

氏 名 谷猪 遼介

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2374 号

学位授与の日付 2022 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 ライブセルイメージングによる GPCR シグナルダイナミクスの定  
量解析

論文審査委員 主 査 東島 眞一

基礎生物学専攻 教授

青木 一洋

基礎生物学専攻 教授

上田 貴志

基礎生物学専攻 教授

増保 生郎

Professor, Sanford Research Pediatrics and Rare  
Diseases Group

(様式3)

## 博士論文の要旨

氏名 Tany, Ryosuke

論文題目 ライブセルイメージングによる GPCR シグナルダイナミクスの定量解析

Quantitative live-cell imaging of GPCR downstream signaling dynamics

G-protein-coupled receptors (GPCRs), seven-transmembrane proteins, are one of the largest families of transmembrane receptors in metazoa. More than 800 GPCRs are encoded in the human genome. Upon ligand binding, GPCRs activate specific G $\alpha$  proteins, which in turn regulate various downstream intracellular signaling. The G $\alpha$  proteins are classified into four subtypes, G $\alpha_s$ , G $\alpha_{i/o}$ , G $\alpha_{q/11}$ , and G $\alpha_{12/13}$ , and they induce subtype specific downstream signals, such as second messenger regulation (intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentration and calcium ion (Ca<sup>2+</sup>) concentration) and activation of signaling molecules (G protein RhoA and ERK kinase activation). In general, many types of GPCRs are co-expressed on a single cell, and, therefore, the different GPCR signals in a single cell should once be integrated into a limited number of G $\alpha$  proteins and their specific downstream signals. These integrated signals need to maintain the information from different GPCR to produce different phenotypes corresponding to the activated GPCR. However, it remains elusive how the limited number of G $\alpha$  subtypes and their downstream signals encode sufficient information from different GPCRs. In other words, how do cells recognize which GPCRs are activated by the limited number of G $\alpha$  proteins? To overcome this issue, I hypothesized that the information of GPCR activation is encoded by temporal dynamics of downstream signalings. In this study, I developed the imaging system to monitor the dynamics of GPCR downstream signals and examined whether the

activation of different GPCR subtypes exhibit distinct signal dynamics to each other as an initial step to verify my hypothesis.

First, I looked for fluorescence biosensors to quantify the dynamics of GPCR downstream signals. I evaluated four biosensors for an intracellular cAMP level, Ca<sup>2+</sup> level, RhoA activity, and ERK activity as a proxy for G $\alpha$  protein activity. I confirmed that these biosensors sufficed to monitor these signaling molecules at the single cell level. Next, to simultaneously quantify and compare the dynamics of four downstream signals, I established two stable cell lines; one expressed cAMP sensor and Ca<sup>2+</sup> sensor, while the other expressed RhoA sensor and ERK sensor. By co-culturing these two cell lines, four signaling dynamics were simultaneously observed in a single experiment.

By using this experimental system, I quantified the dynamics of downstream signals in living cells expressing each of five dopamine receptors. The increase in intracellular cAMP level was observed in cells expressing DRD1 or DRD5, but not DRD2, DRD3, and DRD4. In addition, only cells expressing DRD2 showed ERK activation. Furthermore, I quantified the downstream signals in cells expressing each of twelve serotonin receptors. Among G $\alpha_{i/o}$ -coupled serotonin receptors, only cells expressing HTR1B showed Ca<sup>2+</sup> response. The extent of Ca<sup>2+</sup> response in cells expressing G $\alpha_{q/11}$ -coupled serotonin receptors varied among the subtypes. Interestingly, cAMP level and ERK activity showed the different dynamics among G $\alpha_s$ -coupled serotonin receptors. To compare signaling dynamics evoked by five dopamine receptors and twelve serotonin receptors, I performed unbiased clustering analysis, which classified the patterns of dynamics. The patterns of dynamics were at least classified into two or three clusters, suggesting that the dynamics of downstream signaling have more information than simple ON and OFF states. Surprisingly, although cAMP signaling was strongly correlated with G $\alpha_s$  coupling GPCRs, the other

signaling dynamics were not necessarily correlated with  $G\alpha$  protein coupling to GPCRs.

Next, I developed a measurement system for  $G\alpha_{i/o}$ -coupled GPCR activity, because cAMP decrease by  $G\alpha_{i/o}$ -coupled GPCR activation could not be detected in the above system due to the low basal cAMP level. The pretreatment of isoproterenol (ISO), a selective agonist of  $G\alpha_s$ -coupled adrenergic receptors, increased basal cAMP levels, followed by the activation of  $G\alpha_{i/o}$ -coupled GPCRs to measure the decrease in cAMP levels. Interestingly, the dynamics of decrease in cAMP level showed the heterogeneity among  $G\alpha_{i/o}$ -coupled receptor subtypes. Finally, I analyzed the correlation between two downstream signals (cAMP and  $Ca^{2+}$ , cAMP and ERK, and RhoA and ERK) in a single cell. These data clarified the cellular heterogeneity of GPCR downstream signaling, showing diverse signaling dynamics.

In conclusion, I found that the temporal dynamics of GPCR downstream signals differ among GPCR subtypes even though they couple to the same  $G\alpha$  protein or receive the same ligand. These results indicate the possibility of “dynamical encoding of GPCR signaling”, that is, information about which GPCRs are activated is encoded in the temporal dynamics of downstream intracellular signaling and the combinations.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏 名 谷猪 遼介

Title  
論文題目 ライブセルイメージングによる GPCR シグナルダイナミクスの定量解析

G タンパク質結合受容体 G-protein coupled receptor (GPCR) は神経伝達物質やホルモン、脂質、あるいは光子など多種多様な細胞外シグナルを受け取り、その情報を細胞内へと伝達する。市販薬の数割が GPCR のうちのいずれかを標的にしていることから、GPCR の機能を理解することは臨床的にも重要である。ヒトゲノムには 800 種類以上の GPCR 遺伝子がコードされており、1つの細胞におよそ 100 種類の GPCR タンパク質が発現していることが示されている。GPCR は主に 4 種類の  $G\alpha$  タンパク質 ( $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_{i/o}$ 、 $G\alpha_{q/11}$ 、 $G\alpha_{12/13}$ ) のいずれかを介して細胞内にシグナルを伝達することが分かっているが、細胞がどのようにして 100 種類近くの GPCR の情報を 4 種類の  $G\alpha$  の細胞内シグナル伝達分子で識別しているのかということについては不明であった。谷猪さんは、 $G\alpha$  タンパク質の下流のセカンドメッセンジャーやシグナル伝達分子の時間的な変化 (ダイナミクス) に GPCR の情報が符号化されるという「動的符号化 (dynamic encoding)」仮説を立て、それを検証すべく研究を行った。

谷猪さんは、 $G\alpha$  タンパク質の下流で変動することが分かっている cAMP、 $Ca^{2+}$ 、RhoA、ERK に着目し、これらに対する蛍光バイオセンサーを選別した。さらに、これらの 4 種類のバイオセンサーを 2 種類ずつ安定的に発現する HeLa 細胞株を樹立し、2 種類の細胞の共培養を行うことで、1 回の実験で 4 種類のシグナル伝達系を効率よく可視化することができる実験系を構築した。この実験系を用いて、5 種類のドーパミン受容体 (DRD1、DRD2、DRD3、DRD4、DRD5)、および 12 種類のセロトニン受容体 (HTR1A、1B、1D、1E、1F、5、HTR2A、HTR2B、HTR2C、HTR4、HTR6、HTR7) によって引き起こされるシグナル伝達のダイナミクスを 1 細胞レベルで定量化した。その結果、同じ  $G\alpha$  タンパク質と共役することが分かっている GPCR であっても、それらが引き起こす下流のシグナル伝達ダイナミクスは多様なパターンを示すことが明らかとなった。これらの時系列データを基に、クラスタリングと統計解析を行ったところ、下流のシグナル伝達のダイナミクスは 2 種類以上のパターンを持つことが明らかになった。これは、単純な ON と OFF といった 2 種類の情報量よりも大きな情報量を GPCR の下流シグナル伝達の時系列データが持ちうることを示している。

以上の谷猪さんの研究により、同じ種類の  $G\alpha$  タンパク質を活性化する GPCR であっても、GPCR によって惹起されるシグナル伝達分子のダイナミクスには多様性が見られることが明らかになり、動的符号化仮説を支持する結果を得ることができた。これらの結果は、細胞内シグナル伝達研究に新しい方向性を示したものと評価することができる。よって、本論文は同分野における重要な貢献であり、学位授与にふさわしいものであると審査委員全員が一致して結論した。