「移動せよ」などという命令を持った伝令分子を受容体というタンパク質で受け取り、細胞内に伝えることです。このようなシグナル分子が受容体に結合すると、いくつかの代表的な受容体では、2 分子の受容体が結合します（「会合」といいます）。会合すると、細胞内の信号伝達分子は、受容体がソロではなくデュオ（ペア、コンビ）になったことを、何らかの方法で読み取って、核や細胞骨格に変化を誘導します。すなわち、これらの受容体では細胞膜での細胞外から細胞内への信号伝達では、受容体がデュオになることが重要です。

一方、最初のページで述べたように、GPCRは、細胞外からの命令分子が結合する前からデュオを作っている可能性、**異種の GPCR 同士もデュオ**である可能性が指摘されたのです。そのため、この15年くらい、GPCRがソロかデュオかという熱い論争が続いていました。どちらが正しいのかは、医学・薬学・農学・生物学の教科書が書き換わるような、非常に大きな関心事だったのです。

- フォルミルペプチド受容体 (FPR) とは？

GPCRのパラダイムとして使用したのは、フォルミルペプチド受容体 (Formyl Peptide Receptor = FPR) と呼ばれる細胞膜上の受容体です。ヒトの体に細菌がはいると、免疫細胞が攻撃のために移動していきますが、このとき感染部位からは、免疫細胞に「移動しなさい」という命令分子 formyl peptide が出されます。この命令分子を受け取る受容体が、このフォルミルペプチド受容体 (FPR) です。

- GPCR はソロかデュオかという問題設定自体が問題！！

GPCRはソロかデュオかという論争が15年も続いた原因は何でしょうか？ それは、生きている細胞の細胞膜で、ソロかデュオかをはっきりと決める方法がなく、科学者は極めて定性的な方法で、この問題に取り組もうとしたからです。例えば、実際には、70%がデュオ、30%がソロとしましょう。デュオを見つけようとする研究者は、デュオを何とか検知できる方法と条件を探して、デュオを「発見」します。ソロを見つけようとする研究者は、ソロを何とか検知できる方法と条件を探して、ソロを「発見」します。このようなことが繰り返されてきたのです。

しかし、このような研究は、いままでほとんど実らなかったと言えます。実らなかった理由は2つあります。

- (1) ソロかデュオかというのをちゃんと決めるためのよい方法がなかったから
- (2) ソロの分子はずっとソロ、デュオのものはずっとデュオという間違っただけの固定観念に、ほとんどの生物学者は支配されていたから。

(2)の方は少しわかりにくいので説明しましょう。ソロもデュオも日常世界とはかけ離れて小さな分子が、液体の細胞膜に浮いています。このような世界での現象は、我々の日常経験する世界とは違い、熱揺らぎとブラウン運動が支配する世界です。これは、大きさのスケールで言うとナノ～メゾ、すなわち、0.5~300 nmあたりの世界です。ここでは、熱揺らぎとブラウン運動が現象を支配しているので、デュオができて、実際にはすぐに離れるはずというごく当たり前の考えなのですが、この考えは、生物関連の研究者には一般的でなかったのです。しかし逆に、熱揺らぎのため個々の分子は動き回っているので、ソロの分子同士も簡単に衝突し、デュオになる機会が産まれます（ぶつかっただけではデュオになるとは限りません）。つまり、熱によるブラウン運動のために、ソロ分子もデュオになれるし、デュオ分子もソロになれるのです。ナノ～メゾワールドにおける基礎的な考え方で、しかも分子の働きに重要な点です。iCeMSの重要な目的の一つは、このようなメゾワールドを探検し、そこを支配する法則を理解し、それを技術の基盤として応用するような分野横断的な境界領域を樹立する

ことです。したがって、本研究は、非常にiCeMS的と言うことが出来ます。つまり、ある分子がソロかデュオかを定める、という問題設定自体が、実は間違っていたと言えます。

## 2. 研究の内容

### • ソロの結合によるデュオ生成と、デュオの分裂によるソロ生成：動的平衡

ここまで、概念がはっきりさせることが出来ると、間違った固定観念からは抜け出せているので、何を調べ、何を測ればよいかということが分かります。すなわち、「細胞膜上にいるFPRの個数（正しくは細胞の表面積で割った数密度）を求め、このようなナノ～メソワールドの熱揺らぎの中で、ソロとデュオの割合を決め、さらに、ソロでいる時間とデュオでいる時間を測る」。つまり、「 $A + A \rightleftharpoons 2A$ 」という簡単な式で示される結合・解離の速度とバランス（平衡）を求めようということです。化学平衡と速度の理論により、実際には、ある温度で（これが揺らぎの度合いを決めます）「平衡定数」というのを決定しておけば、細胞毎にFPRの数密度を求めると、計算で、ソロとデュオのFPRの個数が求められます。平衡定数は、右向きと左向きの速度の比です。

動的平衡は、分子の世界の重要な現象で、化学反応の柱です。化学平衡の概念は、1884年頃にフランスのアンリ・ル・シャトリエとオランダのファント・ホッフ（ベルリン大学教授時代、第1回ノーベル化学賞受賞）によって確立されました。その後、窒素と水素からアンモニアを合成する反応（1911年、ハーバー・ボッシュ法、人工的窒素固定の成功！！これから作られた化学肥料（尿素）のため、ドイツで初めて小麦生産が可能になり、水と石炭と空気からパンを作る方法と言われた）の成功に化学平衡の概念が大きく寄与したため、重要な概念として、定着しました。しかし、化学の教育では、動的平衡は非常に重要だが、教えることが難しい概念として知られており（順反応と逆反応のバランスで、産物の収率が決まる。一方向でないところが難しい。化学教育の研究誌では、如何にこれを教えるかという論文が多数出版されている）、生物医学分野で、動的平衡の概念が定着するのが難しいのは無理もないこととも言えます。

### • 1分子イメージングの結果

図1a、あるいは、図2aのように、CHO細胞にFPRを発現させ、細胞外からの伝令分子フォルミルペプチドを蛍光分子を正式に1個結合させたもの、あるいは、FPR-GFPをCHO細胞に発現させ、1分子観察しました。その画像を、それぞれ、図1bと図2bに示します。

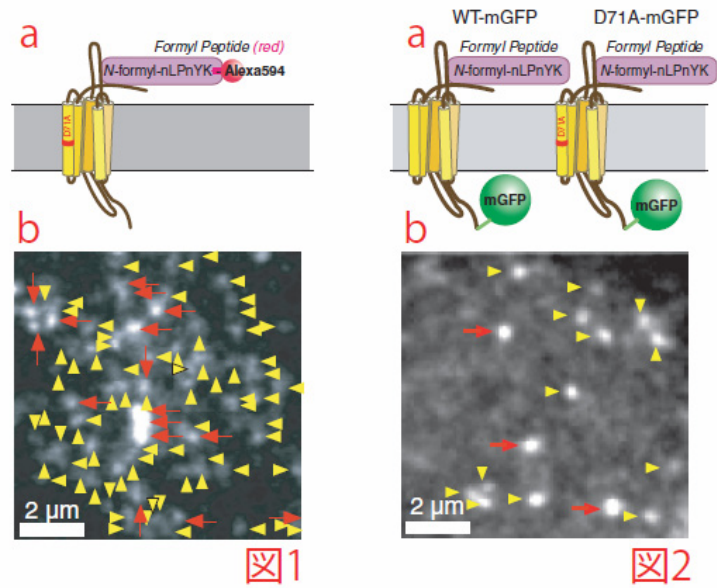


図1 FP-Alexa694 図2 FPR-GFP

両方の図ともに、黄色が1分子強度、赤が2分子強度の輝点

- ソロかデュオかが分かっている分子でのテスト

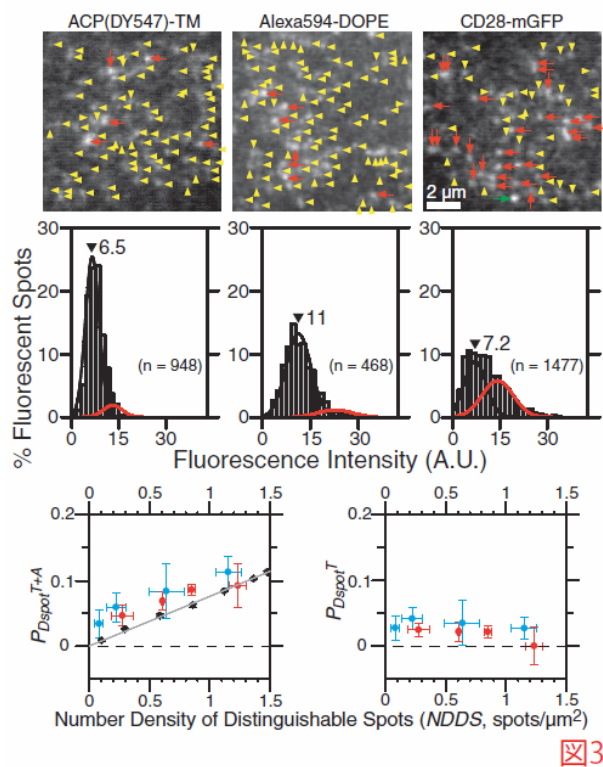


図3 ソロと分かっている分子と（左と真ん中）、デュオと分かっている分子の結果（右）。一番下の段の結果は、ソロ分子の偶然的重なりは予測可能で、引き算できることを示している。

- 細胞膜上でのFPRの数密度を変化させて、ソロとデュオの間の「平衡定数」を求めた

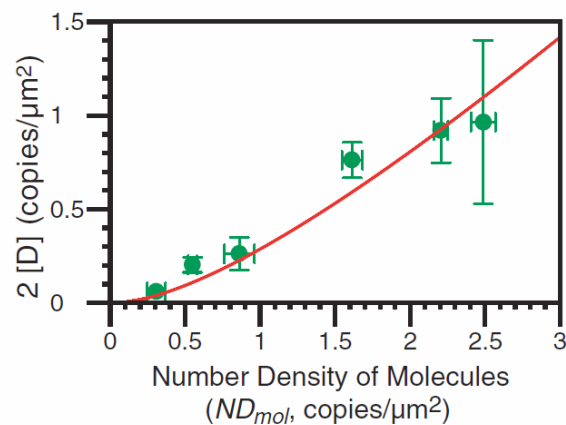


図4

図4 下の式を、理論的に求めた。その式でフィッティング（赤線）して、平衡定数（解離定数）を求めた。

$2 [D] =$

$$\frac{4 \cdot ND_{mol} + K_D - \sqrt{8 \cdot ND_{mol} \cdot K_D + K_D^2}}{4}$$

- FPRはソロ分子が結合してとデュオを作り、また分解してソロとなり、さらに次には、別のソロ分子と結合してデュオを作る。これを、1秒間に4回のペースで繰り返す。

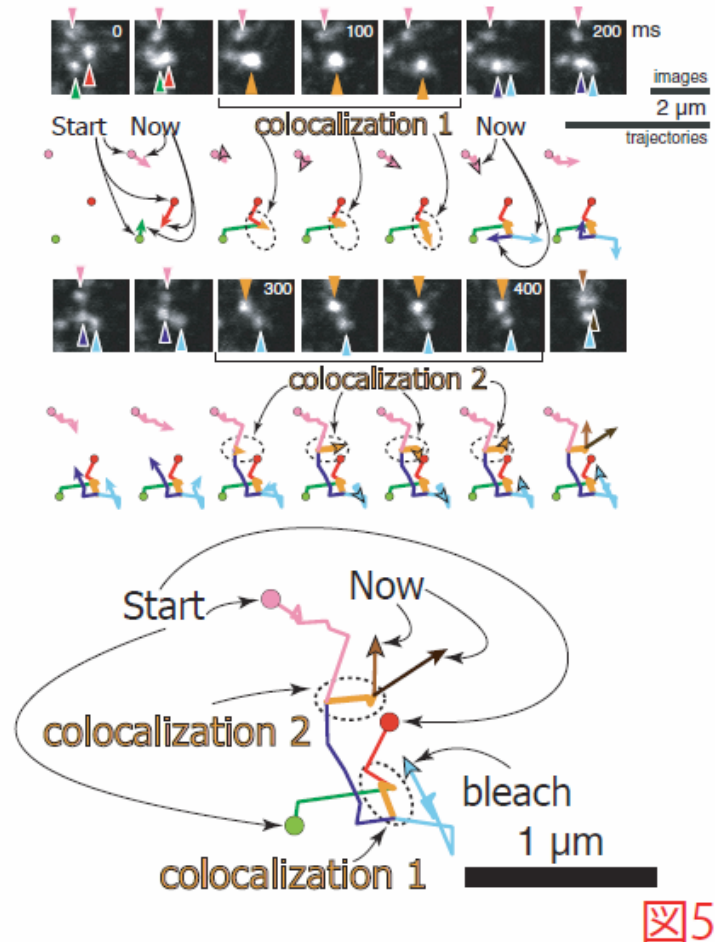


図5 ビデオでお見せしますが、ここでは、静止画と軌跡とで、FPRがソロとデュオを繰り返す様子を示す。



- 結論

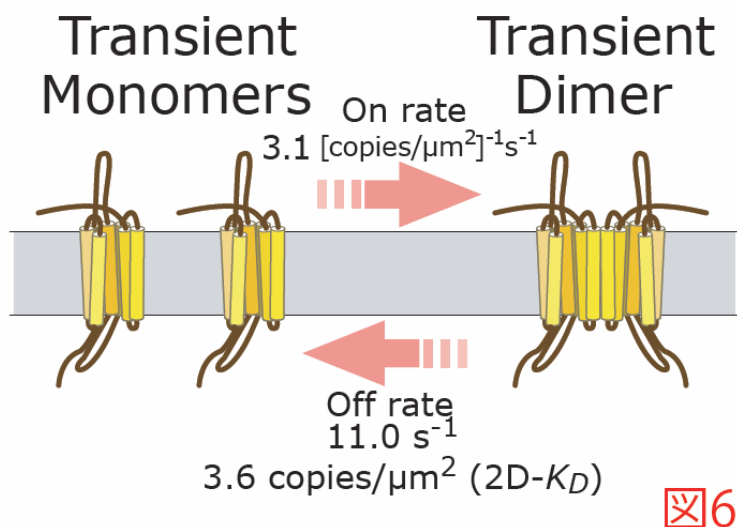


図6 FPRの単量体と2量体の間の平衡を完全に決定した。

- まとめ

- (1) 1分子イメージング法を用いて、細胞膜での「分子の数え方」と「超高速化（4ミリ秒分解能）」（スーパー定量法：論文中では、super-quantitation）を同時開発
- (2) スーパー定量法を用いて「細胞膜の中での分子結合の定量測定に世界で初めて成功」  
すなわち、2分子の受容体（GPCR: FPRがパラダイム）の結合・解離を直接観察：定量計測に世界で初めて成功  
FPR 2量体の2次元の解離定数（ $2D-K_D$ ）として、 $3.6$  個/ $\mu\text{m}^2$ を得た。さらに、2量体の解離速度定数（ $k_d$ ）= $11.0\text{ s}^{-1}$ （2量体寿命=91ミリ秒）、2量体の単量体からの生成速度（ $k_a$ ）= $3.1$  [個/ $\mu\text{m}^2$ ] $^{-1}\text{ s}^{-1}$ を得た。  
生理的条件下では、細胞膜には6000個のFPR分子があり、2000分子は単量体、4000分子は2量体（2量体の数は2000個）。2量体の寿命は0.1秒で、単量体の寿命は0.15秒程度。単量体と2量体（結合相手は異なる）を1秒間で4回繰り返す。（ここまでわかるから、“スーパー定量法”）
- (3) 細胞膜シグナル伝達の、システム生物学、および、物理・化学・工学・生物学・医薬学などの分野横断的な薬剤開発研究に道を拓く
- (4) 細胞膜のような2次元空間では、分子の会合が極めて起こりやすい。細胞膜は液体であり、熱揺らぎが大きく働くので、2量体はすぐに単量体に変わる。

### 3. 今後の展開

本研究で開発された方法により、他の膜分子の結合・解離も調べられるようになりました。この方法で、様々な受容体分子のソロとペアについて調べると同時に、受容体以外のシグナル分子について

も（異種分子でも同じように研究できる）、細胞膜上での振る舞いを明らかにしたいと考えています。さらに、この方法の普及にも力を入れ、多くの研究室で、このような測定が出来るようになるよう働きかける予定です。

このような定量解析が進むことによってはじめて、受容体とシグナルネットワークのシステム生物学・医薬学の大きな進展が可能となり、さらに、細胞膜でのシグナル伝達という重要な現象が、物理・化学・工学・生物学・医学薬学などの分野横断的な研究対象となり得ます。また、新しい薬剤デザインとして、GPCR を 2 量体だけに、あるいは、単量体だけにするという道が示されました。

そのほか、シグナル伝達の仕組みの本質に関わる、以下の可能性を、探求する予定です。

- (1) FPR 分子がペアを作ることで、それぞれの分子の構造が特定の構造に収斂されている可能性がある。FPR のソロ分子が、別の FPR 分子とペアを組み替えていくことで、全ての FPR 分子を、特定の構造に落とし込んでいる可能性がある。
- (2) 異種の GPCR 分子が会合し、A という GPCR に細胞外からの伝令分子が結合したとき、B という異種の GPCR が活性化する例が知られている。これも、本研究で見いだされたように、GPCR 同士が次々とペアを変えていくことによって、シグナルが増幅されている可能性がある。

## 用語解説

### 1) 生細胞中での一分子追跡

生細胞中の目的分子に、蛍光分子や直径 40nm 程度の金微粒子の目印を結合させ、それらを、様々な光学顕微鏡を用いて 1 分子毎に追跡する。In vitro での（ガラス上に取り出した生体高分子などを用いておこなう）実験に比べて、以下の点が難しい。（1）細胞には蛍光を発する分子が多数存在し、また、微粒子と紛らわしい顆粒が多数存在する。蛍光を減らす工夫が必要、（2）細胞に対する光毒性への注意が必要、（3）蛍光の褪色を防ぐための分子状酸素の除去は、普通はやらない方がよい、（4）細胞を活かしておくための道具立てが必要で面倒、など。細胞をよい状態に保ちながら、刺激などをおこなって面白い瞬間を捉えるためには、観察の自動化、画像解析の自動化、ノイズの中からシグナルを拾って 1 分子を追跡するためのソフトウェアの開発など、も重要である。我々はこの技術開発を 1989 年以来やってきており、時間分解能は、金微粒子による 1 分子追跡では 4 マイクロ秒、蛍光 1 分子追跡では 100 マイクロ秒と、他をはるかに引き離している。

## 論文名と著者

### Full characterization of GPCR monomer–dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging

1 分子イメージングによる GPCR の単量体・2 量体動的平衡の完全解明（参考訳）

Rinshi S. Kasai, Kenichi G. N. Suzuki, Eric R. Prossnitz, Ikuko Koyama-Honda, Chieko Nakada, Takahiro K. Fujiwara, and Akihiro Kusumi

*Journal of Cell Biology* | DOI: 10.1083/jcb.201009128

---

## 謝辞

---

本研究は、文部科学省科学研究費補助金のサポートの他、科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 国際共同研究プロジェクト「膜機構プロジェクト」（平成17年3月－22年3月）、さきがけ研究「生命システムの動作原理と基盤技術」領域（領域総括：中西重忠）（鈴木健一さきがけ研究員、iCeMS 特任講師、平成20年10月－24年3月）の支援を受けておこなわれました。

---

## おわりに

---

また、楠見明弘（京都大学 物質－細胞統合システム拠点 [iCeMS]・再生医科学研究所 教授、JST 国際共同研究プロジェクト（ICORP）－膜機構プロジェクト・総括責任者 [昨年3月にプロジェクト期間は終了]）、笠井倫志（京都大学 iCeMS 研究員）、米国ニューメキシコ大学の Eric Prossnitz（エリック・プロスニッツ）教授らの共同研究として行われた本研究の実験のほとんどは、笠井倫志がおこないました。本研究は、彼の大学院の後半の3年間と研究員としての6年間の合計9年間を要した労作で、本研究で笠井倫志は博士の学位を取得予定です。

---

## 問い合わせ先

---

楠見 明弘（クスマ アキヒロ）

京都大学 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS）教授／  
iCeMS メゾバイオ1分子イメージングセンター長

京都大学 再生医科学研究所 教授／  
再生医科学研究所 附属ナノ再生医工学研究センター長

TEL：075-751-4112 | FAX：075-751-4113 | akusumi@frontier.kyoto-u.ac.jp

笠井 倫志（カサイ リンシ）

京都大学 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS）研究員

TEL：075-751-4845 | FAX：075-751-4113 | rkasai@frontier.kyoto-u.ac.jp

飯島 由多加（イイジマ ユタカ）

京都大学 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS）事務部 国際広報セクションリーダー

TEL：075-753-9755 | FAX：075-753-9759 | yutaka-ijima@icems.kyoto-u.ac.jp