

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

総合研究大学院大学

生命科学研究科 基礎生物学専攻

基礎生物学研究所 定量生物学研究部門

谷猪 遼介

要旨	4
序論	7
受容体による細胞外情報の認識	7
GPCR下流シグナル伝達	10
多様なGPCRサブタイプ	13
ドーパミン受容体の機能	14
セロトニン受容体の機能	15
細胞が認識するGPCRシグナルの情報量	17
GPCRシグナルのダイナミクス	18
材料と方法	21
プラスミド	21
細胞培養	25
バイオセンサー安定発現細胞株の樹立	26
GPCR遺伝子の導入	29
蛍光タイムラプスイメージング	30
免疫染色	33
画像解析	34
定量データの解析	36
結果	37
GPCR下流シグナルを定量化するための蛍光イメージングバイオセンサーの検討	37
細胞内cAMP濃度の可視化	37
細胞内Ca <sup>2+</sup> 濃度の可視化	41
低分子量Gタンパク質RhoA活性の可視化	43
ERK MAPキナーゼ活性の可視化	45
GPCRシグナルを同時に定量する実験系の構築	48
DA受容体のシグナルダイナミクス	50
DA受容体サブタイプごとのシグナルダイナミクス	50
DA受容体のヘテロダイマー	56
5-HT受容体のシグナルダイナミクス	59
Gaq/11共役型の5-HT受容体	60
Gai/o共役型の5-HT受容体	64
Gas共役型の5-HT受容体	69
シグナルダイナミクスのクラスタリング解析	75
cAMP応答のシグナルダイナミクスの分類	75
Ca <sup>2+</sup> 応答のシグナルダイナミクスの分類	79
RhoA活性のシグナルダイナミクスの分類	83
ERK活性のシグナルダイナミクスの分類	87
Gai/o共役型GPCR活性の測定系の開発	91
Gai/o共役型DA受容体のGai/o活性の測定	91

Gai/o共役型5-HT受容体のGai/o活性の測定	94
2種類の下流シグナル同士の相関の解析	97
<b>考察</b>	<b>100</b>
GPCRシグナルのダイナミクスが持つ情報量	100
GPCRサブタイプ間の比較	102
Gai/o共役型GPCRの活性ダイナミクスの比較	104
クロストークの考察	105
今後の展望	106
<b>謝辞</b>	<b>108</b>
<b>参考文献</b>	<b>109</b>

## 要旨

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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{G}\alpha_{i/o}$ -coupled serotonin receptors, only cells expressing HTR1B showed  $\text{Ca}^{2+}$  response. The extent of  $\text{Ca}^{2+}$  response in cells expressing  $\text{G}\alpha_{q/11}$ -coupled serotonin receptors varied among the subtypes. Interestingly, cAMP level and ERK activity showed the different dynamics among  $\text{G}\alpha_s$ -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  $\text{G}\alpha_s$  coupling GPCRs, the other signaling dynamics were not necessarily correlated with  $\text{G}\alpha$  protein coupling to GPCRs.

Next, I developed a measurement system for  $\text{G}\alpha_{i/o}$ -coupled GPCR activity, because cAMP decrease by  $\text{G}\alpha_{i/o}$ -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  $\text{G}\alpha_s$ -coupled adrenergic receptors, increased basal cAMP levels, followed by the activation of  $\text{G}\alpha_{i/o}$ -coupled GPCRs to measure the decrease in cAMP levels. Interestingly, the dynamics of decrease in cAMP level showed the heterogeneity among  $\text{G}\alpha_{i/o}$ -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.

# 1. 序論

## 1.1. 受容体による細胞外情報の認識

細胞や組織、生物個体は様々な外界からの変化に対して適応的にふるまうことで恒常性を維持し、生命活動を持続する。このような適応的な振る舞いを行う上で、細胞外からの刺激を感知し、その情報を受容することはその第一ステップとして重要であり、多くの場合、細胞は化学物質などの細胞外情報を認識する受容体を利用している。これら受容体の種類は極めて多様であり、例えば哺乳動物の摂食の行動を例に挙げても様々な受容体が関与している。まず、糖などのエネルギー源が減少すると脳内の視床下部からニューロペプチドY (neuropeptide Y、NPY)などの神経ペプチドが放出される(Pedragosa-Badia et al., 2013)。神経細胞では、分泌されたNPYをNPY受容体が受け取り、動物の食欲を亢進させる(Gropp et al., 2005)。次に、動物は嗅覚受容体によって匂い物質を受け取る(Buck and Axel, 1991)。これによって食物を見つけ、それを食べる時には舌の味蕾細胞に発現する味覚受容体が味物質を受け取り、「甘い」や「苦い」という味覚で食物なのか毒物なのかを判断する(Chandrashekar et al., 2006)。さらにこの味物質や摂取された食物の物理的な刺激が、胃や腸での消化液の分泌を促すシグナルとなる。そして脂肪酸などの食物の分解産物が続くシグナルとなり、グレリン受容体などを活性化させて最終的には動物に満腹感を与える(Suzuki et al., 2010)。このように、動物の行動には、受容体を介したイベントを連鎖的に起こすことで制御されるものがある。受容体の多くは、細胞膜上に局在する膜タンパク質であり、外部から来る様々な因子を情報として受け取る。外部情報となる因子は多様であり、光や温度、圧力などの物理的な因子と、小分子化合物やイオン、ペプチドといった化学的な因子とに分かれている(Alexander et al., 2011)。特に生体内で合成される化学的因子はリガンド(ligand)と呼ばれ、受容体と結合して複合体を形成することで受容体の構造変化を誘導する。

膜タンパク質の受容体には、イオンチャネル型受容体(ion channel-linked receptor)と酵素共役型受容体(enzyme-linked receptor)、Gタンパク質共役型受容体(G-protein-coupled

receptor、GPCR)に分類される(図1)。イオンチャネル型受容体はリガンド結合の刺激により、チャネルを解放し、特定のイオンを選択的に透過させる膜タンパク質である。酵素共役型受容体の代表例として、受容体チロシンキナーゼ(receptor tyrosine kinase, RTK)が知られる(Jain et al., 2018)。RTKは、細胞外のリガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、そして細胞質内のチロシンキナーゼドメインで構成され、上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor, EGFR)などがある。リガンドである上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)の結合によりキナーゼ活性が上昇したEGFRは、自己リン酸化によって自らのチロシン残基をリン酸化する。チロシンリン酸化されたEGFRは、足場タンパク質Grb2を形質膜直下にリクルートし、さらに、Grb2にRasGEFのSOSが結合する。結果としてSOSは、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(mitogen-activated protein kinase, MAPK)経路を活性化し、細胞成長などを制御する(Marshall, 1995)。

一方でGPCRは、リガンド結合を行う細胞外ドメインと、細胞質側のGタンパク質結合ドメインからなる7回膜貫通型の受容体である。GPCRが細胞外からのリガンドを受け取ると、細胞内のグアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)を活性化させる。Gタンパク質は、グアノシン三リン酸(guanosine triphosphate, GTP)またはグアノシン二リン酸(guanosine diphosphate, GDP)との結合状態によって活性のON/OFFを調節している。活性化状態のGPCRは、共役するGタンパク質に作用し、GDPをGTPへと交換する。これにより活性化されたGタンパク質は、さらに下流の様々な細胞内分子に作用することでシグナル伝達を行い、遺伝子発現などを調節し、GPCRの機能を発揮する。GPCRの種類は多岐にわたり、ヒトゲノムにおいては800種類を超えるGPCR遺伝子がコードされており、最大の受容体タンパク質ファミリーである(Bjarnadóttir et al., 2006; Fredriksson et al., 2003; UniProt Consortium, 2021)。さらに、現在の医療現場で利用されている医薬品のおよそ3分の1程度がGPCRを標的にしていると言われており、GPCR機能の解明は創薬や医療技術の発展に重要であると考えられる(Santos et al., 2017)。



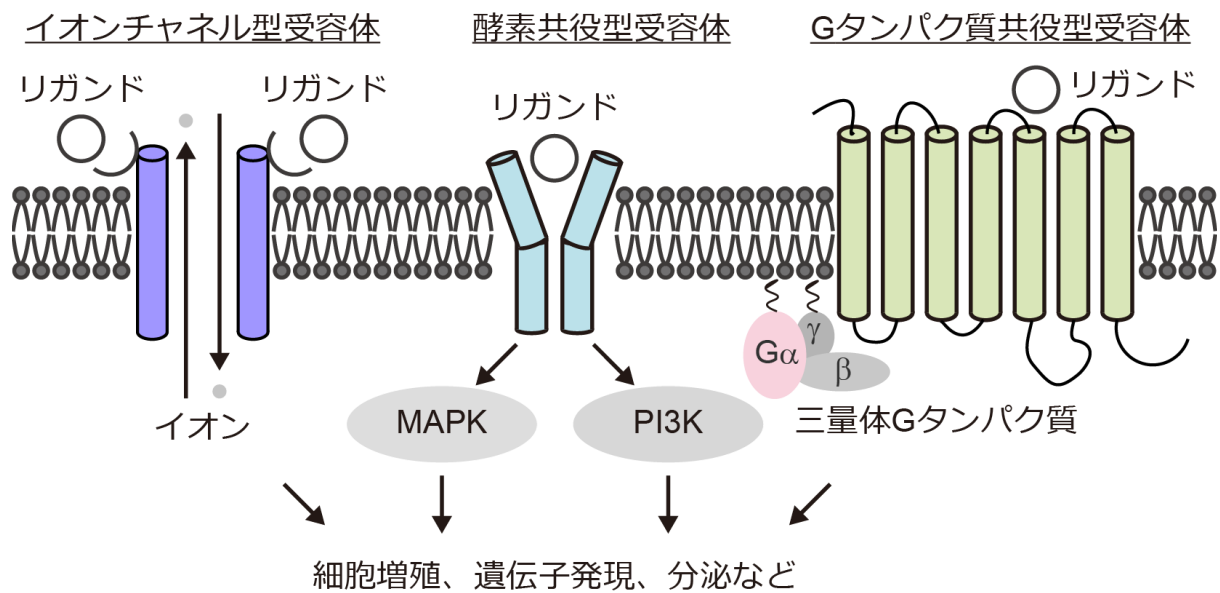


図1. 受容体の種類とシグナル伝達

イオンチャネル型受容体は、リガンド結合によってチャネルが開くことでイオンの取り込みや放出が起こる。酵素共役型受容体は、リガンドの結合によってチロシンキナーゼやセリンスレオニンキナーゼ、チロシンホスファターゼなどの酵素活性を誘導して、細胞内の標的タンパク質をリン酸化することでシグナル伝達を行う。Gタンパク質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor、GPCR) は、リガンドを受け取ることで構造変化を起こし、特定の三量体Gタンパク質が結合、活性化されることでシグナル伝達を引き起こされる。

## 1.2. GPCR下流シグナル伝達

GPCRが共役するGタンパク質は、3種類のサブユニット(G $\alpha$ 、G $\beta$ 、G $\gamma$ )からなり、「三量体Gタンパク質」と呼ばれる。リガンド結合により活性化したGPCRはグアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor、GEF)として機能し、三量体Gタンパク質のG $\alpha$ サブユニットを不活性状態のGDP結合型から活性状態のGTP結合型に変換する。これにより活性化されたG $\alpha$ サブユニットは、G $\beta\gamma$ 複合体と分離することで三量体の状態を解き、さらに下流へとシグナルを伝達する。G $\alpha$ タンパク質は、細胞内応答の異なる4種類のサブファミリー(G $\alpha_s$ 、G $\alpha_{i/o}$ 、G $\alpha_{q/11}$ 、G $\alpha_{12/13}$ )に大別され、それぞれが特異的な下流シグナルを持つ(図2)(Downes and Gautam, 1999; Gilman, 1987; Sah et al., 2003)。

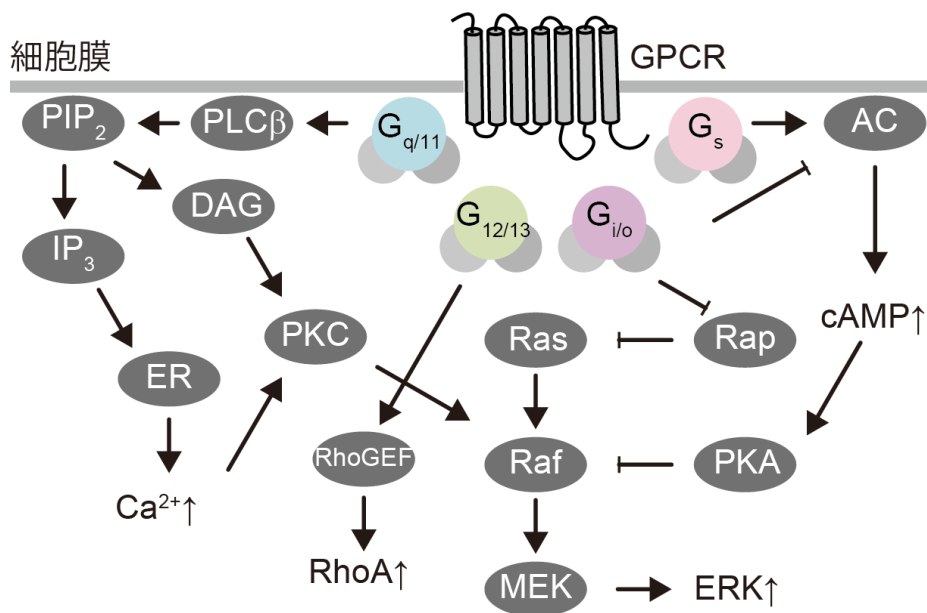


図2. G $\alpha$ タンパク質のサブファミリー

4種類のG $\alpha$ タンパク質サブファミリー(G $\alpha_s$ 、G $\alpha_{i/o}$ 、G $\alpha_{q/11}$ 、G $\alpha_{12/13}$ )を示す。また、本研究で扱った4種類の下流シグナル(cAMP、Ca<sup>2+</sup>、RhoA、ERK)との関係を示す。G $\alpha_s$ は細胞内cAMP濃度を上昇させる。G $\alpha_{i/o}$ は細胞内cAMP濃度を減少させ、またERK活性を上昇させる。G $\alpha_{q/11}$ は、細胞内

Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ、またERKを活性化する。Gα<sub>12/13</sub>は、RhoAを活性化する。他にも、cAMPはPKAを、Ca<sup>2+</sup>はPKCを活性化するなど、さらに下流へとシグナルが伝達する。

Gα<sub>s</sub>タンパク質は、細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase, AC) を活性化し、細胞内のサイクリックAMP (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 濃度を増加する。Gα<sub>s</sub>タンパク質と同じ下流シグナルを持つ別のメンバーには、嗅覚受容体のシグナル伝達を仲介するGα<sub>olf</sub>タンパク質が知られている。一方、Gα<sub>i/o</sub>タンパク質はACを抑制し、細胞内cAMP濃度を減少する働きを持つ。哺乳類には9つのACアイソフォーム (ADCY1~ADCY9) が知られており、Gα<sub>s</sub>タンパク質は全てのACアイソフォームを活性化するが、Gα<sub>i/o</sub>タンパク質はこのうちADCY1、ADCY3、ADCY5、ADCY6、ADCY8を抑制する(Wei Yuan, 2007)。細胞内で産生されたcAMPは、プロテインキナーゼA (protein kinase A, PKA) などのcAMP結合ドメインを持つタンパク質を活性化することで様々な機能を示す。例えば膵島β細胞では、グルカゴン様ペプチド1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) をリガンドとするGLP-1受容体が活性化することで、cAMP応答が生じてPKAを活性化し、インスリンの合成と分泌が行われる(Dyachok et al., 2006)。また、PKAはMAPK経路においてRaf活性を阻害することが報告されている(Häfner et al., 1994)。Gα<sub>q/11</sub>タンパク質は細胞質内のホスホリパーゼCβ (phospholipase Cβ, PLCβ) を活性化し、ホスファチジルイノシトールニリン酸 (phosphatidylinositol bisphosphate, PIP<sub>2</sub>) をジアシルグリセロール (diacylglycerol, DAG) とイノシトール三リン酸 (inositol triphosphate, IP<sub>3</sub>) に分解する (Preininger and Hamm, 2004)。このうち、IP<sub>3</sub>が小胞体表面に発現しているIP<sub>3</sub>受容体に結合する。IP<sub>3</sub>受容体はカルシウム (Ca<sup>2+</sup>) チャネルの役割を持ち、IP<sub>3</sub>結合により小胞体内のCa<sup>2+</sup>を細胞質内に放出する。さらにIP<sub>3</sub>受容体はCa<sup>2+</sup>によっても活性化するため、IP<sub>3</sub>受容体から放出されたCa<sup>2+</sup>は隣のIP<sub>3</sub>受容体を活性化して連鎖的なCa<sup>2+</sup>放出が起こる。細胞がCa<sup>2+</sup>濃度の上昇を感知すると、細胞外へのCa<sup>2+</sup>放出や小胞体へのCa<sup>2+</sup>再取り込みが生じ、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は基底の状態に戻る(Berridge et al., 2000)。また、Ca<sup>2+</sup>はプロテインキナーゼC (PKC) を活性化する。PKCは様々なタンパク質に作用し、その1つとしてRafの活性化があり(Carroll and May, 1994)、これにより細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, ERK) が活性

化する。Gα<sub>12/13</sub>は、Rhoグアニンヌクレオチド交換因子(RhoGEF)を活性化し、低分子量Gタンパク質のRhoAを活性化する。活性化されたRhoAは、さらに下流のRhoキナーゼ(ROCK)へのシグナルとなり、ストレスファイバーの形成や細胞接着に関与している(Ridley and Hall, 1992)。また、Gα<sub>i/o</sub>タンパク質下流に位置するRap1GAPがMAPKに作用し、ERKを活性化することが報告されている(Mochizuki et al., 1999)。

三量体Gタンパク質以外のGPCR下流シグナルのエフェクターとして、βアレスチン(β-arrestin)やRGS(regulator of G-protein signaling)がある。βアレスチンは、継続的なGPCRシグナルを休止する役割を持つ。まずGPCRによる下流シグナルによりGPCRキナーゼ(G-protein-coupled receptor kinase、GRK)が活性化する。活性化したGRKはGPCRの細胞内ループまたはC末端をリン酸化する(Gurevich and Gurevich, 2019)。βアレスチンはこのリン酸化部位を認識してGPCRに結合し、エンドサイトーシスを誘導する。結果として、GPCRが細胞内に取り込まれ、シグナル伝達が遮断される。βアレスチンは三量体Gタンパク質とは独立したシグナル伝達経路であり、三量体Gタンパク質またはβアレスチンのみを活性化させるリガンド(バイアスドリガンド)がいくつか見つかっている(Wang et al., 2018)。一方で、RGSは、GPCRによって活性化したGαタンパク質を不活性化させるGTPase活性化タンパク質(GTPase activating protein、GAP)として働く(Siderovski and Willard, 2005)。哺乳類では、20種類のRGSタンパク質が同定されており(Tesmer, 2009)、これらはそれぞれGαタンパク質の嗜好性を持っていることが示唆されている(Masuhō et al., 2020)。

全身の様々な組織や器官にGPCRは発現し、役割も多種多様であるが、三量体Gタンパク質を介して下流へシグナル伝達を行う点、さらにGPCRそのものを細胞質内に取り込み、またGαタンパク質を不活性化することでシグナルを停止するという点はGPCRの持つ性質として共通している。

### 1.3. 多様なGPCRサブタイプ

GPCRは同じリガンドを認識するGPCRサブタイプを持つ場合が多い。また、それぞれのGPCRは優先的に共役するGαタンパク質サブファミリーを持つ。これはprimary coupling(一次共役)と呼ばれ、一次共役ではないGαタンパク質サブファミリーとの共役はsecondary coupling(二次共役)と呼ばれる(Inoue et al., 2019; Isberg et al., 2016)。これまでの研究により、多くのGPCRがどのGαタンパク質サブファミリーを選択しているかが明らかになってきた。このことは、GPCRごとの性質を特定し、また共役するGαタンパク質サブファミリーでGPCRを分類することを可能にした。例えば、ドーパミン(dopamine、DA)受容体は5種類のサブタイプ(DRD1~DRD5)を持ち、DRD1およびDRD5がGα<sub>s</sub>共役型、DRD2、DRD3、DRD4がGα<sub>i/o</sub>共役型として分類されている(Missale et al., 1998)。GPCRサブタイプのはGPCRによって大きく異なり、カルシウム感受性受容体(Ca<sup>2+</sup> sensing receptor、CASR)のように、1種類だけのGPCR(Brown et al., 1993)もあれば、セロトニン(5-hydroxytryptamine、5-HT)受容体のようにサブタイプのが10種類を超えるGPCRもある(Hoyer et al., 1994; Kroeze et al., 2002)。さらに、GPCRサブタイプ同士では、それぞれ同じリガンドを認識し、かつ同じGαタンパク質と共役しながら、それぞれ異なる表現型を示す場合がある。例えば、DA受容体は統合失調症に関与することが報告されているが、その中でもDRD2の過剰な活性化が原因の1つであることが分かっており(Martel and Gatti McArthur, 2020; Seeman et al., 1976; Simpson and Kellendonk, 2017)、現在もDRD2のみを阻害する選択的アンタゴニスト(selective antagonist)やDRD2活性を下げるインバーサゴニスト(inverse agonist)として、クロザピン(clozapine)やスルピリド(sulpiride)が治療に利用されている(Hwang et al., 2007; Roberts and Strange, 2005)。また、5-HT受容体についてもHTR4遺伝子の一塩基多型(single nucleotide polymorphisms、SNPs)が統合失調症に関わっていることが報告されている(Suzuki et al., 2003)。しかしながら、なぜ同一のGαタンパク質サブファミリーと共役するGPCRサブタイプ間で異なる表現型を生み出すことができるのかについては詳細に知られていない。本研究では、同一のGαタンパク質サブファミリーと共役し、異なる機能を生み出すGPCRサブタイプの例として、このDA受容体と5-HT受容体を扱った。

### 1.3.1. ドーパミン受容体の機能

今から60年以上前にDAは見付き(Carlsson et al., 1957)、以降DAは神経伝達物質として注目され、精神疾患などの研究対象とされてきた(Missale et al., 1998)。DAを分泌する細胞は、脳内の主に黒質線条体、中脳辺縁系、中間皮質、隆起漏斗で見られる(Anden et al., 1964)。DA受容体もまた脳内に発現しており、DRD1~DRD5までの5種類のGPCRサブタイプに分かれる。DA受容体サブタイプのうち、DRD1およびDRD5がG $\alpha_s$ タンパク質と共役し、細胞内cAMP濃度を上昇させるD $_1$ 様受容体と呼ばれる。一方で、DRD2、DRD3、DRD4はG $\alpha_{i/o}$ タンパク質と共役し、細胞内cAMP濃度を減少させるD $_2$ 様受容体と呼ばれる。DA受容体の機能は多岐にわたり、記憶や情動、学習といった認知機能、快、不快を決定する報酬系、または運動機能などの役割が知られている。さらに、DA受容体機能の不良は、パーキンソン病や精神疾患などの病態生理と関連することが示唆されている(Carlsson, 2001; Iversen and Iversen, 2007; Missale et al., 1998; Sibley, 1999; Snyder et al., 1970; Wise, 2004)。

D $_1$ 様受容体(DRD1およびDRD5)では、DRD1欠損マウスは学習や記憶に影響を与える一方で、DRD5欠損マウスではほぼ表現型に変化がないことが報告されており、DRD1はDRD5とは異なる役割があると考えられている(Sariñana and Tonegawa, 2016; Sasamori et al., 2022)。しかし、DRD1とDRD5との間に細胞内シグナル伝達においてどのような違いがあるのかについては明らかにされていない。次に、D $_2$ 様受容体(DRD2、DRD3、DRD4)では、DRD2を欠損させたマウスは成長ホルモン分泌量の減少や下垂体の腫瘍化を起こすことが報告されている(Kelly et al., 1997)。一方でDRD3欠損のマウスでは、DRD2欠損のマウスのような成長の遅延等は見られないが、高血圧の表現型を示す(Asico et al., 1998)。さらにDRD4欠損マウスでは、野生株と比較してエタノール(アルコール)やコカインへのより強い渴望を示したことから、薬物依存症に関与していることが示唆されている(Rubinstein et al., 1997)。また、D $_2$ 様受容体が統合失調症の原因とする「ドーパミン仮説」が提唱されている。統合失調症の治療薬として、DRD2のアンタゴニストが利用されており、実際に統合失調症患者の脳ではDRD2やDRD4の発現量が健常者と比較

して増加しているとされる(Martel and Gatti McArthur, 2020)。しかし、同じリガンドを認識し、かつ同じGαタンパク質と結合するD<sub>2</sub>様受容体サブタイプの表現型が、なぜ異なっているのかについては明らかにされておらず、細胞内シグナル伝達においてもこれらのGPCRサブタイプ間にもどのような違いがあるのかについては分かっていない。

### 1.3.2. セロトニン受容体の機能

5-HTはトリプトファンから合成される生理活性アミンであり、DA同様に神経伝達物質として機能する。5-HTを認識するセロトニン受容体(5-HT受容体)はGPCR型とイオンチャネル型に分かれる。GPCR型の5-HT受容体は、5-HT1受容体で5種類(HTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1E、HTR1F)、5-HT2受容体で3種類(HTR2A、HTR2B、HTR2C)のサブタイプを持ち、加えてHTR4、HTR5、HTR6、HTR7が同定されている。脳内にはこれら全てのGPCRが発現し、体温調節や摂食行動、痛覚などの様々な中枢機能に関わるとされる(Berger et al., 2009; Pytliak et al., 2011)。また、サブタイプの1つのHTR1Bは、DAなどの他の神経伝達物質の分泌を調節する機能もあることが報告されており、リガンドの異なるGPCR同士でもシグナル伝達の調節を行うことが示唆されている(Jin et al., 1992)。

さらに、5-HT受容体は、精神疾患との関連が示唆されている(Millan et al., 2008; Pytliak et al., 2011; Yohn et al., 2017)。興味深いのは、同じGαタンパク質サブファミリーと共役するGPCRサブタイプ間であっても、異なる表現型(症状)が現れることである。例えば、中枢神経系において広範に分布しているHTR1受容体は、攻撃性、不安、食欲、記憶、気分、性衝動などの多種多様な役割を持つが、どの役割に関与するのかはHTR1受容体間のサブタイプによって異なることが示唆されている(Pytliak et al., 2011)。HTR1受容体は全てGα<sub>i/o</sub>タンパク質と共役する点で共通しているが、どのようにそれぞれが異なる機能を生み出しているのかは分かっていない。他にも、HTR2B受容体欠損マウスでは、拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy, DCM)のような症状が出る(Nebigil et al., 2001)。一方で、HTR2C受容体欠損のマウスは、過食と肥満を引き起こすことが報告されている(Tecott et al., 1995)。他にも、Gα<sub>s</sub>共役型であるHTR4およびHTR7では、

HTR4が記憶や学習に関与することが示唆されている。また、HTR7は夢遊病との関連が報告されている(King et al., 2008; Monti, 2011)。これらは明らかに異なる表現型であるが、なぜ類似したGPCR同士で異なる表現型を示すのかについては詳細に知られていない。このように、前節のDA受容体と同様に、5-HT受容体はGPCRサブタイプごとに特有の機能を持つことが示唆されているが、同じGαタンパク質と共役するGPCRサブタイプ同士の場合、見かけのシグナル伝達経路の違いは見られない。



## 1.4. 細胞が認識するGPCRシグナルの情報量

全身の様々な器官や組織には、複数のGPCRが発現している。例えば、脂肪組織や眼球では160種類程度(Amisten et al., 2015; Chen et al., 2013)、視床下部や膵島では300種類近くのGPCRが発現しているとされている(Amisten et al., 2013; Rønnekleiv et al., 2014)。さらに、嗅覚受容体を例外として(Buck and Axel, 1991)、これらGPCRは細胞ごとに1種類だけ発現しているわけではない。一例として、ヒト胎児腎細胞(HEK293細胞)やヒト下垂体細胞(AtT20細胞)には、70種類を超える内在性GPCRが同時に発現していることがマイクロアレイ解析により示されている(Atwood et al., 2011)。

GPCRはそれぞれが異なる役割を持つことから、細胞はこれらのGPCRシグナルを明確に区別していることが考えられる。このように、多数の入力を少数の中間因子に集約し、また多数の出力(表現型)を生み出すネットワークの構造は「蝶ネクタイネットワーク(Bow-Tie)構造」と呼ばれる(Polouliakh et al., 2009)。GPCRシグナル伝達ネットワークは典型的なBow-Tie構造である。多くの種類を持つGPCRの入力シグナルが中間因子にあたるわずかな種類の三量体Gタンパク質へと集まり、そこから適切な表現型に変換されることになる。しかし、細胞に発現する数十種類のGPCRからのシグナルを集約し、GPCR数だけの表現型を生み出すためにG $\alpha$ タンパク質を利用する場合、G $\alpha$ タンパク質の活性のON/OFFのみで判別すると $2^4 = 16$ 通りとなり、数十種類のGPCRシグナルに対応することは困難であると考えられる。このことから、細胞がGPCRシグナルを認識する上で、下流シグナルのON/OFF以外の情報を利用しているのではないかという仮説を立てた。

## 1.5. GPCRシグナルのダイナミクス

細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質の中には、同じシグナル伝達分子の活性の時間的な変化(ダイナミクス)を利用して、複数の異なる入力情報を細胞に受け渡しをするということがいくつ報告されている(Purvis and Lahav, 2013)。この性質はダイナミックエンコーディング(dynamic encoding)と呼ばれ、入力の違いを活性のダイナミクスの違いとして情報を符号化(encoding)し、異なる表現型を復号化(decoding)して出力する仕組みである。ダイナミックエンコーディングの代表例として、DNA損傷を感知して活性化する腫瘍抑制因子p53がある(Batchelor et al., 2011)。p53の活性化は、ガンマ線照射によるDNA損傷では活性化と不活性化を繰り返すパルス状のダイナミクスを示すが、UV照射によるDNA損傷では持続的である。そして、このダイナミクスの違いを細胞は認識し、一時的に細胞周期を停止するか、細胞死するかを決定する。他にも、転写因子のNF- $\kappa$ Bは、細胞質内と核内を行き来することで遺伝子発現を制御することが分かっている。このことから、NF- $\kappa$ B活性の振動(細胞質と細胞核間の往復)が遺伝子制御に重要であることを示唆している(Nelson et al., 2004)。さらに、他のダイナミックエンコーディングの例としてERKがある。ERKは、上皮細胞増殖因子(epidermal growth factor、EGF)受容体(EGFR)の活性化や、酸化などの細胞ストレスに応答し、細胞増殖や遺伝子発現を制御する。ERKは細胞ごとに活性化と不活性化を繰り返しており、このパルスの頻度が細胞増殖の頻度に影響することが示されている(Aoki et al., 2013)。他の例として、光遺伝学ツールを利用したERKの人為的な操作の研究がある(Bugaj et al., 2018)。この研究では、光遺伝学ツールを利用してRasタンパク質を任意のタイミングで活性化させる方法を確立しており、これを用いて正常細胞とヒト悪性腫瘍由来細胞(BRAF G469A)をそれぞれ調べている。その結果、ヒト悪性腫瘍由来細胞ではRas活性を停止してもERK活性が正常細胞のように速やかに停止せず持続し、そのために不適切な細胞増殖が起こることを示した。このように、細胞内ではシグナル伝達のダイナミクスによって表現型が制御を受けることが分かっている。

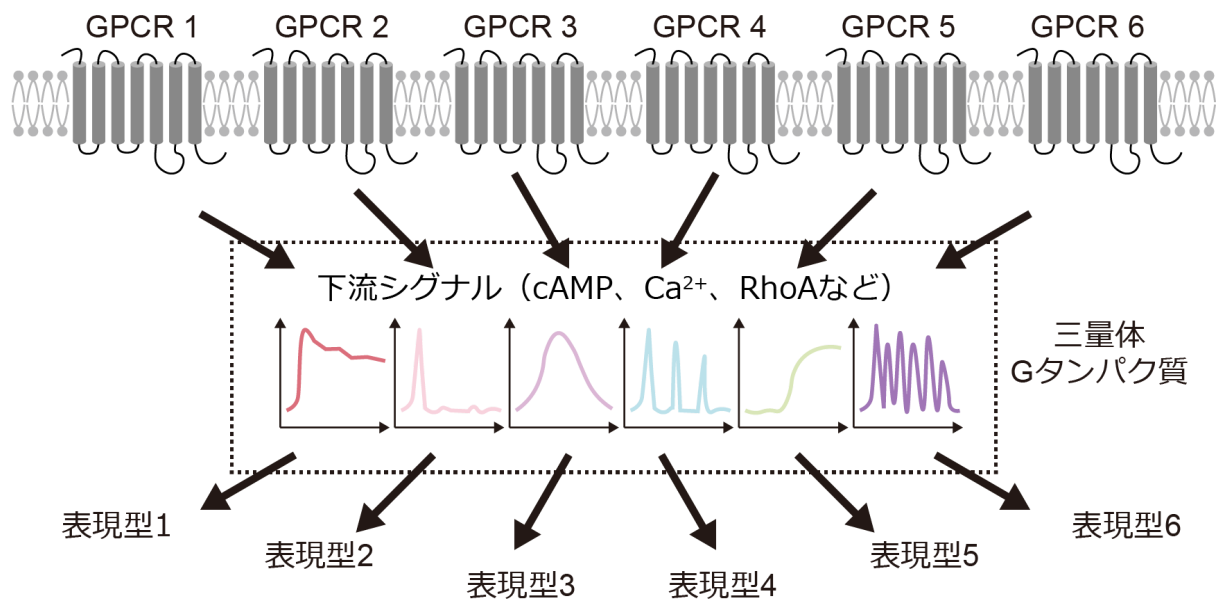


図3. 多数のGPCRが少数の三量体Gタンパク質を介して異なる応答を示すBow-Tieモデル図  
 1つの細胞上で、GPCRは何十種類も共発現しており、GPCRは少数の三量体Gタンパク質を介してシグナル伝達を行う。この時、シグナル伝達のダイナミクスがそれぞれ異なり、細胞がシグナルダイナミクスの違いを認識することができれば、何十種類ものGPCRシグナルを区別することも可能であると考えられる。

今日において、GPCRシグナルによって細胞内cAMP濃度が上昇する(または低下する)、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する、RhoAが活性化するなどの変化が起こることは知られているが、GPCR間で下流シグナルのダイナミクスを比較したという報告はほとんどない。GPCRごとに様々なシグナルダイナミクスに違いがあり、さらにそれらのダイナミクスの組み合わせが異なる場合、その違いがGPCRを識別する情報となる可能性がある(図3)。そこで本研究では、GPCR間のシグナルダイナミクスを測定し、比較することで違いが見られるかどうかを検証した。GPCR下流シグナルとして、cAMP、Ca<sup>2+</sup>、RhoA、ERKの4種類をターゲットにした。また、4種類の下流シグナルを同時に定量、比較するため、多重蛍光イメージング法を採用した。蛍光バイオセンサーは、cAMP応答を測定するためにCFP-Epac-YFPを、Ca<sup>2+</sup>応答を測定するためにR-GECO1.0を、RhoA活性を測定するためにDORA-RhoAを、そしてERK活性を測定するためにERK-KTR-miRFP703をそれぞれ使用した(図4)。本研究では、多重蛍光イメージング法で5種類のDA受容体サブタイプ

および12種類の5-HT受容体サブタイプの下流シグナルを細胞ごとにそれぞれ定量し、さらに得られたシグナルダイナミクスをクラスター分類した。その結果、シグナルダイナミクスが、同じGαタンパク質サブファミリーと共役するGPCR間でも異なることを明らかにした。このことから、細胞が何十種類ものGPCRからのシグナルを区別するため、シグナルダイナミクスの違いや組み合わせが情報としてencodingされている可能性を示した。

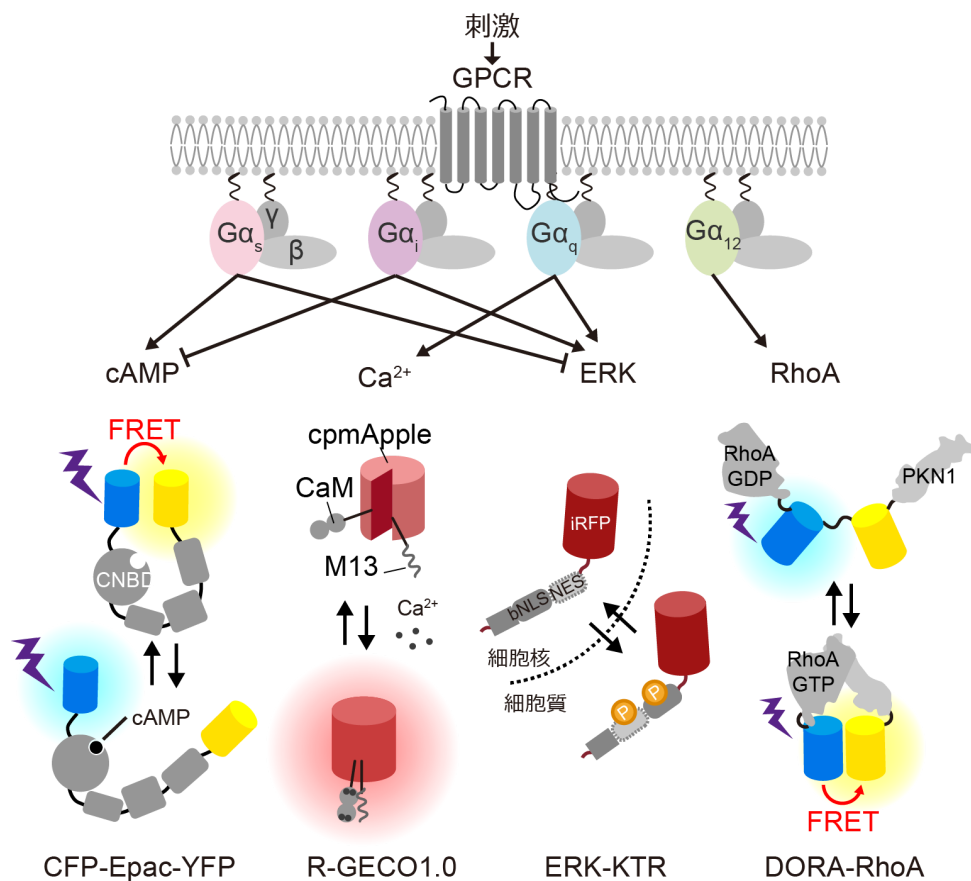


図4. 三量体Gタンパク質に対応する下流シグナルのバイオセンサー

本研究では、cAMP、Ca<sup>2+</sup>、RhoA、ERKの4種類の下流シグナルを検出するバイオセンサーとして、それぞれCFP-Epac-YFP、R-GECO1.0、DORA-RhoA、ERK-KTR-miRFP703の4種類を採用した。FRETはFörster resonance energy transferの略である。

## 2. 材料と方法

### 2.1. プラスミド

本研究で使用したプラスミドを表1に記載した。また、プラスミド作製のために使用した制限酵素等を表2に記載した。細胞内cAMP濃度を測定するため、当研究室の先行研究で用いられたpCX4neo-CFP-Epac-YFP(Nakamoto et al., 2021)を使用した。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を測定するため、R-GECO1.0(Zhao et al., 2011)を用いた。トランスポゾンを利用したR-GECO1.0安定発現細胞株の樹立を行うため、当研究室で既に作製されたpPBbsr-R-GECO1.0を用いた。

pPBbsr-R-GECO1.0は、IRES (internal ribosome entry site) -*bsr* (blasticidin S耐性遺伝子)を含んだPiggyBactトランスポゾンシステム(Yusa et al., 2009)のpPBbsr-MCSをベクターとし、CMV-R-GECO1.0(#32444, addgene)からBamHIとEcoRIで切り出したR-GECO1.0断片を、pPBbsr-MCSのMCS (multi cloning site)にLigation high Ver.2によるライゲーションで挿入し、得られたものである。RhoA活性を測定するため、DORA-RhoA(van Unen et al., 2015)を用いた。Tol2トランスポゾンシステム(Kawakami and Noda, 2004)を利用したDORA-RhoA安定発現細胞株の樹立を行うため、IRES-*bsr*を含んだTol2トランスポゾンシステムのpT2Absr-MCSを用いた。まず、pT2Absr-MCSを制限酵素のEcoRIとNotIで処理した。次に、同じ組み合わせの制限酵素で、Yi Wu博士より提供して頂いたpTriEX-His-DORA-RhoA(Heemskerk et al., 2016)を処理してDORA-RhoAの断片を得た。最後に、これら二種類のDNA断片のライゲーションを行い、pT2Absr-DORA-RhoAを作製した。ERK活性を測定するため、ERK-KTR (kinase translocation reporter) (Regot et al., 2014)を用いた。まず、先行研究で利用されたpCSIIneo-ERK-KTR-mKO (monomeric kusabira orange) (Maryu et al., 2016)を、EcoRIとNotIで処理してERK-KTRのDNA断片を得た。次に、pmiRFP703-N1 (#79988, addgene)から、以前に当研究室でPCR法により、N末端にNotI、C末端にXbaIの制限酵素サイトを付与し、pCR4Blunt-TOPO (450031, ThermoFisher)にサブクローニングされたpTopo-miRFP703-NotI-XbaIを制限酵素で処理してmiRFP703断片を得た。最後に、レンチウイルスを利用したERK-KTR-miRFP703安定発現細胞

株の樹立を行うため、IRES-*bleo* (zeocin耐性遺伝子)を含んだpCSIIbleo-MCSのMCSを、EcoRIとXbaIで処理し、この3種類のDNA断片をライゲーションし、pCSIIbleo-ERK-KTR-miRFP703を作製した。また、KTRの解析のため、細胞核マーカーとして、リンカーヒストンH1に赤色蛍光タンパク質mCherryを融合したH1-mCherry(Imanishi et al., 2018)を使用した。まず、IRES-*neo*を含むpCSIIneo-MCSをEcoRIとXbaIで処理した。次に、以前に当研究室で作製されたpT2Apuro-H1-mCherryを、EcoRIとXbaIで処理してDNA断片を得た。これら2種類のDNA断片をライゲーションし、pCSIIneo-H1-mCherryを作製した。

バイオセンサー発現プラスミド以外のプラスミドでは、PiggyBactランスポゾンを利用するため、PiggyBactランスポゼース発現プラスミドのpCMV-mPBase(*neo*-)を使用した。レトロウイルスベクター作製のため、ウイルスエンベロープ発現プラスミドのpCMV-VSV-G-RSV-Rev(Miyoshi et al., 1998)およびレトロウイルスパッケージングプラスミドのpGP(Akagi et al., 2000)を使用した。また、レンチウイルスベクター作製のため、pCMV-VSV-G-RSV-RevおよびレンチウイルスパッケージングプラスミドのpsPAX2(Didier Trono博士より提供)(Moffat et al., 2006)を使用した。Tol2ランスポゾンを利用した遺伝子導入のため、Tol2ランスポゼース発現プラスミドのpCAGGS-T2TP(Kawakami and Noda, 2004)を使用した。

GPCR発現プラスミドには、Kroezeらによって樹立されたPRESTO-TangoのGPCRライブラリーのプラスミドを使用した(Kroeze et al., 2015)。また、GPCR発現プラスミドの対照群として、pCAGGS-MCS(Niwa et al., 1991)を用いた。加えて、GPCR発現細胞の選択を行うため、puromycin耐性遺伝子発現プラスミドのpCSIIpuro-MCSを使用した。

表1. 本研究で遺伝子発現に使用したプラスミド

プラスミド名	ベクター	発現遺伝子	薬剤耐性
pCX4neo-CFP-Epac-YFP	pCX4neo (Akagi et al., 2000)	CFP-Epac-YFP (Nakamoto et al., 2021; Ponsioen et al., 2004)	neomycin (G418)
pPBbsr-R-GECO1.0	pPBbsr (Yusa et al., 2009)	R-GECO1.0 (Zhao et al., 2011)	blasticidin S
pT2Absr-DORA-RhoA	pT2Absr (Kawakami and Noda, 2004)	DORA-RhoA (van Unen et al., 2015)	blasticidin S
pCSIIbleo-ERK-KTR-miRFP703	pCSIIbleo (Aoki et al., 2017)	ERK-KTR-miRFP703 (Regot et al., 2014; Shcherbakova et al., 2016)	zeocin
pCSIIneo-H1-mCherry	pCSIIneo (Maryu et al., 2016)	H1-mCherry (Imanishi et al., 2018)	neomycin (G418)
pCMV-mPBase(neo-)	pCMV	PiggyBac transposase	-
psPAX2	-	GAG-Pol, Rev	-
pCMV-VSV-G-RSV-Rev	pCMV	VSV-G, Rev	-
pGP	-	GAG-Pol	-
pCAGGS-T2TP	pCAGGS (Niwa et al., 1991)	T2TP	-
DRD1-Tango	empty Tango vector	DRD1	-
DRD2-Tango	empty Tango vector	DRD2	-
DRD3-Tango	empty Tango vector	DRD3	-
DRD4-Tango	empty Tango vector	DRD4	-
DRD5-Tango	empty Tango vector	DRD5	-
HTR1A-Tango	empty Tango vector	HTR1A	-
HTR1B-Tango	empty Tango vector	HTR1B	-
HTR1D-Tango	empty Tango vector	HTR1D	-
HTR1E-Tango	empty Tango vector	HTR1E	-

HTR1F-Tango	empty Tango vector	HTR1F	-
HTR2A-Tango	empty Tango vector	HTR2A	-
HTR2B-Tango	empty Tango vector	HTR2B	-
HTR2C-Tango	empty Tango vector	HTR2C	-
HTR4-Tango	empty Tango vector	HTR4	-
HTR5-Tango	empty Tango vector	HTR5	-
HTR6-Tango	empty Tango vector	HTR6	-
HTR7-Tango	empty Tango vector	HTR7	-
pCAGGS-MCS	pCAGGS	-	-
pCSIIpuro-MCS	pCSIIpuro	-	puromycin

表2. プラスミド作製に使用した試薬

試薬	種類	製造元	製品番号
BamHI	制限酵素	TakaraBio	1010A
EcoRI	制限酵素	TakaraBio	1040A
NotI	制限酵素	TakaraBio	1166A
Sall	制限酵素	TakaraBio	1080A
XbaI	制限酵素	TakaraBio	1093A
Ligation high Ver.2	ligation mix	Toyobo	LGK-201



## 2.2. 細胞培養

細胞培養に利用した試薬の詳細を表3に記載する。本研究では、京都大学生命科学研究科の松田道行博士より提供して頂いたHeLa細胞とLenti-X 293T細胞(632180、TakaraBio)の2種類の細胞株を用いた。これらの細胞株の培養のため、ダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle medium、DMEM)に、ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum、FBS)を10%添加した培地を用いた。細胞株は、100 mm dish(150466、ThermoFisher)に培地を10 mL添加し、37°CかつCO<sub>2</sub>濃度5%状態で培養した。細胞株を継代するため、培地を除去し、トリプシン溶液(下記参照)で2回100 mm dishを洗った後、37°Cで5分間処理した。トリプシン処理をした細胞に培地10 mLを加え、ピペッティングにより細胞を100 mm dishから剥がし、細胞懸濁液を作った。細胞懸濁液を新しい100 mm dishに2 mL(1/5量)または1 mL(1/10量)添加し、培地を加えて10 mLにして培養した。また細胞株のストックの作製には、Cell Reservoir Oneを使用した。

トリプシン溶液の組成(100 mLあたり)

- PBS: 89 mL
- 2.5% Trypsin: 10 mL(最終濃度0.25%)
- 2% EDTA: 1 mL(最終濃度0.02%)

表3. 細胞培養に使用した試薬

試薬	製造元	製造番号
DMEM	nacalai tesque	08459-64
FBS	Sigma-Aldrich	172012-500ML
PBS tablets	TakaraBio	T900
2.5% Trypsin	ThermoFisher	15090046
EDTA	Kanto Chemical	14096-00
Cell Reservoir One	nacalai tesque	07485-44

### 2.3. バイオセンサー安定発現細胞株の樹立

安定発現細胞株の樹立のため使用した試薬等を、表4に記載した。本研究では、cAMPセンサーとCa<sup>2+</sup>センサーを安定発現させたHeLa細胞(HeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup>)と、RhoAセンサーとERKセンサーと核マーカーを安定発現させたHeLa細胞(HeLa/RhoA/ERK)、そしてcAMPセンサーとERKセンサーと核マーカーを発現させたHeLa細胞(HeLa/cAMP/ERK)の計3種類の細胞株を樹立した。

HeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup>の作製のため、35 mm dish(150460、ThermoFisher)で、以前に当研究室で樹立されたR-GECO1.0(Ca<sup>2+</sup>センサー)安定発現細胞を用いた。まず、cAMPセンサー遺伝子を持つレトロウイルスベクターを作製するため、pCX4neo-CFP-Epac-YFP:pGP:pCSV-VSV-G-RSV-Rev=2 µg:1 µg:1 µgの比率のDNAを、10 µLのPolyethylenimine “MAX”(PEIMAX、1 mg/mL)を用いて、35 mm dishで培養したLenti-X 293T細胞に遺伝子導入した。3時間後に培地交換を行い、2日間培養してcAMPセンサー遺伝子を持つレトロウイルスベクターを作製した。次に、35 mm dishで培養したCa<sup>2+</sup>センサー発現細胞の培地を除き、0.2 µmフィルター(S1302、Kurabo)でろ過したLenti-X 293細胞の培地上清(レトロウイルスベクターを含む)を添加し、最終濃度10 µg/mLとなるようにPolybreneを加えた。2日後、細胞株を100 mm dishに継代し、最終濃度1 mg/mLのG418で発現細胞を選択することで、HeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup>を作製した。

HeLa/RhoA/ERKの作製のため、pCSIIbleo-ERK-KTR-miRFP703:psPAX2:pCSV-VSV-G-RSV-Rev=2 µg:1 µg:1 µgの比率のDNAを、35 mm dishで培養したLenti-X 293T細胞に、10 µLのPEIMAXで遺伝子導入した。3時間後に培地交換を行い、その後2日間培養してERKセンサー遺伝子を持つレンチウイルスベクターを作製した。次に、35 mm dishで培養したHeLa細胞の培地を除き、0.2 µmフィルターでろ過したLenti-X 293細胞の培地上清(レンチウイルスベクターを含む)を添加し、最終濃度10 µg/mLとなるようにPolybreneを添加した。2日後、細胞株を100 mm dishに継代し、最終濃度100 µg/mLのzeocinで発現細胞を選択することで、ERK-KTR-miRFP703(ERKセンサー)発現細胞を作製した。次に、pT2Absr-DORA-RhoA:pCAGGS-T2TP=800 ng:200 ng(4:1)の比率のDNAを、35 mm dishで培養したERKセンサー

発現細胞株に、1  $\mu$ Lの293fectinで遺伝子導入した。翌日、細胞株を100 mm dishに継代し、blasticidin Sで発現細胞を選択することで、ERKセンサーとRhoAセンサーの安定発現細胞を作製した。さらに、pCSIIbleo-ERK-KTR-miRFP703と同じ手法で、pCSIIneo-H1-mCherryを持つレンチウイルスベクターを作製した。35 mm dishで培養したERKセンサーとRhoAセンサーの安定発現細胞の培地を除き、0.2  $\mu$ mフィルターでろ過したLenti-X 293細胞の培地上清(レンチウイルスベクターを含む)を添加し、最終濃度1 mg/mLのG418で発現細胞を選択することで、安定発現のHeLa/RhoA/ERKを作製した。

作製したHeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup>およびHeLa/RhoA/ERKの細胞株は、バルクで使用するか、シングルセルクローンを獲得し、使用した。シングルセルクローンを獲得するため、限界希釈クローニングを行った。まず、細胞懸濁液を希釈して10 mLあたり100細胞の懸濁液を作製した。次に、96 well plate(167008、ThermoFisher)に1ウェルあたり100  $\mu$ Lの懸濁液を分注した。1ウェルに1細胞が入ったウェルを顕微鏡下で確認し、増殖した細胞株を継代することでシングルセルクローンを得た。

HeLa/cAMP/ERKの作製のため、上述した手法と同様に、pCX4neo-CFP-Epac-YFPを含むレンチウイルスベクター入りの培地上清と、pCSIIneo-H1-mCherryを含むレンチウイルスベクター入りの培地上清を、それぞれ作製した。これら二種類のウイルスベクター入り培地上清を用いて、ERKセンサー発現細胞に上記と同じ方法で感染させた。2日後、細胞株を新しい100 mm dishに継代し、最終濃度1 mg/mLのG418入りの培地で発現細胞を培養した。さらに、セルソーター(下記参照)を使用して、cAMPセンサー(YFP)と核マーカー(RFP)の双方が発現した細胞株(HeLa/cAMP/ERK)を選択した。

#### セルソーターの詳細

- セルソーター: MA900 (Sony)
- ソーティングチップ: 130  $\mu\text{m}$  (LE-C3213, Sony)
- セルストレーナー: 5 mL tube (352235, Corning)
- レーザー光源: 488 nm (YFP)、561 nm (RFP)
- 蛍光フィルター: 525/50 (YFP)、617/30 (RFP)
- キャリブレーションビーズ: Automatic Setup Beads (LE-B3001, Sony)

表4. 安定発現細胞株の樹立のため使用した試薬等

試薬	製造元	製造番号
Opti-MEM	ThermoFisher	31985070
293fectin	ThermoFisher	12347019
PEIMAX	Polysciences	24765-2
Polybrene	nacalai tesque	12996-81
Blasticidin S	nacalai tesque	03759-71
Zeocin	nacalai tesque	61483-26
G418	nacalai tesque	23985-94
Puromycin	nacalai tesque	14861-71

## 2.4. GPCR遺伝子の導入

バイオセンサーの安定発現細胞株にGPCR遺伝子を導入するため、まず、4分画glass bottom dish(627870、greiner bio-one)に、HeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup>:HeLa/RhoA/ERK=1:1の比率で混合した細胞懸濁液を播種して一晩培養した。次に、0.25  $\mu$ Lの293fectinを12.5  $\mu$ LのOpti-MEMに加えて5分間静置した(Tube A)。また、GPCRライブラリーのプラスミド(またはpCAGGS-MCS)(表1を参照)を230 ng、puromycin耐性遺伝子を含むpCSIIpuro-MCSを20 ngと、12.5  $\mu$ LのOpti-MEMを混合した(Tube B)。さらに、Tube AとTube Bを混合して室温で15分間反応させ、混合液を1分画の培地に加え、一晩培養した。最終濃度2  $\mu$ g/mLのpuromycin入りの培地に交換して2日間培養した。リポフェクション法による複数の遺伝子の共発現を利用することで、GPCR遺伝子の1/10量のpuromycin耐性遺伝子を発現し、生存した細胞をGPCR発現細胞とした。最後に、血清飢餓状態にしてERK活性を基底状態にするため、下記の組成の無血清培地に交換し、18~25時間培養した。

無血清培地の組成(50 mLあたり)

- FluoroBrite DMEM(A18967、ThermoFisher):48.5 mL
- 100x GlutaMAX(35050-061、ThermoFisher):0.5 mL(最終濃度1%)
- 5% BSA(01281-84、nacalai tesque):1 mL(最終濃度0.1%)

## 2.5. 蛍光タイムラプスイメージング

蛍光タイムラプスイメージングに用いる蛍光顕微鏡には、以下の条件のものを使用した。

### 蛍光顕微鏡関連の設定

- 蛍光顕微鏡: IX81倒立顕微鏡 (Olympus)
- カメラ: Retiga 4000R 冷却CCD (charge-coupled device)カメラ (QImaging)
  - 画素: 4 x 4 binning (1 pixel)
  - 画像サイズ: 512 pixel x 512 pixel
- レーザー光源: Spectra-X light engine (Lumencor)
- 対物レンズ: UAPO/340 40x/1.35油浸対物レンズ (Olympus)
  - スケール: 0.615  $\mu\text{m}/\text{pixel}$
- 自動焦点調整システム: IX2-ZDC (Olympus)
- フィルターホイール: MAC5000 (Ludl Electronic Products)
- 電動ステージ: XY stage (Ludl Electronic Products)
- 培養チャンバー: フィードバック式加温チャンバー (Tokai Hit)
- CO<sub>2</sub>供給装置: GM-4000 (Tokai Hit)
- 顕微鏡制御ソフトウェア: MetaMorph (Molecular Devices)

また、多重蛍光イメージングでは、複数色の蛍光を同時に観察するため、以下のフィルターを使用した(表5)。

表5. 多重蛍光イメージングで使したフィルター

蛍光タンパク質	励起光波長	励起フィルター	ダイクロイックミラー	吸収フィルター
miRFP703	Red 632/22 (Lumencor)	-	FF408/504/581/ 667/762-Di01 (Semrock)	FF01-692/LP (Semrock)
R-GECO1.0, mCherry	-	FF01-580/20 (Semrock)	20/80 Beamsplitter (Chroma)	FF01-641/75 (Semrock)
FRET (YFP)	Blue 438/24 (Lumencor)	-	XF2034 455DRLP (Omega Optical )	FF01-542/27 (Semrock)
CFP	Blue 438/24 (Lumencor)	-	XF2034 455DRLP (Omega Optical )	FF01-483/32 (Semrock)

多重蛍光イメージングでは、開始から1分おきに30分間の撮影を行った。細胞への露光は、iRFP → RFP → FRET → CFPの順で行い、露光時間は各300 msずつとした。撮影開始から5分後の時点で、細胞に薬剤(表6)を添加し、各バイオセンサーの蛍光を25分間撮影した。

また、 $G\alpha_{i/o}$ 共役型のGPCR活性による細胞内cAMP濃度の減少を観察するため、あらかじめ細胞内cAMP濃度を上げた状態でリガンド刺激を行う蛍光タイムラプスイメージングを行った。この条件では、まず、撮影開始から5分後の時点で、ISO(100 nM)で刺激し、観察する細胞の細胞内cAMP濃度を上昇させた。さらに10分後、細胞に10  $\mu$ MのDAまたは5-HT(またはvehicle)を添加し、 $G\alpha_{i/o}$ タンパク質の活性化による細胞内cAMP濃度の低下を観察した。

表6. 細胞刺激に利用した薬剤の一覧

名前	溶媒	ストック濃度	製造元	製造番号
Forskolin (FSK)	DMSO	50 mM	Wako	CAF6328
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	DMSO	100 mM	Wako	SPK4223
Adenosine triphosphate (ATP)	H <sub>2</sub> O	100 mM	TCI	A0157
Epithelial Growth Factor (EGF)	H <sub>2</sub> O + BSA (1 mg/mL)	10 mg/mL	PeproTech	AF-100-15-1MG
Dopamine (DA)	HCl (10 mM)	1 M	Sigma-Aldrich	H8602
Serotonin (5-HT)	HCl (10 mM)	50 mM	Cayman	14332
Isoproterenol (ISO)	H <sub>2</sub> O	100 mM	Sigma-Aldrich	I6504



## 2.6. 免疫染色

免疫染色は、当研究室の後藤祐平博士によって行われた。PRESTO-Tangoのプラスミドは、GPCR遺伝子のN末端にFLAGタグが付いており、細胞にGPCRを発現させると、FLAGタグが細胞外に出た状態になる。これを免疫染色することで、細胞表面のGPCR発現量を測定することができる。PRESTO-Tangoプラスミド:pCAGGS-mEGFP(当研究室で作製)=230 ng:20 ngのDNAの比率でHeLa細胞に遺伝子発現した。pCAGGS-mEGFPは、GPCR発現量の規格化を行うための内部標準として用いた。次に、最終濃度3.7%ホルムアルデヒド(16223-55、nacalai tesque)で30分間固定し、PBSで4回洗浄した。その後、3%BSAと0.02%TritonX-100入りのPBS(ブロッキング溶液)に15分間浸した。また、細胞全体の発現量を調べるため、別の細胞で0.2%TritonX-100(35501-02、nacalai tesque)入りのPBSで15分間透過処理した後、ブロッキング溶液に15分間浸した。一次抗体のmonoclonal anti-FLAG M2 antibody(F1804、Sigma-Aldrich)を500倍希釈したブロッキング溶液で細胞を一晩4℃で静置した。その後PBSで3回洗浄を行い、2次抗体のGoat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Absorbed Secondary Antibody Alexa Fluor Plus 555(A32727、ThermoFisher)を1,000倍希釈したブロッキング溶液で1時間室温で静置した。最後に、PBSで3回洗浄し、スピニングディスク型共焦点顕微鏡で撮影した。以下に条件を記載する。

### 共焦点顕微鏡関連の設定

- 顕微鏡: IX83倒立顕微鏡(Olympus)
- カメラ: Prime sCMOS camera(Teledyne Photometrics)
- 共焦点スキャナユニット: CSU-W1(Yokogawa Electric)
- レーザー光源(ダイオード): OBIS(Coherent)
  - 波長: 488 nm(100 msec露光)、561 nm(500 msec露光)
- 対物レンズ: UPLXAPO20X NA 0.8(Olympus)
- 培養チャンバー: STXG-IX3WX(Tokai Hit)
- 顕微鏡制御ソフトウェア: MetaMorph(Molecular Devices)

## 2.7. 画像解析

撮影した画像の解析には、Fiji (ImageJ) を利用した。CFP-Epac-YFP または DORA-RhoA の解析では、それぞれ CFP 画像と FRET 画像の比 (CFP/FRET) または FRET 画像と CFP 画像の比 (FRET/CFP) の比率画像を作成した。また、強度変調表示 (Intensity-Modulated Display, IMD) を利用して比率画像を疑似カラー表示した。

HeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup> の解析では、まず Rolling Ball 法によって画像の背景の輝度値を減算し、メディアンフィルターによってバックグラウンドノイズを除去した。また、細胞へのリガンド刺激や撮影ステージの熱膨張などで撮影位置がシフトする可能性があるため、StackReg (Thevenaz et al., 1998) を用いて、画像の位置合わせを行った。細胞のシグナル応答の定量では、細胞の中心に直径 20 pixel (約 12  $\mu\text{m}$ ) の円形 ROI (region of interest) を設定した。その際、死細胞が重なった細胞は解析から除いた。

また、HeLa/RhoA/ERK の解析では、KTR レポーターの解析用ソフトウェアである CellTK を利用した (Kudo et al., 2018)。CellTK では、まず、撮影した画像の背景の輝度値を Rolling Ball 法により減算した。次に、H1-mCherry の画像に Gaussian フィルターをかけて細胞核の画像を平滑化した。さらに、適応的閾値処理 (adaptive thresholding) のアルゴリズムを用いて画像ごとに二値化して、細胞核を検出した。上手く細胞核を検出できない場合は、細胞核の検出とセグメンテーションを行う StarDist (Weigert et al., 2019) を利用した。その後、検出された細胞核を追跡 (トラッキング) し、途中で検出されなくなった細胞核は定量から除外した。トラッキングした核の細胞に対応する iRFP 画像から、細胞核領域の蛍光輝度の平均値 (N) を算出した。次に、細胞核領域の外周を囲った細胞質領域の蛍光輝度の平均値 (C) を算出し、C/N を定量した。また、細胞質領域の ROI を用いて、FRET の画像と CFP の画像の蛍光輝度の平均値をそれぞれ定量し、FRET/CFP を算出した。CFP-Epac-YFP の発現量が DORA-RhoA の発現量よりも高く、2 つの細胞が近接していると蛍光が漏れ込むため、HeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup> の細胞に近接する HeLa/RhoA/ERK の細胞は定量から除外した。また、CFP の蛍光輝度とその時系列の変動係数 (coefficient of variation、

CV)から、DORA-RhoAが発現していない細胞や、死細胞等が重なった細胞を定量から除外した。

上述のHeLa/RhoA/ERKの解析と同様に、HeLa/cAMP/ERKの解析は、CellITKを用いてiRFP画像からC/Nを算出してERK活性を、FRET画像とCFP画像からCFP/FRETを算出してcAMP濃度をそれぞれ定量した。

## 2.8. 定量データの解析

蛍光画像の定量データは、蛍光輝度の変化率( $\Delta F/F_0$ )または蛍光輝度の比の変化率( $\Delta R/R_0$ )で示した。これは、刺激前の蛍光輝度( $F_0$ )または刺激前の蛍光輝度の比( $R_0$ )に対する差分( $\Delta F=F-F_0$ または $\Delta R=R-R_0$ )を、 $F_0$ または $R_0$ で規格化したものである。ただし、2種類の下流シグナル同士の相関解析では、基底状態のcAMP濃度を細胞間で比較するため、規格化していない定量データを使用した。それぞれのバイオセンサーの薬剤への応答を評価するため、用量応答曲線を求めた。まず、横軸はリガンド濃度を、縦軸は $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ のピークを示す散布図を作成した。次に、散布図から下記の数式を用いて用量応答曲線のフィッティングを行い、50%有効濃度( $EC_{50}$ )とヒル係数( $nH$ )を算出した。

$$(MAX - MIN) \times \frac{x^{nH}}{EC50^{nH} + x^{nH}} + MIN$$

(MAX: 応答の最大値、MIN: 応答の最小値、x: リガンド濃度)

また、バイオセンサーの発現量の応答性への影響を調べた。まず、横軸をバイオセンサーの発現量、縦軸をリガンド刺激した時の $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ で示した散布図を作成した。次に、ピアソンの積率相関係数( $r$ )を求め、発現量と応答性の相関を評価した。シグナルダイナミクスを比較するため、バイオセンサーの定量データを分類した。分類には、Pythonのモジュールであるscikit-learnとtslearnを利用して*K-means*クラスタリングを行った。*K-means*クラスタリングにより分類された時系列データ、cAMP濃度を低下させる実験の定量データ、cAMPと $Ca^{2+}$ 、cAMPとERK、ERKとRhoAのそれぞれの相関解析の定量データは、Pythonのseabornモジュールでヒートマップ化した。また、上昇させたcAMP濃度を低下させる実験のヒートマップは、刺激後のcAMP応答の積分値の小さい順に、細胞を並べて表記した。相関解析のヒートマップは、基底状態のcAMP濃度が低い順番に細胞を並べて表記し、同じ細胞の順番で $Ca^{2+}$ 濃度およびERK活性のヒートマップを作成し、相関関係を比較した。ERKとRhoAの相関解析のヒートマップは、リガンド刺激後のERK活性の積分値の小さい順に細胞を並べて表記し、同じ細胞の順番でRhoA活性のヒートマップを作成した。

## 3. 結果

### 3.1. GPCR下流シグナルを定量化するための蛍光イメージング バイオセンサーの検討

本研究では、GPCRシグナル伝達のBow-Tie構造におけるハブとして機能していると考えられるGPCR下流シグナル分子のダイナミクスに注目した。GPCR下流シグナルを測定するため、cAMP ( $G\alpha_s$ ) および  $Ca^{2+}$  ( $G\alpha_{q/11}$ ) の2種類のセカンドメッセンジャーと、RhoA ( $G\alpha_{12/13}$ ) および ERK ( $G\alpha_{i/o}$ 、 $G\alpha_{q/11}$ ) の2種類の下流シグナル分子の計4種類のシグナルダイナミクスを定量する蛍光バイオセンサーを選択した。

#### 3.1.1. 細胞内cAMP濃度の可視化

細胞内cAMP濃度を測定できるバイオセンサーを検討し、Ponsioenらにより開発されたcAMPバイオセンサーであるCFP-Epac-YFP(Ponsioen et al., 2004)を使用した。CFP-Epac-YFPは、YFPとCFPとの間にEpac(exchange protein activated by cAMP)のcAMP結合ドメインを組み込んだ一分子型の分子内構造変化を検出するFörster resonance energy transfer (FRET)バイオセンサーである(図5A)。CFP-Epac-YFPは、EpacにcAMPが結合していない状態ではYFPとCFPが接近し、高いFRET効率を維持した状態にあるが、EpacにcAMPが結合することで構造変化が起こり、YFPとCFPとの距離が離れることでFRET効率が減少する。このFRET効率の変化を定量することで、細胞内cAMP濃度の変化を可視化することができる。

まず、CFP-Epac-YFPを安定発現するHeLa細胞株を樹立し、cAMPを合成するACの活性剤であるフォルスコリン(Forskolin、FSK)と、cAMPを分解するホスホジエステラーゼ(phosphodiesterase、PDE)の阻害剤であるIBMX(isobutylmethylxanthine)を細胞に添加し、外因的に細胞内cAMP濃度を上昇させたときのFRET効率の変化を測定した。FSKとIBMXの添加によるFRET効率の変化を、CFPとFRETの蛍光強度の比(CFP/FRET)で測定し、CFP/FRETを

疑似カラーで示した(図5B)。CFP/FRETを定量したところ、刺激後に速やかに50%程度増加し、CFP/FRETが高い値を維持した。次にCFP-Epac-YFPのダイナミックレンジを調べるために、FSKとIBMXIに対する用量応答曲線を求めた(図5C)。FSK濃度が1  $\mu\text{M}$ ~数十  $\mu\text{M}$ の範囲で、CFP/FRETが上昇することがわかった。さらに、細胞内でのバイオセンサーの発現量によってセンサーの応答が影響を受けることが考えられた(Miura et al., 2018)ため、CFP-Epac-YFPの発現量と応答の強さの相関を調べた。EC<sub>50</sub>に近いFSK濃度において、CFP-Epac-YFPの発現量を横軸に、FSKに対する応答を縦軸にして散布図を描いた(図5D)。その結果、相関係数は-0.09であり、両者に相関はないと判断した。以上から、今回樹立した安定発現細胞株でのCFP-Epac-YFPの発現量は応答に影響を与えず、本研究においてcAMP濃度を測定するバイオセンサーとして、CFP-Epac-YFPの利用が可能であると結論付けた。

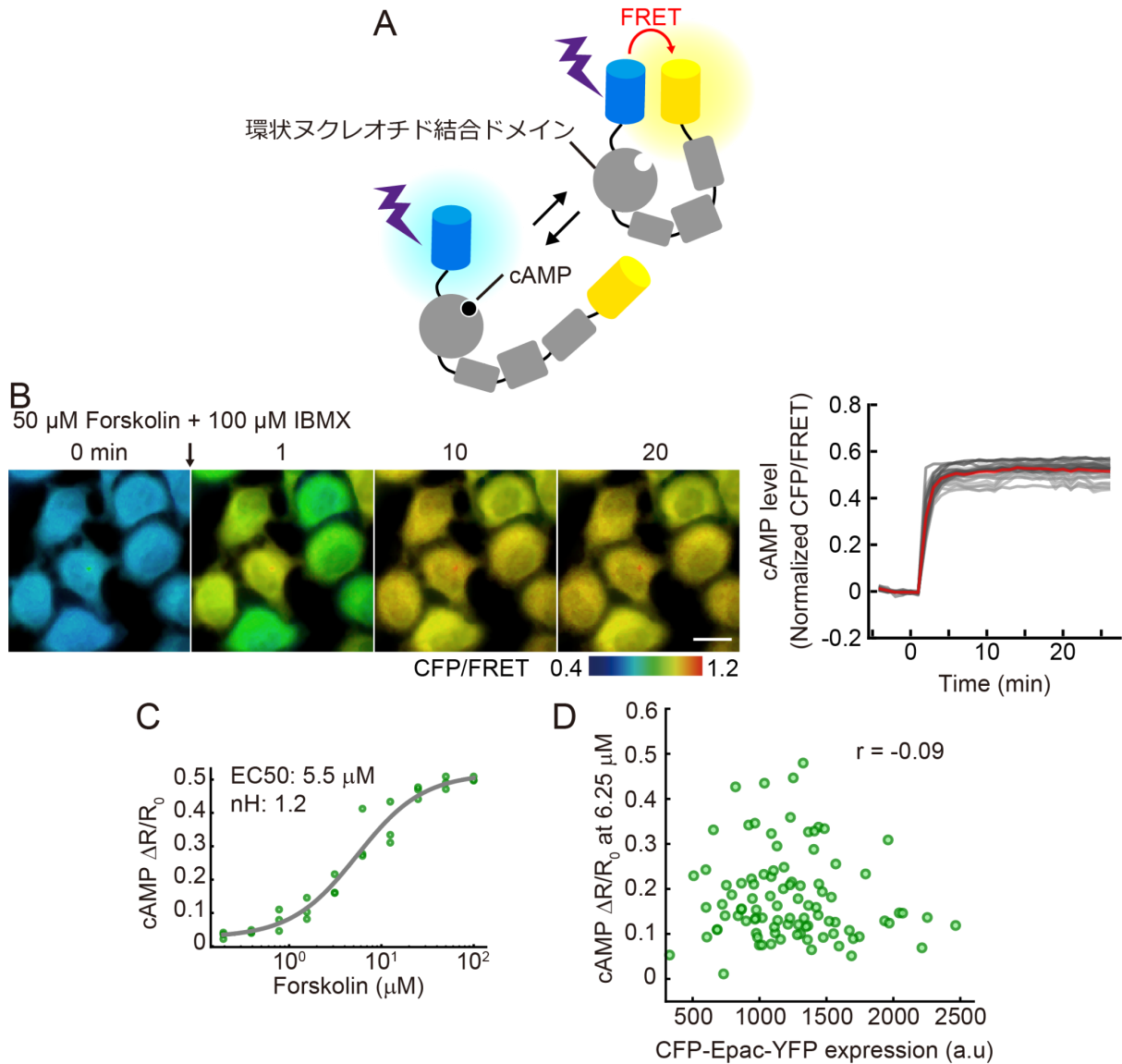


図5. cAMPバイオセンサーの機能評価

(A) CFP-Epac-YFPの模式図を示す。バイオセンサーに含まれる環状ヌクレオチド結合ドメイン(cyclic nucleotide binding domain、CNBD)にcAMPが結合することで、バイオセンサーの構造が変形し、FRET効率が変化する。(B) CFP-Epac-YFPを発現させたHeLa細胞に、Forskolin (FSK) 50  $\mu\text{M}$ とIBMX 100  $\mu\text{M}$ を添加した場合の細胞内cAMP濃度の変化を示す。また、添加した時間を0分とした時の蛍光増加比( $\Delta R/R_0$ )を示す。赤線は全細胞の $\Delta R/R_0$ の平均値、灰色の線は個々の細胞の $\Delta R/R_0$ を示す。実験は2回以上行い、合計32細胞を定量した。(C) FSKとIBMXを10段階の濃度で細胞に添加した時のCFP/FRETの $\Delta R/R_0$ に、用量応答曲線をフィッティングした。(EC<sub>50</sub>: FSKの50%有効濃度、nH:ヒル係数)(D) CFP-Epac-YFPの発現量(横軸)と、EC<sub>50</sub>に

近い濃度 (25  $\mu\text{M}$ ) のFSKで刺激した時の $\Delta R/R_0$  (縦軸) の相関を示す。 $r$  はピアソンの積率相関係数を示す。



### 3.1.2. 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の可視化

GPCRシグナルによる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を測定するため、Zhaoらにより開発された赤色蛍光Ca<sup>2+</sup>バイオセンサーのR-GECO1.0(Zhao et al., 2011)を使用した。R-GECO1.0は、Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質のカルモジュリン(calmodulin, CaM)とCaM結合タンパク質のM13(chicken myosin light chain kinase)を組み合わせたCa<sup>2+</sup>バイオセンサーである。CaMとM13との間は円順列変異体mApple(circular permuted mApple, cpmApple)で繋がっている。4つのCa<sup>2+</sup>との結合によりCaMが構造変化を起こし、M13と結合することで、cpmAppleの蛍光輝度が上昇する(図6A)。

まず、R-GECO1.0を安定発現したHeLa細胞株を樹立し、HeLa細胞に内在的に発現するGα<sub>q/11</sub>共役型のプリン受容体(Welter-Stahl et al., 2009)のリガンドであるアデノシン三リン酸(adenosine triphosphate、ATP)で刺激して外因的にCa<sup>2+</sup>濃度を上昇させた時の蛍光輝度の変化を測定した。刺激後、蛍光輝度は速やかに上昇して基底状態の蛍光輝度まで戻った。続けて蛍光輝度の変化を定量したところ、一過的な上昇を繰り返すパルス状の応答を示した(図6B)。細胞間で蛍光の変化率( $\Delta F/F_0$ )の程度は異なり、高い場合は300%程度上昇した。細胞間の $\Delta F/F_0$ の平均値は200%程度上昇した。次に、R-GECO1.0のダイナミックレンジを調べるために、ATPに対する用量応答曲線を求めた(図6C)。R-GECO1.0のヒル係数が5.4と他のバイオセンサーと比較して大きく、スイッチ様に応答した。また、ATPに対するEC<sub>50</sub>は2.8 μMであることが示された。さらに、R-GECO1.0の発現量と応答性の関係を調べた。EC<sub>50</sub>に近いATP濃度において、R-GECO1.0の発現量を横軸に、ATPに対する応答性を縦軸にして散布図を描いた(図6D)。相関係数は-0.28であり、両者に強い相関は見られなかった。以上から、今回樹立した安定発現細胞株でのR-GECO1.0の発現量は応答に影響を与えないものとし、本研究においてCa<sup>2+</sup>濃度を測定するバイオセンサーとして、R-GECO1.0の利用が可能であると結論付けた。

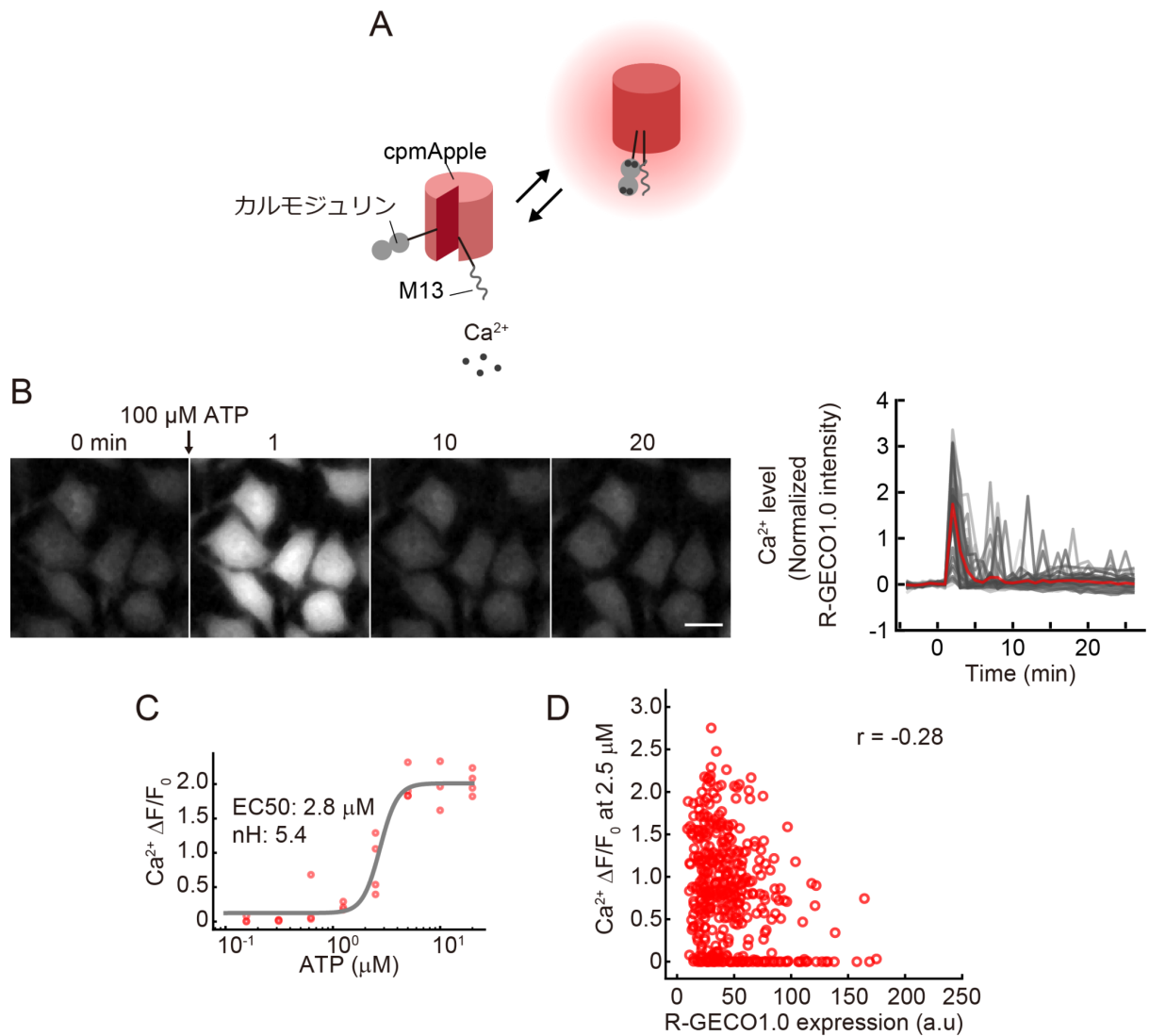


図6.  $\text{Ca}^{2+}$  バイオセンサーの機能評価

(A) R-GECO1.0の模式図を示す。 $\text{Ca}^{2+}$ が結合したCaMが構造変化し、M13と結合することでcpmAppleの蛍光輝度が上昇する。(B) R-GECO1.0を発現させたHeLa細胞に、ATP 100  $\mu\text{M}$ を添加した場合の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を示す。また、ATPで刺激した時間を0分とした時の蛍光変化比( $\Delta F/F_0$ )を示す。赤線は全細胞の $\Delta F/F_0$ の平均値、灰色の線は個々の細胞の $\Delta F/F_0$ を示す。実験は2回以上で、合計45細胞を定量した。(C) 8段階(0.16~20  $\mu\text{M}$ )のATP濃度でそれぞれ細胞を刺激した時の蛍光輝度の $\Delta F/F_0$ に、用量応答曲線をフィッティングした。(EC<sub>50</sub>:ATPの50%有効濃度、nH:ヒル係数)(D) R-GECO1.0の発現量(横軸)と、EC<sub>50</sub>に近い濃度(2.5 ng/mL)のATPで刺激した時の $\Delta F/F_0$ (縦軸)の相関を示す。 $r$ はピアソンの積率相関係数を示す。

### 3.1.3. 低分子量Gタンパク質RhoA活性の可視化

GPCR下流シグナルとしてのRhoA活性を定量するため、van Unenらによって開発されたDORA-RhoA(van Unen et al., 2015)を使用した。DORA-RhoAは、野生株RhoAと活性型RhoA特異的な結合タンパク質PKN1の性質を利用した一分子型のFRETバイオセンサーである。DORA-RhoAは、N末端からPKN1-YFP-CFP-RhoAの順に構成されており、活性化されたRhoAがPKN1と結合する。この構造変化によりYFP-CFP間の距離が狭まり、高FRET効率になる(図7A)。

まず、DORA-RhoAを安定発現するHeLa細胞を樹立し、HeLa細胞に内在的に発現する上皮成長因子受容体(EGFR)のアゴニストである上皮成長因子(EGF)を用いて、外因的にRhoAを活性化させたときのFRET効率の変化を測定した。FRET効率の変化は、FRET/CFPを用いて算出し、FRET/CFPを疑似カラーで示した(図7B)。EGFによる刺激前、 $\Delta R/R_0$ は低い値を示し、刺激後すぐに上昇し始め、その後15分程度かけて緩やかに減少した。FRET効率の変化を定量したところ、FRET/CFPが刺激後速やかに、刺激前と比較して最大40%上昇した。次に、DORA-RhoAのダイナミックレンジを調べるために、EGFに対する用量応答曲線を求めた(図7C)。EGF濃度が数 ng/mL ~ 数十 ng/mLの範囲で、FRET/CFPが変化することが分かった。さらに、DORA-RhoAの発現量と応答性の関係を調べた。EC<sub>50</sub>に近いEGF濃度において、DORA-RhoAの発現量を横軸に、EGFに対する応答性を縦軸にして散布図を描いた(図7D)。その結果、相関係数は-0.3であり、両者に強い相関は見られなかった。以上から、今回樹立した安定発現細胞株でのDORA-RhoAの発現量は応答に影響を与えないものとし、本研究においてRhoA活性を測定するバイオセンサーとして、DORA-RhoAの利用が可能であると結論付けた。

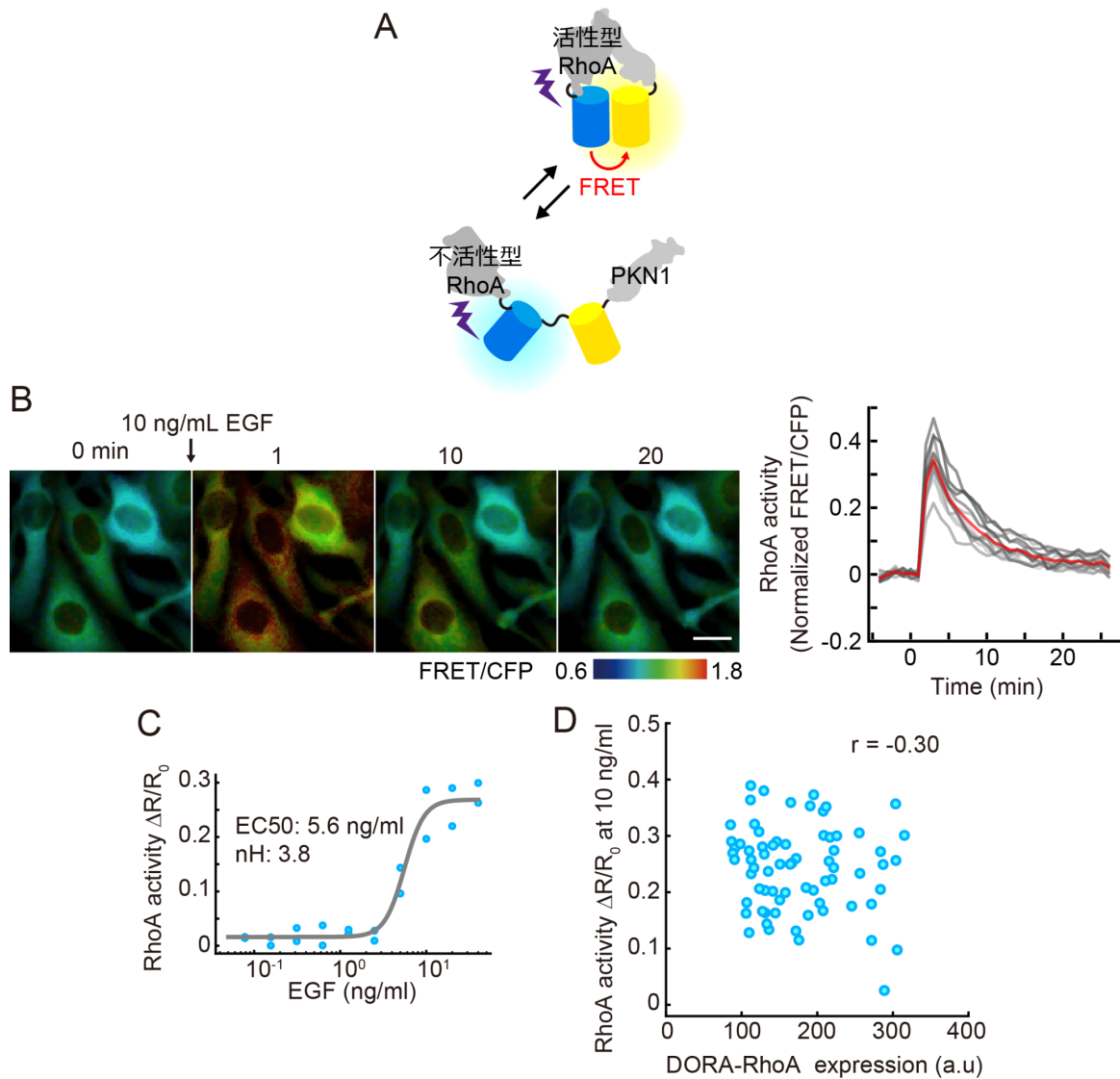


図7. RhoAバイオセンサーの機能評価

(A) DORA-RhoAの模式図を示す。活性型RhoA (RhoA GTP) がPKN1と結合することで、FRET効率が上昇する。(B) DORA-RhoAを発現させたHeLa細胞に、EGF 10 ng/mLを添加した場合のRhoA活性の変化を示す。また、EGFで刺激した時間を0分とした時のFRET/CFPの蛍光変化比 ( $\Delta R/R_0$ )を示す。赤線は全細胞の $\Delta R/R_0$ の平均値、灰色の線は個々の細胞の $\Delta R/R_0$ を示す。実験は2回以上で、合計13細胞を定量した。(C) 10段階(0.078~40  $\mu$ M)のEGF濃度でそれぞれ細胞を刺激した時のFRET/CFPの $\Delta R/R_0$ に、用量応答曲線をフィッティングした。(EC<sub>50</sub>: EGFの50%有効濃度、nH: ヒル係数)(D) DORA-RhoAの発現量(横軸)と、EC<sub>50</sub>に近い濃度(10 ng/mL)でリガンド刺激した時の $\Delta R/R_0$ (縦軸)の相関を示す。rはピアソンの積率相関係数を示す。

### 3.1.4. ERK MAPキナーゼ活性の可視化

$G\alpha_{i/o}$ および $G\alpha_{q/11}$ 活性のシグナルは、より下流のERKを活性化させることが報告されている (Blaukat et al., 2000; Mochizuki et al., 1999; Pietraszewska-Bogiel et al., 2020; Siuda et al., 2015)。そこで、GPCR下流シグナルのターゲットの1つとしてERKを選択した。ERK活性の測定には、Regotらが発表していたERK-KTR(Regot et al., 2014)を利用した。本バイオセンサーは kinase translocation reporter (KTR)を利用しており、低ERK活性ではERK-KTRが細胞核内に局在し、高ERK活性では細胞質内にERK-KTRが移行する仕組みとなっている。本研究では、ERK-KTRに近赤外蛍光タンパク質 (near-infrared fluorescence protein, iRFP) の一つの miRFP703を融合したERK-KTR-miRFP703を使用した(図8A)。

まず、ERK-KTR-miRFP703を安定発現するHeLa細胞を樹立し、HeLa細胞に内在的に発現するEGFRをEGFで活性化させた時のERK-KTR-miRFP703の核外移行を観察した(図8B)。ERK-KTR-miRFP703は刺激前は細胞核内に局在しており、刺激後5分程度でERK-KTR-miRFP703の核外移行が観察された。ERK活性は、ERK-KTR-miRFP703の細胞核外 (cytoplasm, C)と細胞核内 (nuclear, N)の蛍光輝度値をそれぞれ測定し、それらの比(C/N比)を算出することで定量した。刺激後5分辺りから緩やかにERK-KTR-miRFP703の核外移行が起こり、平均でC/Nが50%程度上昇した。次に、ERK-KTR-miRFP703のダイナミックレンジを調べるために、EGFに対する用量応答曲線を求めた(図8C)。その結果、EGF濃度が0.2 ng/mL ~ 20 ng/mLの範囲でC/Nが変化することが分かった。また、ERK-KTR-miRFP703の発現量と応答性の関係を調べた。EC<sub>50</sub>に近いEGF濃度において、ERK-KTR-miRFP703の発現量を横軸に、EGFに対する応答性を縦軸にして散布図を描いた(図8D)。その結果、相関係数は-0.13であり、両者に相関は見られなかった。以上から、今回樹立した安定発現細胞株でのERK-KTR-miRFP703の発現量は応答に影響を与えないものとし、本研究においてERK活性を測定するバイオセンサーとして、ERK-KTR-miRFP703の利用が可能であると結論付けた。

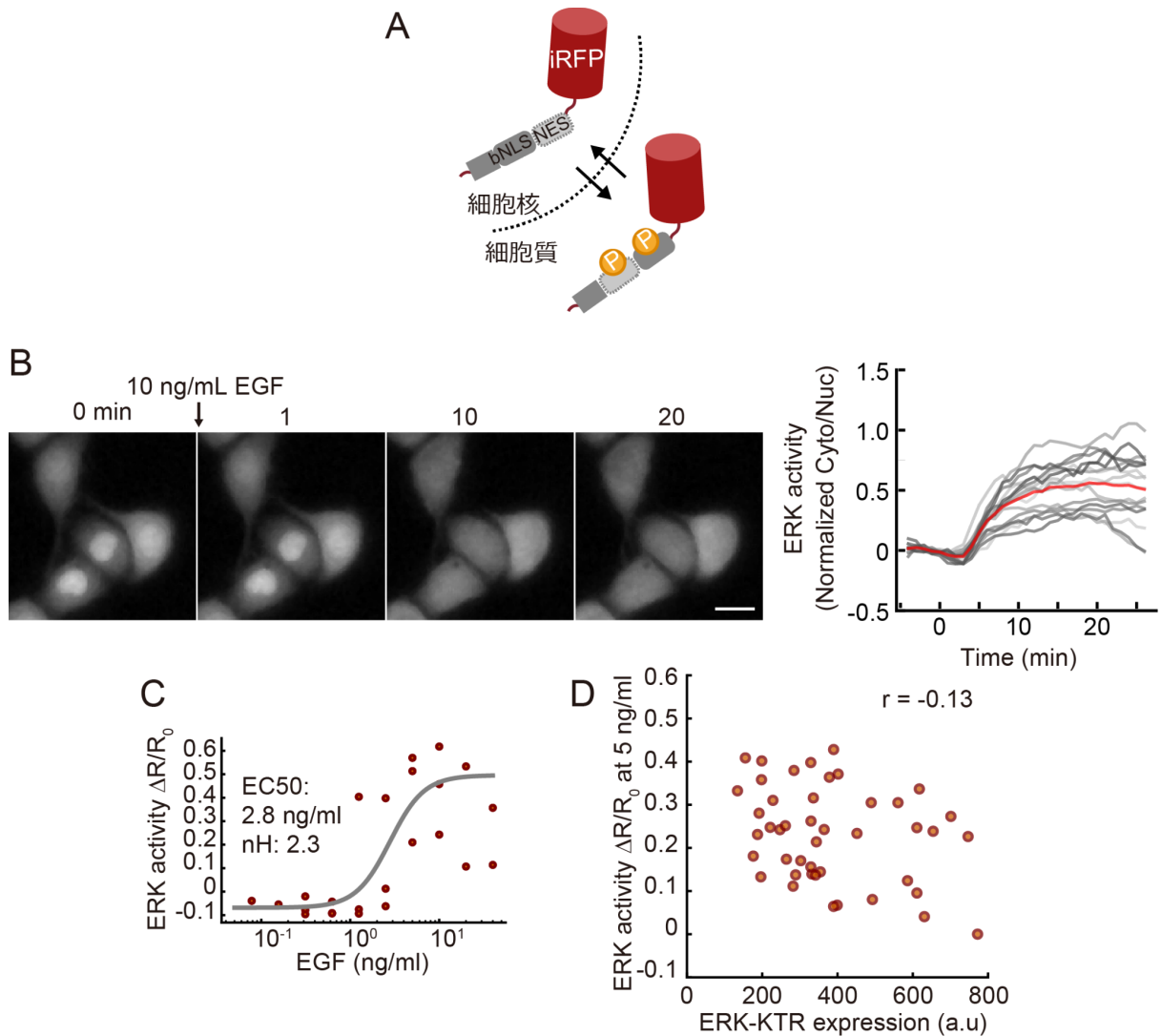


図8. ERKバイオセンサーの機能評価

(A) ERK-KTR-miRFP703の模式図を示す。活性化ERKにより、核移行シグナル(bipartite nuclear localization signal、bNLS)と核外移行シグナル(nuclear export signal、NES)がリン酸化され、それぞれbNLS活性がOFF、NES活性がONになることで、核内のERK-KTR-miRFP703が核外移行する。(B) ERK-KTR-miRFP703を発現させたHeLa細胞に、EGF 10 ng/mLを添加した場合のERK活性の変化を示す。また、EGFで刺激した時間を0分とした時のC/Nの変化比( $\Delta R/R_0$ )を示す。赤線は全細胞の $\Delta R/R_0$ の平均値、灰色の線は個々の細胞の $\Delta R/R_0$ を示す。実験は2回以上で、合計16細胞を定量した。(C) 10段階(0.078~40  $\mu\text{M}$ )のEGF濃度でそれぞれ細胞を刺激した時の $\Delta R/R_0$ に、用量応答曲線をフィッティングした。(EC<sub>50</sub>:EGFの50%有効濃度、nH:

ヒル係数)(**D**) DORA-RhoAの発現量(横軸)と、 $EC_{50}$ に近い濃度(5 ng/mL)でリガンド刺激した時の $\Delta R/R_0$ (縦軸)の相関を示す。 $r$ はピアソンの積率相関係数を示す。

### 3.2. GPCRシグナルを同時に定量する実験系の構築

本研究では、FRETを利用するバイオセンサーを2種類(CFP-Epac-YFPおよびDORA-RhoA)に加えて、さらに2種類の蛍光バイオセンサーを用いた多重蛍光イメージング法を確立するため、CFP-Epac-YFP(YFP+CFP)およびR-GECO1.0(RFP)の安定発現細胞(HeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup>)と、DORA-RhoA(YFP+CFP)およびERK-KTR-miRFP703(iRFP)、細胞核マーカーとしてH1-mCherry(RFP)の安定発現細胞(HeLa/RhoA/ERK)の2種類の細胞株をそれぞれ作製した。

以上の2種類の細胞株を用いた多重蛍光イメージングは、以下の手順で行った。まず、2種類の細胞株を混ぜ合わせて共培養の状態にした。翌日、細胞株にGPCR遺伝子とpuromycin耐性遺伝子を11:1の割合で共遺伝子導入した。この状態で1日培養した後、puromycinを添加してさらに2日間培養し、puromycin耐性を持つことで生存した細胞をGPCR発現細胞として観察した。観察前に、無血清培地で18~25時間培養してERK活性を基底状態にした上で多重蛍光イメージングを行った(図9)。



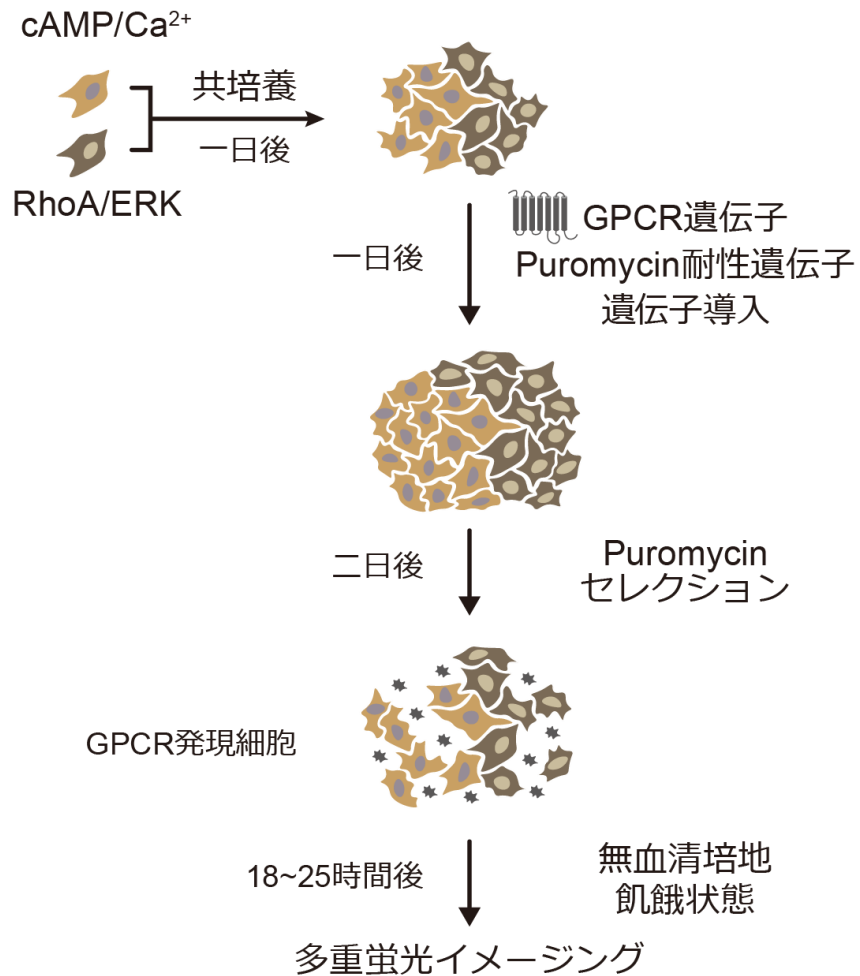


図9. 多重蛍光イメージングの共培養条件

2種類の細胞株を混ぜて一晩培養した後、GPCR遺伝子とpuromycin耐性遺伝子を同時に導入し、翌日からpuromycinで2日間セレクションした。セレクション後、細胞を血清飢餓状態にするために、無血清培地に交換し、観察前の18~25時間培養した細胞を用いて多重蛍光イメージングを行った。

### 3.3. DA受容体のシグナルダイナミクス

#### 3.3.1. DA受容体サブタイプごとのシグナルダイナミクス

DA受容体は、DRD1からDRD5までの5種類のGPCRサブタイプが知られており、DRD1およびDRD5が $G\alpha_s$ 共役型であり、DRD2、DRD3、そしてDRD4が $G\alpha_{i/o}$ 共役型である(図10)。脳内では、同じ $G\alpha$ タンパク質と共役するDA受容体でも、それぞれ別の役割を持っていることが示唆されている(Beaulieu and Gainetdinov, 2011)。しかしながら、同じ $G\alpha$ タンパク質と共役するGPCRサブタイプ間で、どのように異なる機能を生み出しているのかについては分かっておらず、ダイナミックエンコーディングによって異なるGPCRからの情報を異なるシグナルとして認識することで様々な機能を生み出している可能性を考えた。そこで、DA受容体のサブタイプごとのシグナルダイナミクスを調べるため、確立した多重蛍光イメージング法(図9)を用いてDA受容体サブタイプごとに4種類のシグナルを定量し、比較した。

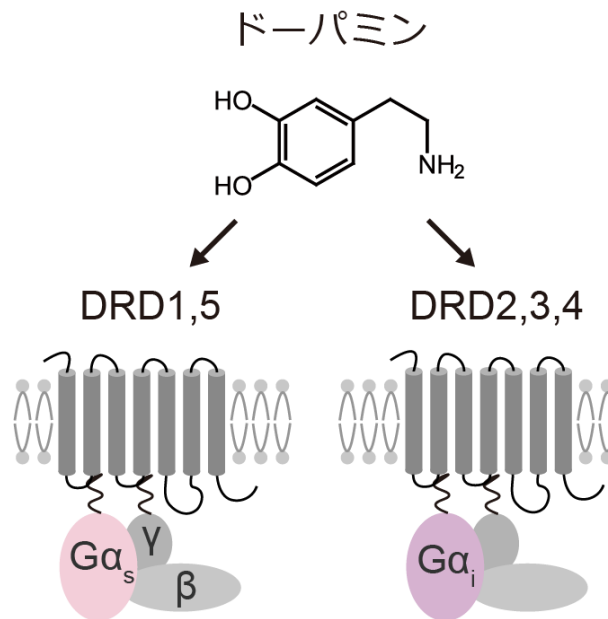


図10. DA受容体のサブタイプ

DA受容体は5種類のサブタイプが知られており、DRD1およびDRD5は $G\alpha_s$ 共役型、DRD2、DRD3、DRD4は $G\alpha_{i/o}$ 共役型の受容体である。

ここからは、多重蛍光イメージングによって観察したcAMP、Ca<sup>2+</sup>、RhoA、ERKの結果を順番に記述する。まず、DA刺激によるDA受容体サブタイプごとのcAMP応答のダイナミクスを調べた。それぞれのDA受容体の発現細胞を、開始5分後に10 μMのDAで刺激した。その結果、DRD1発現細胞とDRD5発現細胞について、DA刺激によってCFP/FRETが上昇した(図11)。両者ともGα<sub>s</sub>共役型であることから、Gα<sub>s</sub>タンパク質を介したcAMP合成が起こったことが示唆された。また、応答する細胞の中では、持続的なcAMP応答と一過的なcAMP応答の2種類のダイナミクスが見られた。一方で、DRD2、DRD3、DRD4の発現細胞はいずれもcAMP応答の変化が見られなかった。次に、サブタイプごとのCa<sup>2+</sup>応答を測定した。1つ1つの細胞に注目すると、DRD1発現細胞やDRD2発現細胞でパルス状に応答する細胞が見られたが、コントロールと比較すると、どのサブタイプもCa<sup>2+</sup>応答を示さなかった。次に、RhoA活性を測定した。DRD1発現細胞およびDRD2発現細胞では、ΔR/R<sub>0</sub>の10~20%程度の上昇が見られた。最後に、一部のDRD2発現細胞は最大50%程度のERK活性の上昇を示した(図11D)。一方でDRD1、DRD5、DRD3の発現細胞では、ERK活性の低下がみられた。また、DA受容体を発現させていないコントロール細胞でも、ERK活性の低下を示す細胞が見られた。DRD4発現細胞では、顕著なERK活性の変化を示すことはなかった。以上の実験から、DA受容体のサブタイプごとにシグナルダイナミクスの特徴を捉えることができた。DRD1およびDRD5は、cAMP濃度を上昇させる他に、RhoA活性を上昇させ、さらにERK活性を下げるということが分かった。一方で、DRD2はRhoA活性とERK活性の両方が上昇した。このように、同じGαタンパク質と共役することが知られているGPCRサブタイプ間でも、シグナルダイナミクスは多様なパターンを示すことがわかった。

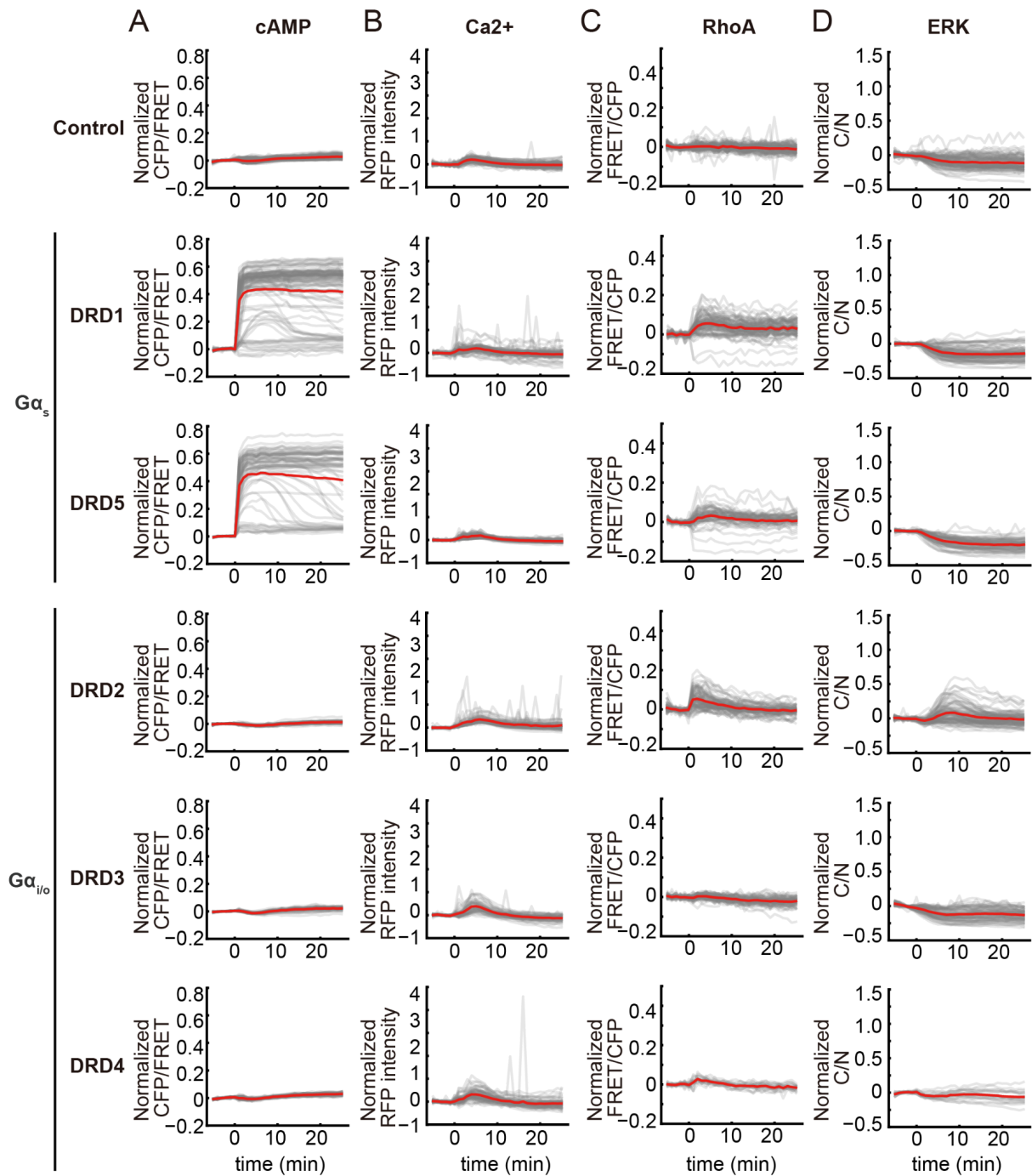


図11. DA受容体サブタイプ間のシグナルダイナミクス

コントロール、 $G\alpha_s$ 共役型DA受容体(DRD1、DRD5)、 $G\alpha_{i/o}$ 共役型DA受容体(DRD2、DRD3、DRD4)をそれぞれDA 10  $\mu$ M刺激した場合のシグナルダイナミクスを示す。それぞれ(A) cAMP濃度、(B)  $Ca^{2+}$ 濃度、(C) RhoA活性、(D) ERK活性の変化の時系列を示す。時系列は無刺激区間の平均値で規格化した。赤線は全細胞の $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ の平均値、灰色は個々の細胞の $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ を示す。実験は2回以上行い、cAMP応答および $Ca^{2+}$ 応答のイメージングでn

= 138(コントロール)、103(DRD1)、66(DRD5)、56(DRD2)、48(DRD3)、70(DRD4)の細胞を  
定量し、RhoA活性およびERK活性のイメージングでn = 90(コントロール)、89(DRD1)、62(  
DRD5)、86(DRD2)、66(DRD3)、19(DRD4)の細胞を定量した。

DRD4発現細胞では、4種類のいずれの下流シグナルも見られなかった。これらの結果が、DA受容体からのシグナル伝達が行われなかったためなのか、受容体が細胞膜上に発現しなかったためなのかを調べるため、5種類のDA受容体サブタイプについて細胞膜上のタンパク質と、細胞内の全タンパク質をそれぞれ免疫染色によって発現確認した(図12A)。GPCRと共発現したEGFPの発現量でGPCRのシグナルを規格化したところ、細胞表面での発現量は、DRD1とDRD4で特に高く、DRD5が最も低かった(図12B)。以上から、DRD4発現細胞のDRD4の膜移行そのものは行われており、その上でDA刺激による下流シグナルは観察できなかったと結論付けた。

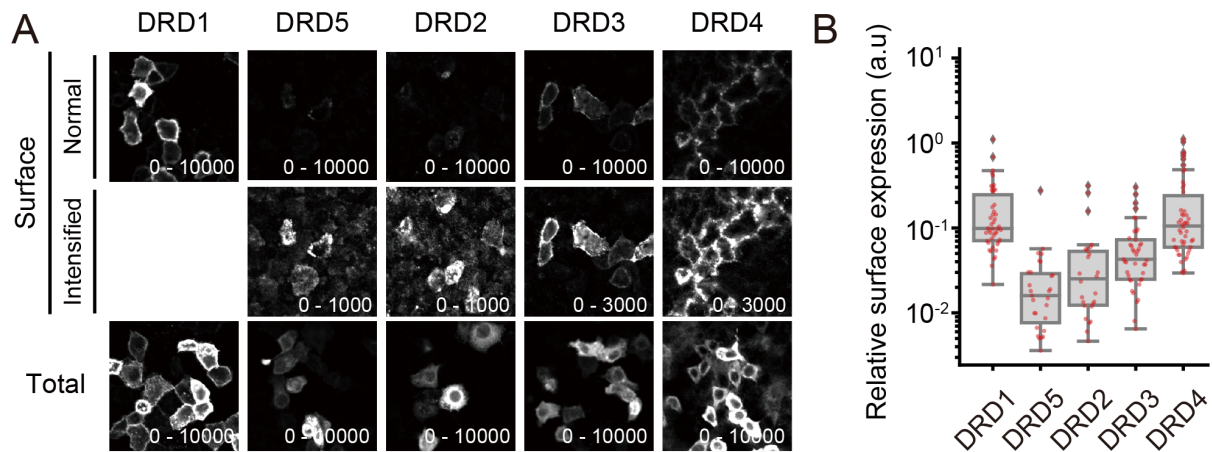


図12. DA受容体サブタイプの細胞表面の発現量の比較

(A) FLAGタグを用いた免疫染色を行った時のDA受容体サブタイプ間の比較を示す。細胞表面(surface)と細胞全体(total)の発現量を示す。細胞表面の発現量は、高いコントラスト(normal)または低いコントラスト(intensified)をそれぞれ表示し、低発現のGPCRを可視化した。(B) 細胞表面のDA受容体の発現量を比較するため、GPCR遺伝子と共にEGFP遺伝子を発現させ、EGFPの発現量で細胞表面のGPCR発現量を標準化した。赤いドットは1細胞ごとの発現量を示し、その分布図から箱ひげ図を示した。

### 3.3.2. DA受容体のヘテロダイマー

DA受容体はそれぞれ単体で発現して機能するが、サブタイプ同士でヘテロダイマーを形成することも報告されており、先行研究では、DRD1+DRD2やDRD2+DRD5などの組み合わせで、 $G\alpha_{q/11}$ タンパク質との共役を行うヘテロダイマーを形成するとされている(図13)(Hasbi et al., 2009; Perreault et al., 2014; Rashid et al., 2007)。

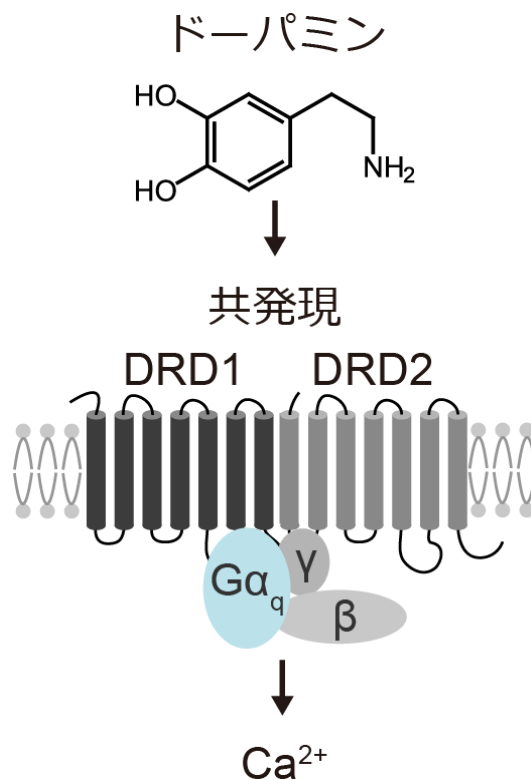


図13.DA受容体のヘテロダイマー

DA受容体はサブタイプ同士でヘテロダイマーを形成することが示唆されている。例えば、DRD1とDRD2はヘテロダイマーを形成し、さらに $G\alpha_{q/11}$ タンパク質と共役するようになることが報告されている。



そこで、異なるDA受容体サブタイプ同士を共発現させることで、Ca<sup>2+</sup>応答が起こるかどうかが検証するため、5種類のDA受容体サブタイプから2つ選択し、合計10通りの組み合わせで、それぞれ細胞に共発現させ、DA刺激を行い、Ca<sup>2+</sup>応答を定量した。しかし、いずれの組み合わせでも顕著なCa<sup>2+</sup>応答を示すことはなかった(図14)。さらに、DRD1発現細胞やDRD2発現細胞で見られたパルス状のCa<sup>2+</sup>応答も見られなくなった。Ca<sup>2+</sup>応答を観察できなかった理由として、実験に利用したPRESTO-TangoのGPCRコンストラクトの構造が原因の1つとして考えられる。このGPCRコンストラクトには、C末端にV2-tailなどのコンポーネントがいくつか繋がっており、GPCRのヘテロダイマー形成を阻害した可能性がある。

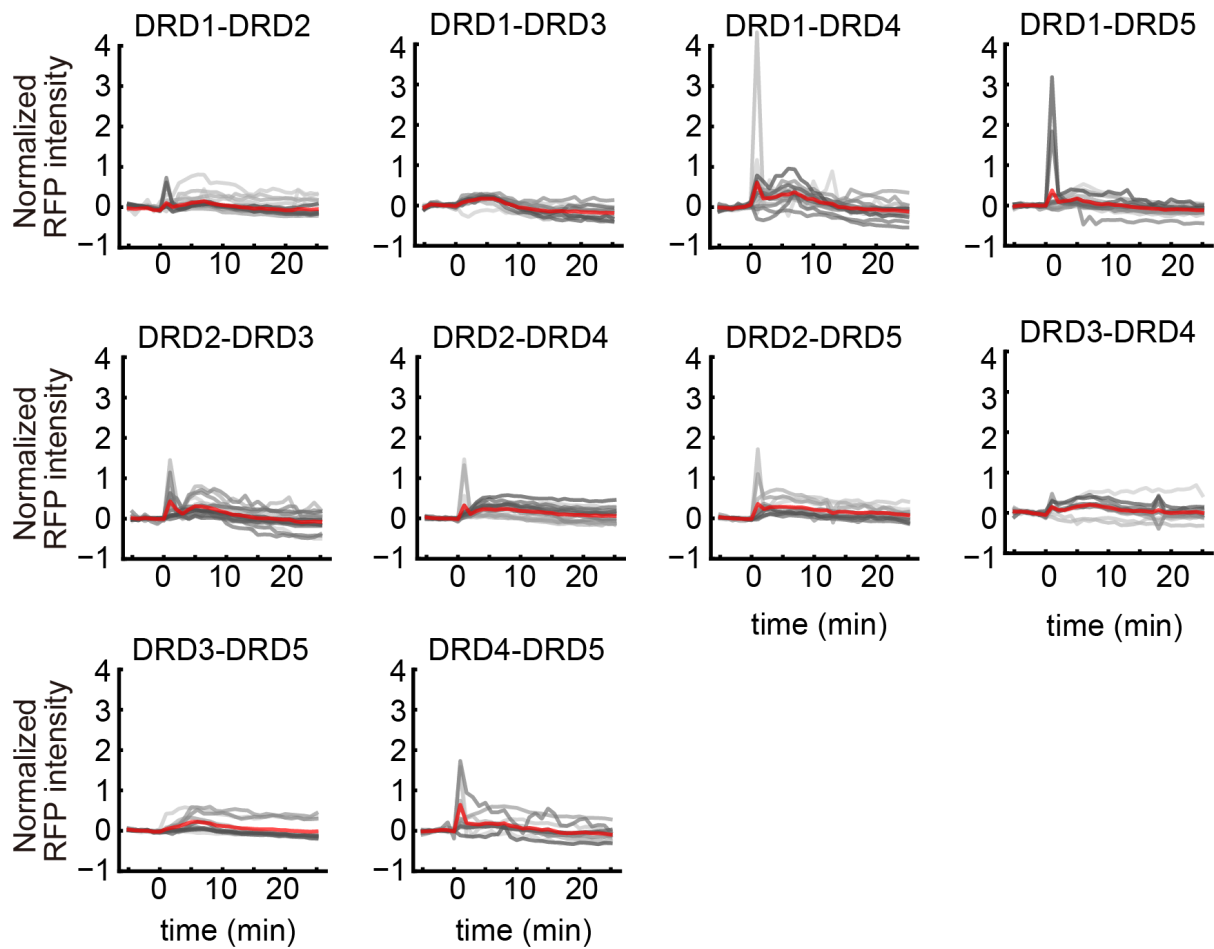


図14. 2種類のDA受容体サブタイプを共発現させた時のCa<sup>2+</sup>応答

DA受容体サブタイプから2種類ずつ、計10通りの組み合わせで共発現させた細胞へDA 10 μM 刺激した時のCa<sup>2+</sup>応答を示す。赤線は全細胞の $\Delta F/F_0$ の平均値、灰色は個々の細胞の $\Delta F/F_0$ を示す。実験は2回以上行い、合計10細胞以上を定量した。

### 3.4. 5-HT受容体のシグナルダイナミクス

GPCR型の5-HT受容体は、12種類のサブタイプが知られている。そのうち、HTR2A、HTR2B、HTR2Cは $G\alpha_{q/11}$ 共役型、HTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1E、HTR1F、HTR5は $G\alpha_{i/o}$ 共役型、HTR4、HTR6、HTR7は $G\alpha_s$ 共役型とされる(図15)。5-HT受容体は特にサブタイプ数の多いGPCRであるが、これら一つ一つがそれぞれ固有の機能を持っていると考えられている(Pytliak et al., 2011)。これら12種類の5-HT受容体サブタイプをそれぞれ発現させ、各シグナル応答を定量した。

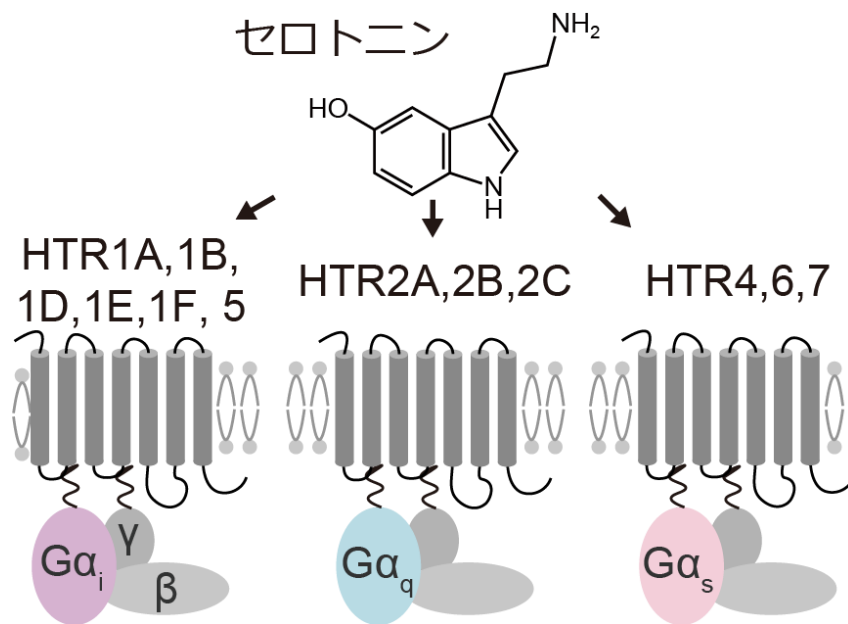


図15. GPCR型の5-HT受容体のサブタイプ

GPCR型の5-HT受容体サブタイプを以下に示す。 $G\alpha_{i/o}$ 共役型はHTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1E、HTR1F、HTR5の6種類が知られる。 $G\alpha_{q/11}$ 共役型はHTR2A、HTR2B、HTR2Cの3種類が知られる。 $G\alpha_s$ 共役型はHTR4、HTR6、HTR7の3種類が知られる。

### 3.4.1. $G\alpha_{q/11}$ 共役型の5-HT受容体

まず、 $G\alpha_{q/11}$  共役型の5-HT受容体(HTR2A、HTR2B、HTR2C)について、cAMP応答を測定したが、いずれのサブタイプでも、cAMP濃度の上昇は見られなかった(図16A)。次に、 $Ca^{2+}$  応答をそれぞれ測定した(図16B)。HTR2A発現細胞では、全細胞の $\Delta F/F_0$ の平均値は、コントロールと比較してほぼ変わらなかった。しかし、1細胞に着目すると、応答しない、または応答の弱い細胞、パルス状の応答を示す細胞、応答が持続的な細胞が見られた。HTR2B発現細胞では、 $Ca^{2+}$  応答を示す細胞は見られなかった。そして、HTR2C発現細胞では、いくつかパルス状の $Ca^{2+}$  応答を示す細胞が見られ、HTR2Aのように持続的な $Ca^{2+}$  応答を示す細胞は見られなかった。次に、RhoA活性を測定すると、HTR2A発現細胞では、最大で40%程度の $\Delta R/R_0$ の上昇を示す細胞が見られた(図16C)。また、RhoA活性の上昇は、リガンド刺激からおよそ5分程度でピークを迎え、そこから徐々に減少する、一過的なダイナミクスを示した。HTR2B発現細胞およびHTR2C発現細胞では、顕著なRhoA活性の上昇は観察されなかった。最後に、ERK活性を測定した(図16D)。HTR2A発現細胞では、5-HT刺激後に一旦ERK活性が低下し、その後一過的に上昇するというダイナミクスを示した。HTR2B発現細胞では、5-HT刺激によるERK活性の変化は見られなかった。HTR2C発現細胞では、一過的なERKの活性化を示す細胞が見られた。

以上から、HTR2A発現細胞では、 $Ca^{2+}$  応答、RhoA活性化、ERK活性化が見られた。また、HTR2C発現細胞では、 $Ca^{2+}$  応答のみが見られた。そして、HTR2B発現細胞では、いずれのシグナルダイナミクスも見られなかった。さらに、 $Ca^{2+}$  応答のダイナミクスを比較すると、HTR2Aは持続的な応答とパルス状の応答、HTR2Cはパルス状の応答のみをそれぞれ示すことが分かった。

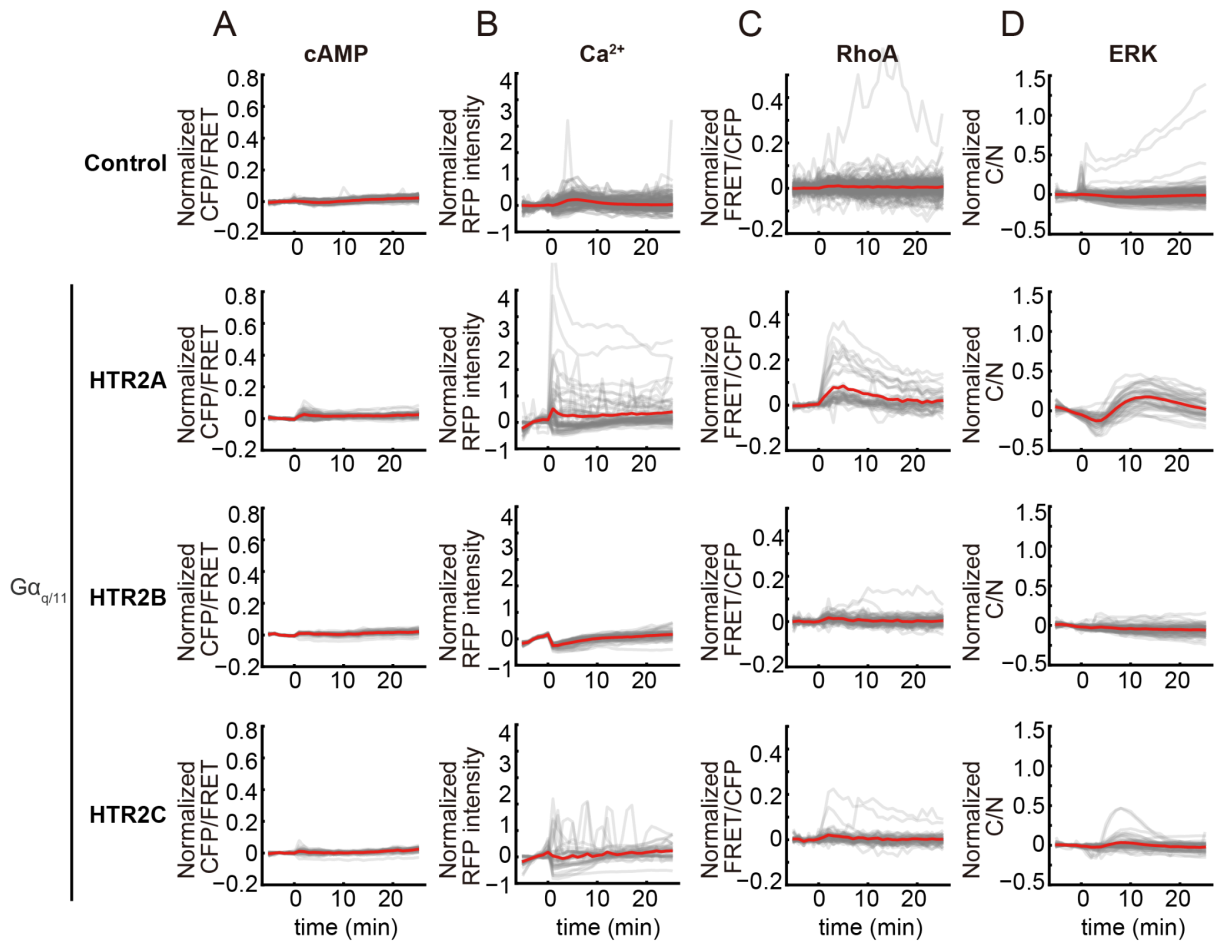


図16.  $G\alpha_{q/11}$ 共役型5-HT受容体のサブタイプ間のシグナルダイナミクスの比較

5-HT受容体サブタイプのうち、 $G\alpha_{q/11}$ 共役型とされるHTR2A、HTR2B、HTR2Cのシグナルダイナミクスを示す。それぞれ(A) cAMP濃度、(B)  $Ca^{2+}$ 濃度、(C) RhoA活性、(D) ERK活性の時系列を示す。時系列は無刺激区間の平均値で規格化した。赤線は全細胞の $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ の平均値、灰色は個々の細胞の $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ を示す。実験は2回以上行い、cAMP応答および $Ca^{2+}$ 応答のイメージングで $n = 262$ (コントロール)、63(HTR2A)、52(HTR2B)、33(HTR2C)の細胞を定量し、RhoA活性およびERK活性のイメージングで $n = 284$ (コントロール)、39(HTR2A)、67(HTR2B)、48(HTR2C)の細胞を定量した。

HTR2B発現細胞では、5-HT刺激によるCa<sup>2+</sup>応答は見られなかった。また、他のバイオセンサーについても応答は見られなかった。この結果について、HTR2Bの発現量の低さが影響しているか調べるため、免疫染色を行い、Gα<sub>q/11</sub>共役型の5-HT受容体サブタイプ間の発現量を比較した(図17A)。細胞表面の発現量は、HTR2Aが最も高く、HTR2Cが最も低かった(図17B)。少なくとも細胞表面に発現しているが、5-HT刺激には応答しなかったと判断した。一方、HTR2Cはほとんど細胞表面に発現していないように見えるが、Ca<sup>2+</sup>のパルス状の応答を示したため、5-HT刺激に応答するために十分な量の発現があると判断した。

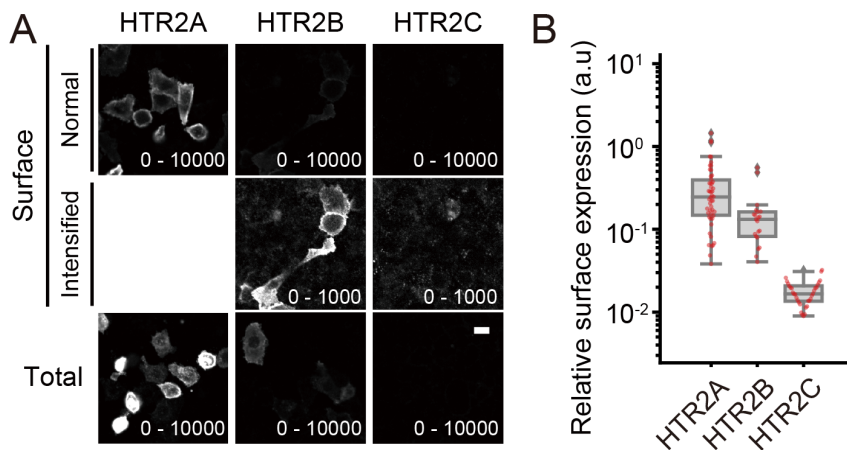


図17.  $G\alpha_{q/11}$ 共役型5-HT受容体サブタイプの細胞表面の発現量の比較

(A) FLAGタグを用いた免疫染色を行った時の $G\alpha_{q/11}$ 共役型の5-HT受容体サブタイプ間の比較を示す。細胞表面(surface)と細胞全体(total)の発現量を示す。細胞表面の発現量は、高いコントラスト(normal)または低いコントラスト(intensified)をそれぞれ表示し、低発現のGPCRを可視化した。(B) 細胞表面の $G\alpha_{q/11}$ 共役型の5-HT受容体の発現量を比較するため、GPCR遺伝子と共にEGFP遺伝子を発現させ、EGFPの発現量で細胞表面のGPCR発現量を標準化した。赤丸は1細胞ごとの発現量を示し、その分布図から箱ひげ図を書いた。

### 3.4.2. $G\alpha_{i/o}$ 共役型の5-HT受容体

$G\alpha_{i/o}$ 共役型の5-HT受容体(HTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1E、HTR1F、HTR5)のシグナルダイナミクスを調べた。まず、cAMP応答を測定したが、cAMP濃度の変化は見られなかった(図18A)。 $Ca^{2+}$ 応答を測定すると、HTR1B発現細胞では、パルス状の $Ca^{2+}$ 応答を示す細胞が見られた(図18B)。また、HTR1A発現細胞では一過的な $Ca^{2+}$ 応答を示す細胞、HTR1D発現細胞ではHTR1B発現細胞よりも微弱なパルス状の $Ca^{2+}$ 応答を示す細胞が見られた。次に、RhoA活性を測定した。HTR1A発現細胞、HTR1B発現細胞およびHTR1D発現細胞で、最大で10%程度の $\Delta R/R_0$ の上昇が見られた(図18C)。いずれも、RhoA活性の上昇のダイナミクスは一過的であった。最後に、ERK活性の変化を測定した(図18D)。HTR1A発現細胞は、一過的なERKの活性化を示した。HTR1B発現細胞でも緩やかにERKが活性化する細胞が見られ、最大で20%程度上昇した。



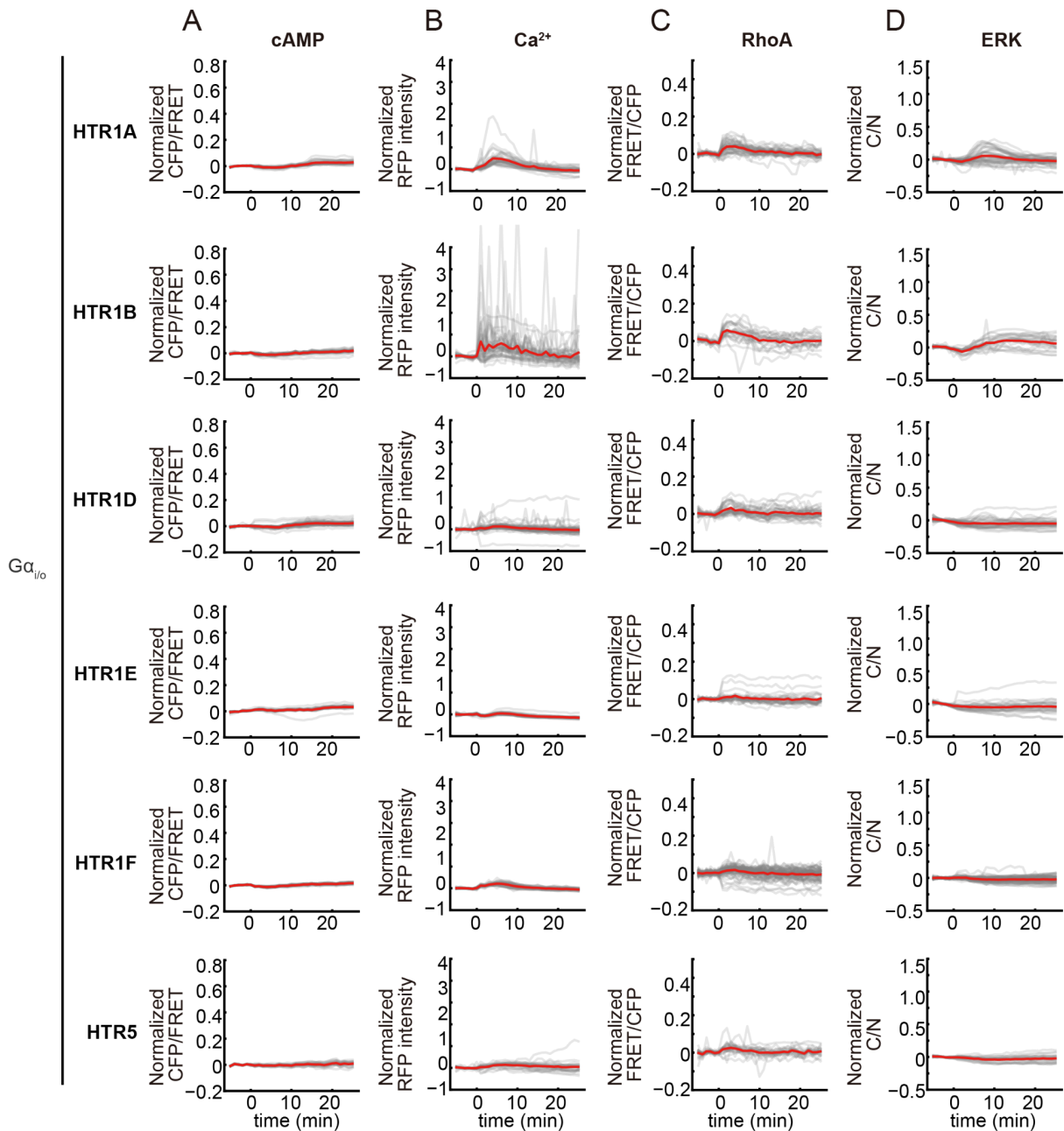


図18.  $G\alpha_{i/o}$ 共役型5-HT受容体のサブタイプ間のシグナルダイナミクスの比較

5-HT受容体サブタイプのうち、 $G\alpha_{i/o}$ 共役型とされるHTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1E、HTR1F、HTR5のシグナルダイナミクスを示す。それぞれ(A) CFP/FRET、(B) 赤色蛍光、(C) FRET/CFP、(D) C/Nの変化の時系列を示す。時系列は無刺激区間の平均値で規格化した。赤線は全細胞の $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ の平均値、灰色は個々の細胞の $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ を示す。実験は2回以上行い、cAMP応答および $Ca^{2+}$ 応答のイメージングでn = 34 (HTR1A)、41 (HTR1B)、79 (HTR1D)、26 (HTR1E)、31 (HTR1F)、24 (HTR5)の細胞を定量し、RhoA活性および

ERK活性のイメージングでn = 42(HTR1A)、23(HTR1B)、33(HTR1D)、28(HTR1E)、73(HTR1F)、24(HTR5)の細胞を定量した。

HTR1E発現細胞、HTR1F発現細胞、およびHTR5発現細胞では、いずれも顕著なシグナル応答を観察できなかった。GPCR発現量の違いによる結果であるかを調べるため、 $G\alpha_{i/o}$ 共役型の5-HT受容体サブタイプ間の発現量を免疫染色により比較した(図19A)。細胞表面の発現量はHTR1EとHTR5が特に高く、HTR1Fが最も低かった(図19B)。いずれのサブタイプも細胞表面に発現していることから、HTR5発現細胞にシグナルダイナミクスが見られなかったのは、発現量が低いためではないことが示唆された。一方で、HTR1F発現細胞は発現量が低かったため、5-HT刺激によるシグナルダイナミクスが見られなかった可能性がある。

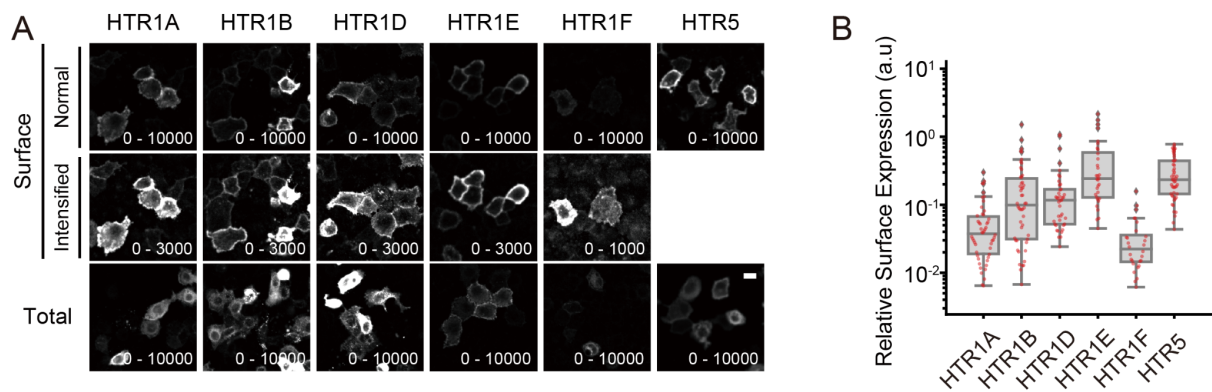


図19.  $G\alpha_{i/o}$ 共役型5-HT受容体サブタイプの細胞表面の発現量の比較

(A) FLAGタグを用いた免疫染色を行った時の $G\alpha_{i/o}$ 共役型の5-HT受容体サブタイプ間の比較を示す。細胞表面(surface)と細胞全体(total)の発現量を示す。細胞表面の発現量は、高いコントラスト(normal)または低いコントラスト(intensified)をそれぞれ表示し、低発現のGPCRを可視化した。(B) 細胞表面の $G\alpha_{i/o}$ 共役型の5-HT受容体の発現量を比較するため、GPCR遺伝子と共にEGFP遺伝子を発現させ、EGFPの発現量で細胞表面のGPCR発現量を標準化した。赤丸は1細胞ごとの発現量を示し、その分布図から箱ひげ図を書いた。

### 3.4.3. $G\alpha_s$ 共役型の5-HT受容体

$G\alpha_s$ 共役型の5-HT受容体サブタイプ(HTR4、HTR6、HTR7)の下流シグナルのダイナミクスを比較したところ、3種類全てのサブタイプの発現細胞でcAMP応答が見られた(図**20A**)。HTR7発現細胞と比較すると、HTR4発現細胞およびHTR6発現細胞ではcAMPの応答の小さい、または応答のない細胞が見られた。先行研究では、HTR4とHTR6共に恒常活性があることが示されており、このために刺激前からcAMP濃度の高い細胞があったと考えられる(Bockaert et al., 2021; Pytliak et al., 2011)。次に、これら3種類のサブタイプの $Ca^{2+}$ 応答を測定した(図**20B**)。HTR4発現細胞では、ごく少数の細胞で、 $Ca^{2+}$ 応答が見られた。さらに、HTR6発現細胞では、一部の細胞でパルス状の $Ca^{2+}$ 応答が見られた。HTR7発現細胞では、 $Ca^{2+}$ 応答を示す細胞は見られなかった。また、RhoA活性を測定すると、いずれのサブタイプでもRhoAを活性化させることが分かった(図**20C**)。特に、HTR4発現細胞によるRhoAの活性化が大きく、最大30%のRhoA活性の上昇を測定した。ERK活性の変化は同じ $G\alpha_s$ 共役型セロトニン受容体ごとに異なっていた(図**20D**)。HTR4発現細胞では、細胞によってERK活性が上昇する場合と減少する場合がある。HTR7発現細胞はERK活性が減少する細胞のみ見られた。そして、HTR6発現細胞はERK活性に影響を与えなかった。

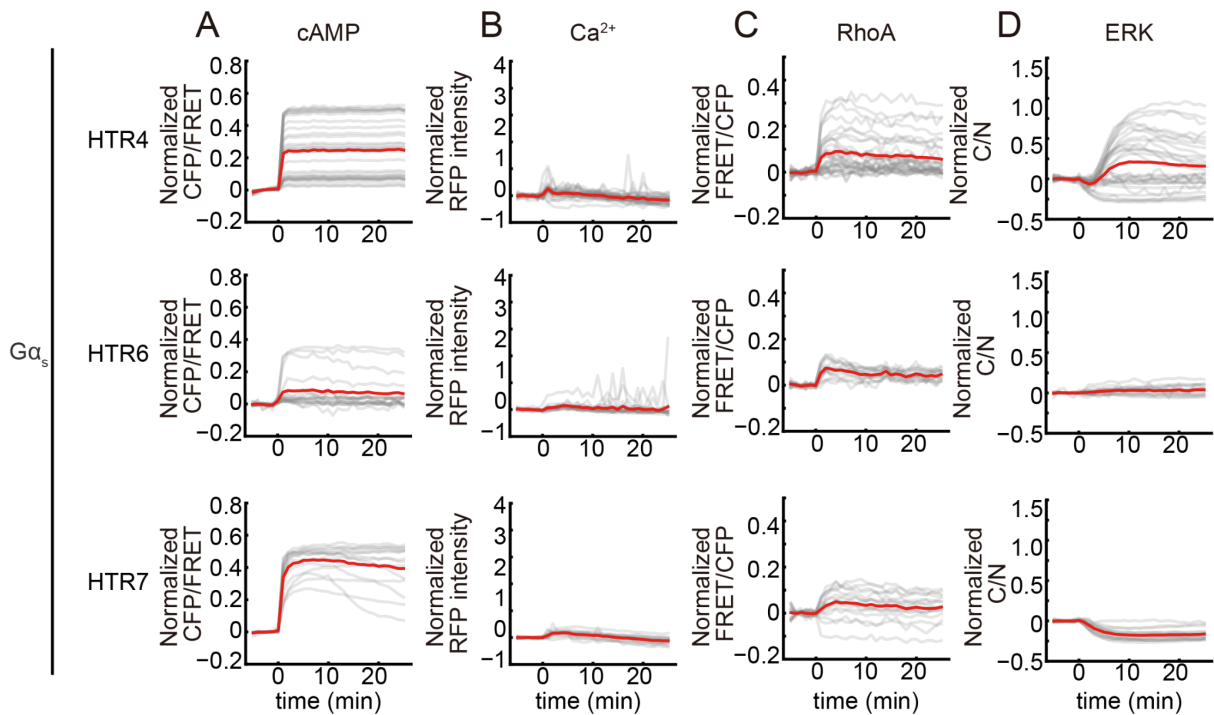


図20.  $G\alpha_s$ 共役型5-HT受容体のサブタイプ間のシグナルダイナミクスの比較

5-HT受容体サブタイプのうち、 $G\alpha_s$ 共役型とされるHTR4、HTR6、HTR7のシグナルダイナミクスを示す。それぞれ(A) CFP/FRET、(B) 赤色蛍光、(C) FRET/CFP、(D) C/Nの変化の時系列を示す。時系列は無刺激区間の平均値で規格化した。赤線は全細胞の $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ の平均値、灰色は個々の細胞の $\Delta R/R_0$ または $\Delta F/F_0$ を示す。実験は2回以上行い、cAMP応答および $Ca^{2+}$ 応答のイメージングで $n = 30$  (HTR4)、 $18$  (HTR6)、 $14$  (HTR7)の細胞を定量し、RhoA活性およびERK活性のイメージングで $n = 31$  (HTR4)、 $15$  (HTR6)、 $16$  (HTR7)の細胞を定量した。

この3種類のGPCRサブタイプ間では、同じGα<sub>s</sub>タンパク質と共役するが、特にcAMP応答やERK活性のダイナミクスがいずれも異なっていた。これらダイナミクスの違いが、それぞれのGPCR発現量に起因するのかを調べた。免疫染色を行うと、HeLa細胞については、いずれのGα<sub>s</sub>共役型の5-HT受容体サブタイプも細胞表面で発現していることが分かった(図21A)。サブタイプ間では、HTR7の細胞表面の発現量が最も高く、HTR4が最も低かった(図21B)。

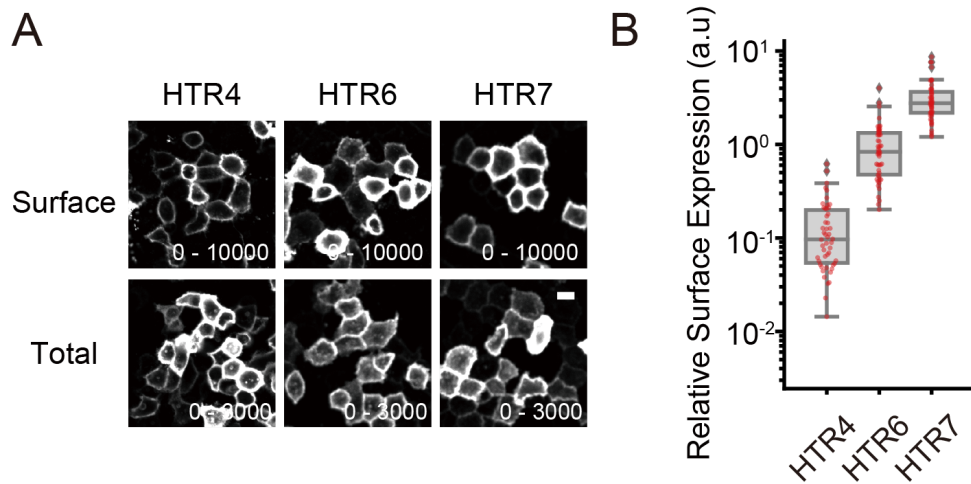


図21.  $G\alpha_s$ 共役型5-HT受容体サブタイプの細胞表面の発現量の比較

(A) FLAGタグを用いた免疫染色を行った時の $G\alpha_s$ 共役型の5-HT受容体サブタイプ間の比較を示す。細胞表面(surface)と細胞全体(total)の発現量を示す。細胞表面の発現量は、高いコントラスト(normal)または低いコントラスト(intensified)をそれぞれ表示し、低発現のGPCRを可視化した。(B) 細胞表面の $G\alpha_s$ 共役型の5-HT受容体の発現量を比較するため、GPCR遺伝子と共にEGFP遺伝子を発現させ、EGFPの発現量で細胞表面のGPCR発現量を標準化した。赤丸は1細胞ごとの発現量を示し、その分布図から箱ひげ図を書いた。



イメージング開始時点のHTR4発現細胞およびHTR6発現細胞を見ると、5-HT刺激を行う前から既に細胞内cAMP濃度が高い細胞が見られ、GPCRの恒常活性が起こっていることが示唆された(図22A)。また、この状態のHTR4発現細胞に5-HT刺激を行うと、最終的なcAMP濃度のピークは細胞間で揃うことが分かった(図22B)。一方で、HTR6発現細胞では、5-HT刺激によって上昇するcAMP濃度のピークが揃わないことが分かった。HTR7発現細胞では、始めから高いcAMP濃度の細胞が見られなかった。また5-HT刺激を行うと、持続的なcAMP濃度の上昇を示す細胞と一過的なcAMP濃度の上昇を示す細胞が見られた。

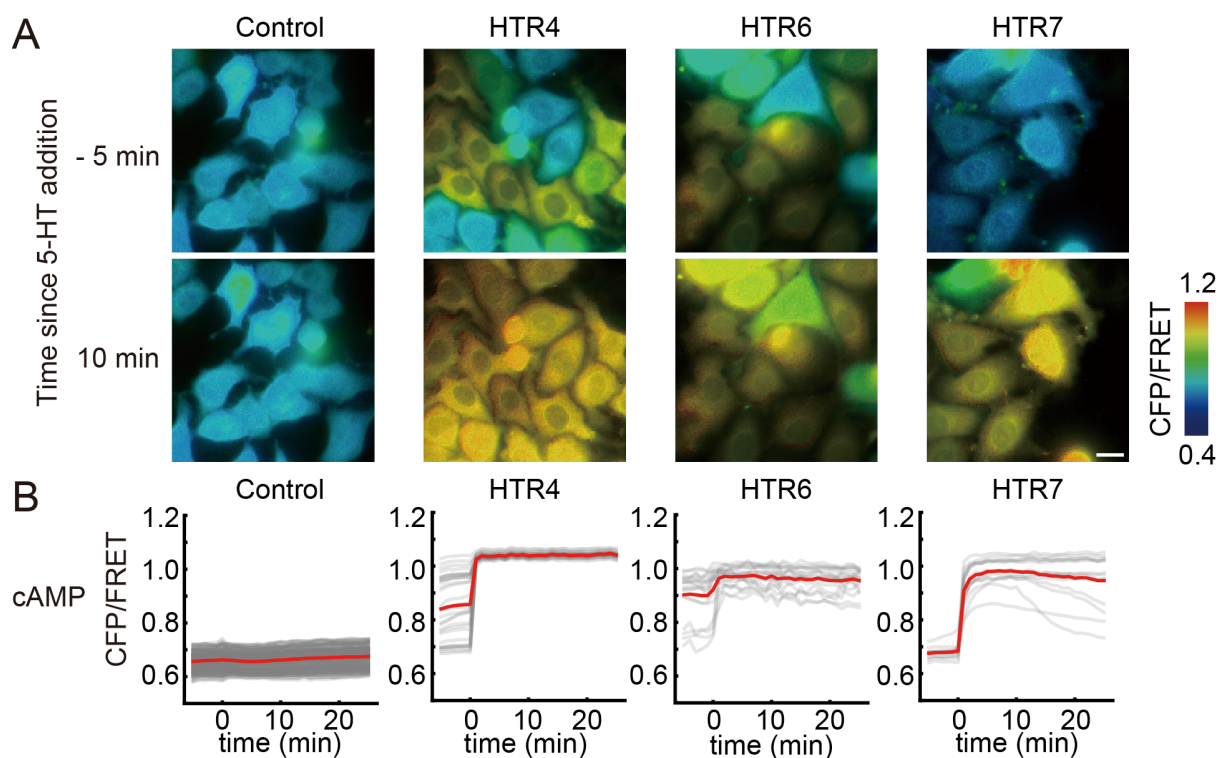


図22.  $G\alpha_s$ 共役型5-HT受容体の恒常活性

(A) コントロール細胞、HTR4、HTR6、HTR7の発現細胞の刺激前(-5分)および刺激後(10分)のCFP/FRET比を示す。(B) 規格化していないCFP/FRETの変化の時系列を示す。0分時点で5-HT 10  $\mu$ M刺激を行っている。赤線は全細胞の $\Delta R/R_0$ の平均値、灰色は個々の細胞の $\Delta R/R_0$ を示す。

### 3.5. シグナルダイナミクスのクラスタリング解析

ここまで、HeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup>とHeLa/RhoA/ERKを用いて、DA受容体および5-HT受容体の下流シグナルの網羅的な解析を行った。これにより、シグナルダイナミクスは一様ではなく、GPCRごとに特有のダイナミクスを示す傾向があることが分かった。そこで次に、K-meansクラスタリングを用いて、ダイナミクスのパターンを分類した。その際、cAMP、Ca<sup>2+</sup>、RhoA、ERKの4種類の下流シグナルの定量データをそれぞれ分け、下流シグナルごとに全ての定量データを集めてK-meansクラスタリングを行い、時系列データを分類した。

#### 3.5.1. cAMP応答のシグナルダイナミクスの分類

異なるダイナミクスのクラスターを可能な限り多く分類するため、クラスターの数を2~4まで変更してそれぞれクラスタリングしたところ、クラスター数が4の時のCluster 2とCluster 4がほぼ違いのないダイナミクスを示した(図23)。

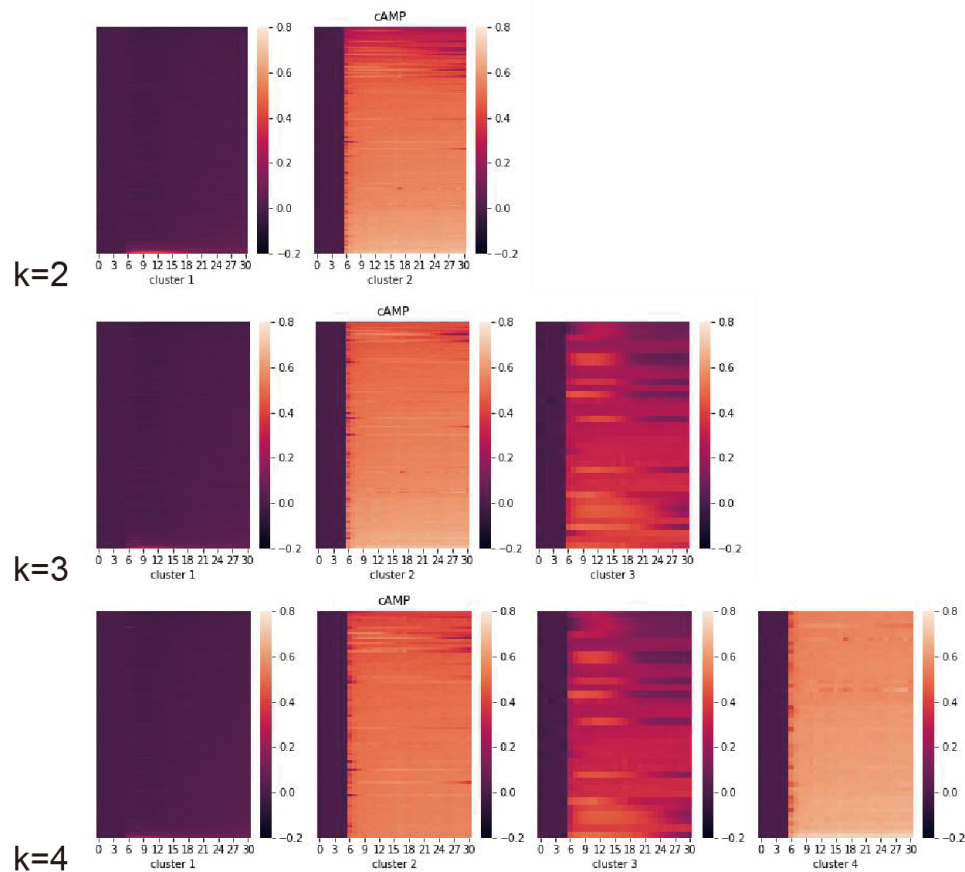
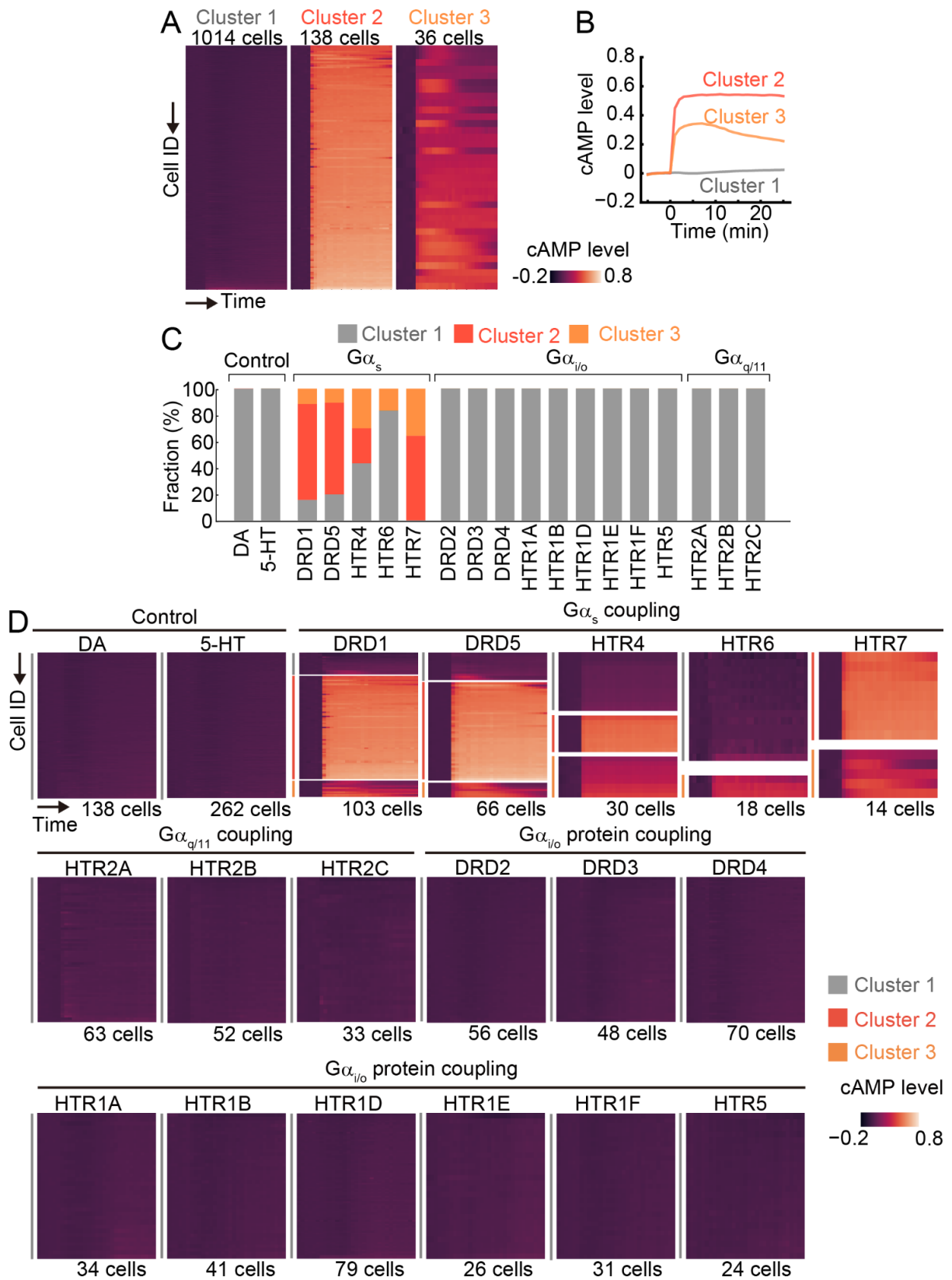


図23. cAMP応答のK-meansクラスタリング

クラスター数(k)が2~4の場合の各クラスターの時系列ヒートマップを示す。

そこで、クラスター数を3に設定し、cAMP応答の時系列データを分類した(図24A)。その結果、ほぼcAMP応答のないCluster 1、一度上昇してから高いcAMP濃度を維持するCluster 2、そして一過的にcAMP濃度が上昇し、徐々に低下するCluster 3に分かれた(図24B)。定量した細胞の多くはCluster 1に属した。cAMP応答を示す細胞は、Cluster 2とCluster 3でおよそ4:1に分かれ、応答する多くの細胞が持続的なcAMP応答であることが示唆された。また、GPCRごとにクラスターを割合で示し(図24C)、それぞれの細胞の時系列をヒートマップで示した(図24D)。これにより、cAMP応答が見られるのは、 $G\alpha_s$ 共役型のGPCR群でのみ見られることが分かった。DRD1、DRD5、HTR7では、Cluster 2に分類される細胞がCluster 3よりも多く、HTR4は3種類のクラスターにほぼ均等に分かれた。HTR6は他の $G\alpha_s$ 共役型GPCRと比べて、cAMP応答を示す細胞が少数であり、Cluster 2に属する細胞は1つも見られなかった。



**図24. K-meansクラスタリングによるcAMP応答の分類**

(A) 時系列K-meansクラスタリングにより3種類のクラスターに分類されたcAMP応答の時系列ヒートマップを示す。(B) 各クラスターの平均値のダイナミクスを示す。(C) GPCRを発現させていないコントロール細胞(DAまたは5-HT)、DA受容体および5-HT受容体のcAMP応答のクラスターの割合を示す。(D) 1細胞ごとの規格化したcAMP応答の時系列( $\Delta R/R_0$ )をヒートマップにより示した。

### 3.5.2. Ca<sup>2+</sup>応答のシグナルダイナミクスの分類

cAMP応答のデータ同様に、クラスター数が4の時、Cluster 1とCluster 3でほぼ違いのないダイナミクスが分類された(図25)。

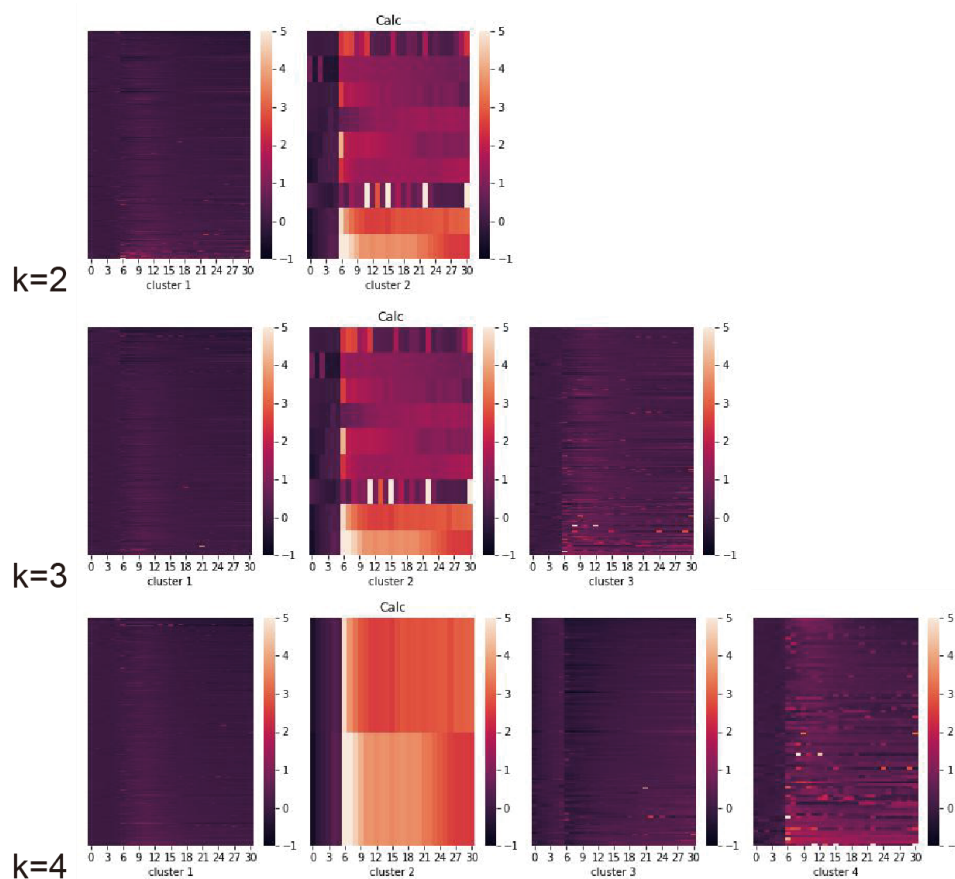


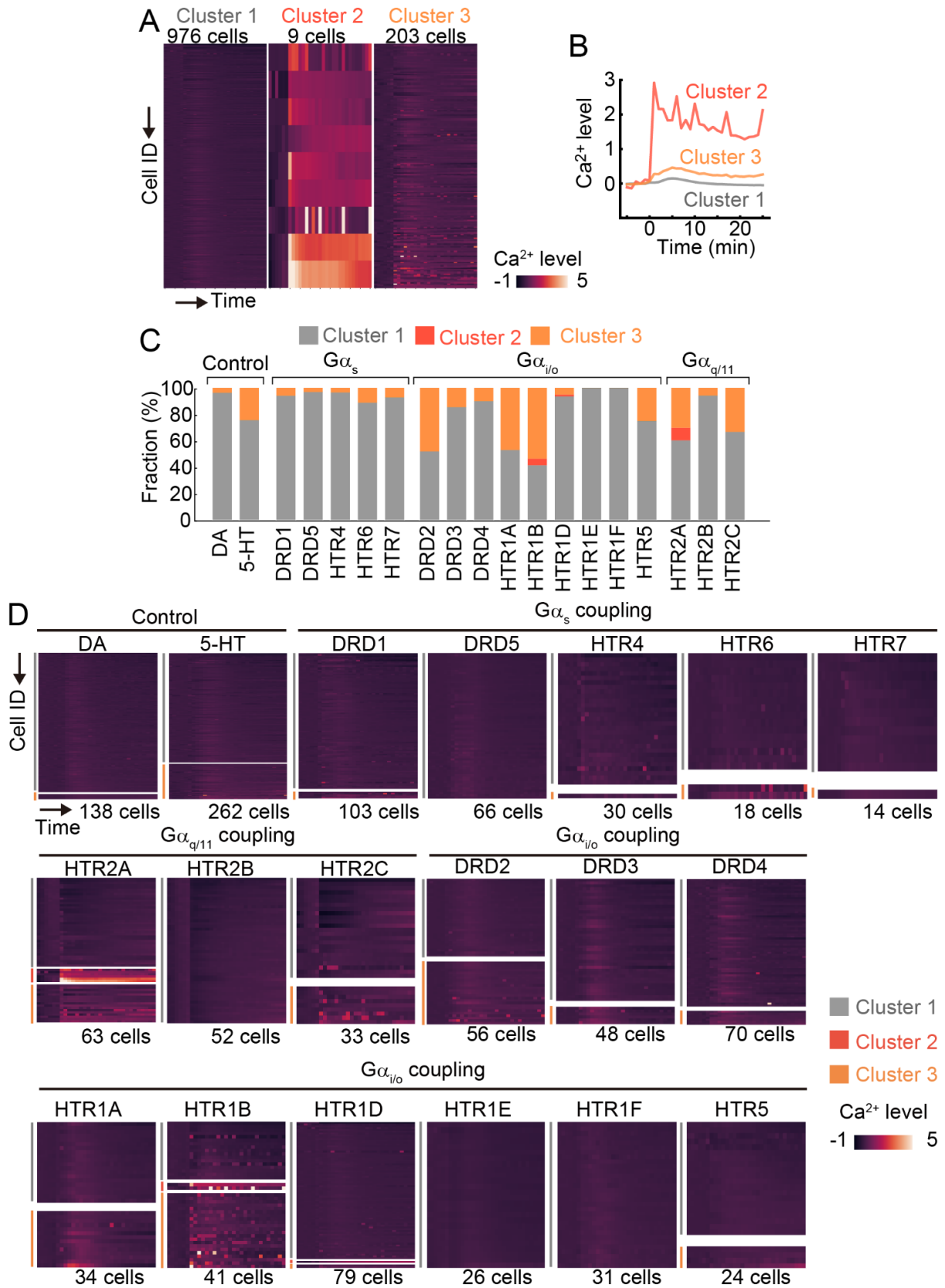
図25. Ca<sup>2+</sup>応答のK-meansクラスタリング

クラスター数(k)が2~4の場合の各クラスターの時系列ヒートマップを示す。

そこで、クラスター数を3に設定し、Ca<sup>2+</sup>応答の時系列データを分類した(図26A)。その結果、ほぼCa<sup>2+</sup>濃度が変化しないCluster 1、パルス状または持続的な強いCa<sup>2+</sup>応答を示すCluster 2、そして微弱なCa<sup>2+</sup>応答を示すCluster 3に分かれた(図26B)。応答する細胞の多くはCluster 3に属し、Cluster 2はごく一部の細胞で見られた。また、GPCRごとにクラスターを分類して示した(図26C)。さらに、それぞれの時系列をヒートマップで示した(図26D)。Gα<sub>q/11</sub>共役型GPCRだけでな

く、 $G\alpha_{i/o}$ 共役型GPCRでも $Ca^{2+}$ 応答を示す細胞(cluster 3)が見られた。一方で、 $G\alpha_s$ 共役型GPCRはいずれも $Ca^{2+}$ 応答を示す細胞がほとんどないことがわかった。比較的強い $Ca^{2+}$ 応答を示すcluster 2に分類された細胞は、HTR1B発現細胞とHTR2A発現細胞のみで見られた。HTR1E発現細胞およびHTR1F発現細胞では、 $Ca^{2+}$ 応答を示す細胞が全く見られなかった。





**図26. K-meansクラスタリングによるCa<sup>2+</sup>応答の分類**

(A) 時系列K-meansクラスタリングにより3種類のクラスターに分類されたCa<sup>2+</sup>応答の時系列ヒートマップを示す。(B) 各クラスターの平均値のダイナミクスを示す。(C) GPCRを発現させていないコントロール細胞(DAまたは5-HT)、DA受容体および5-HT受容体のCa<sup>2+</sup>応答のクラスターの割合を示す。(D) Cで説明したクラスター分類の細胞ごとのCa<sup>2+</sup>応答の時系列をヒートマップを用いて表した。ヒートマップは $\Delta F/F_0$ で示した。ヒートマップは、コントロール(DAまたは5-HT)、G $\alpha_s$ 共役型、G $\alpha_{q/11}$ 共役型、G $\alpha_{i/o}$ 共役型のGPCRで分類している。

### 3.5.3. RhoA活性のシグナルダイナミクスの分類

RhoA活性の時系列データ全体では、クラスター数を3つとした場合、Cluster 1とCluster 2がほぼ違いのないクラスターとなったため(図27A)、RhoA活性はクラスター数を2つとしたK-meansクラスタリングを行い、分類した(図28A)。

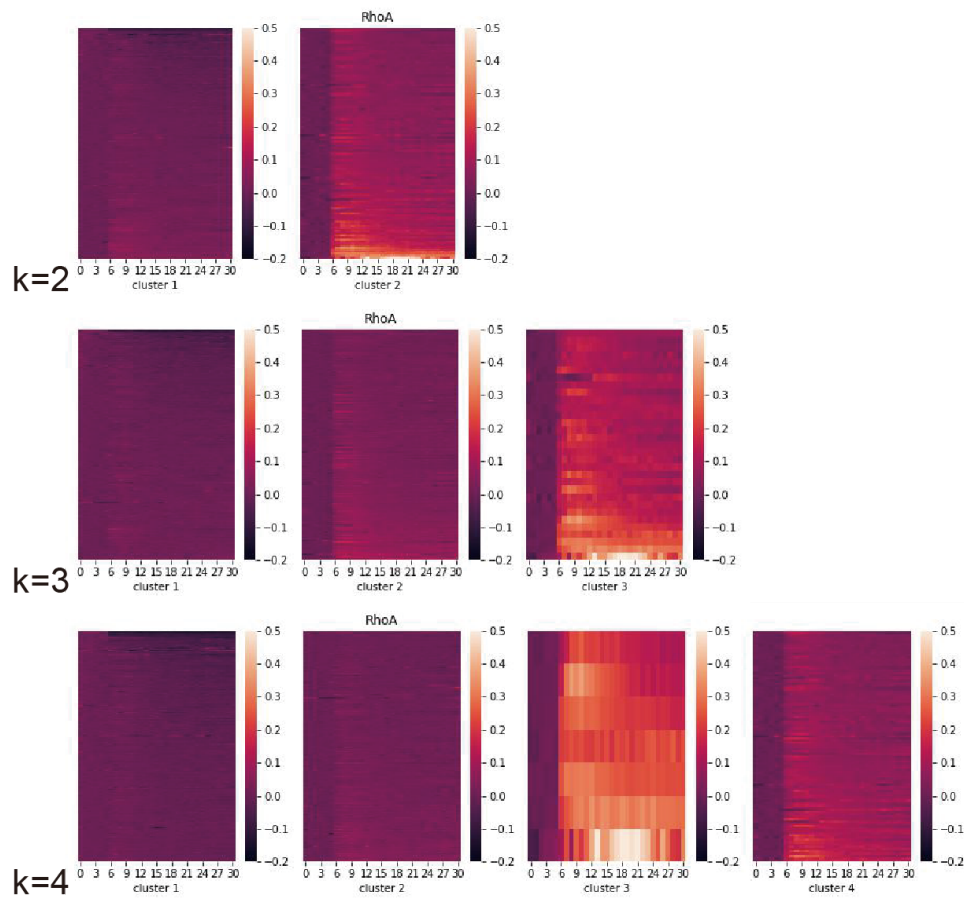
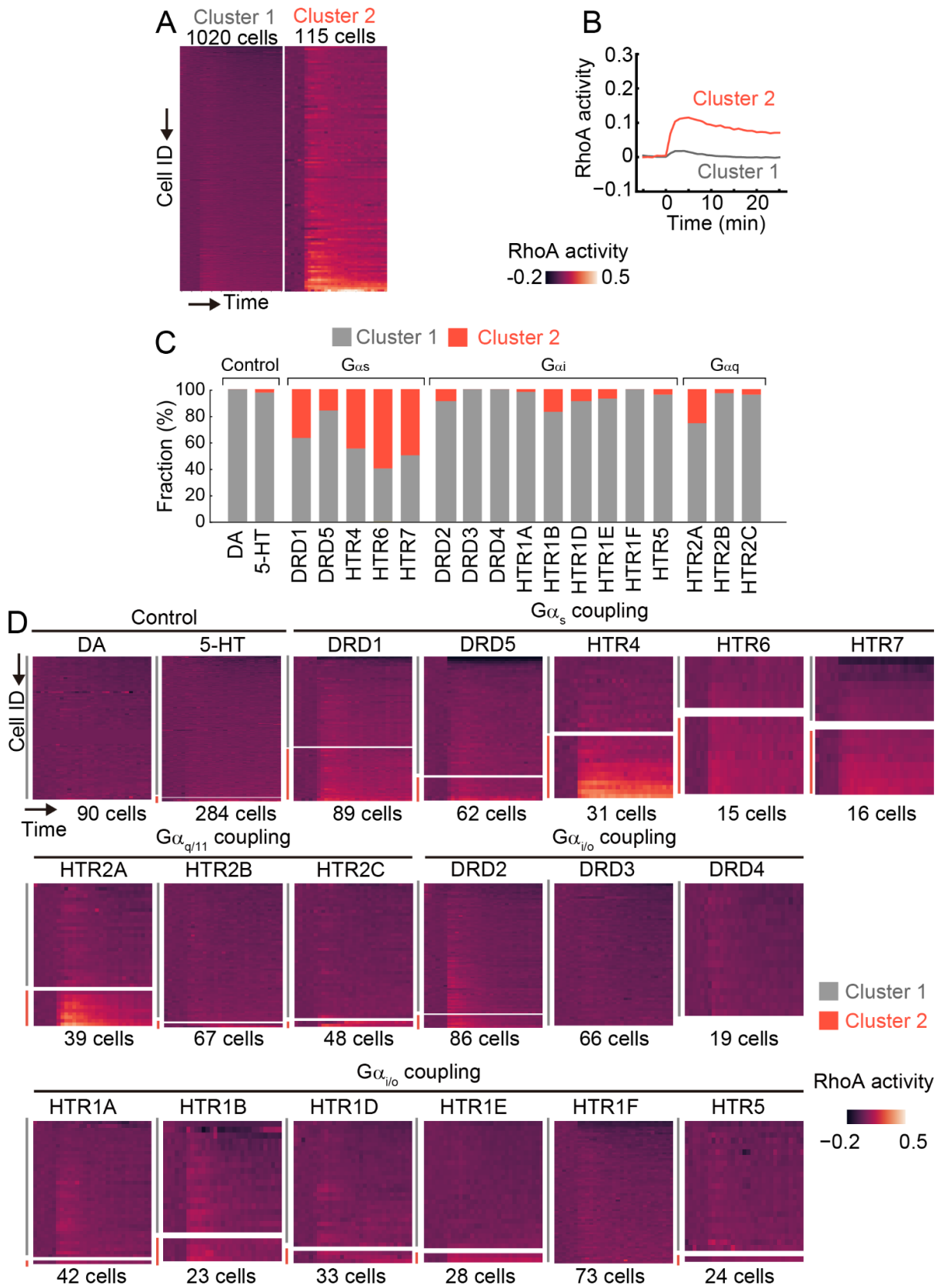


図27. RhoA活性のK-meansクラスタリング

クラスター数(k)が2~4の場合の各クラスターの時系列ヒートマップを示す。

その結果、RhoA活性がほぼ変化しないCluster 1と、活性化を示すCluster 2に分かれた(図28B)。また、定量したGPCRごとにクラスター进行分类して示した(図28C)。さらに、それぞれの時系列をヒートマップで示した(図28D)。共役するGαタンパク質のサブファミリー間で比較すると、

Gα<sub>s</sub>共役型のGPCRで、RhoA活性を示す細胞が多いことがわかった。他のGαタンパク質では、Gα<sub>i/o</sub>共役型のHTR1BやGα<sub>q/11</sub>共役型のHTR2AでもRhoA活性を示す細胞が比較的多く見られることが分かった。HTR1B発現細胞とHTR2A発現細胞の共通点としては、どちらも他のGPCRより比較的強いCa<sup>2+</sup>応答を示す細胞が見られたことが挙げられる。以上から、cAMP応答またはCa<sup>2+</sup>応答を示したGPCRで、RhoA活性が見られると考えられた。



**図28. K-meansクラスタリングによるRhoA活性の分類**

(A) 時系列K-meansクラスタリングにより3種類のクラスターに分類されたRhoA活性の時系列ヒートマップを示す。(B) 各クラスターの平均値のダイナミクスを示す。(C) GPCRを発現させていないコントロール細胞(DAまたは5-HT)、DA受容体および5-HT受容体のRhoA活性のクラスターの割合を示す。(D) Cで説明したクラスター分類の細胞ごとのRhoA活性の時系列をヒートマップを用いて表した。ヒートマップは $\Delta R/R_0$ で示した。ヒートマップは、コントロール(DAまたは5-HT)、 $G\alpha_s$ 共役型、 $G\alpha_{q/11}$ 共役型、 $G\alpha_{i/o}$ 共役型のGPCRで分類している。

### 3.5.4. ERK活性のシグナルダイナミクス分類

ERK活性のデータも、cAMP応答とCa<sup>2+</sup>応答と同様に、クラスター数を4にすると、Cluster 1とCluster 2でほぼ違いのないダイナミクスに分類された(図29)。

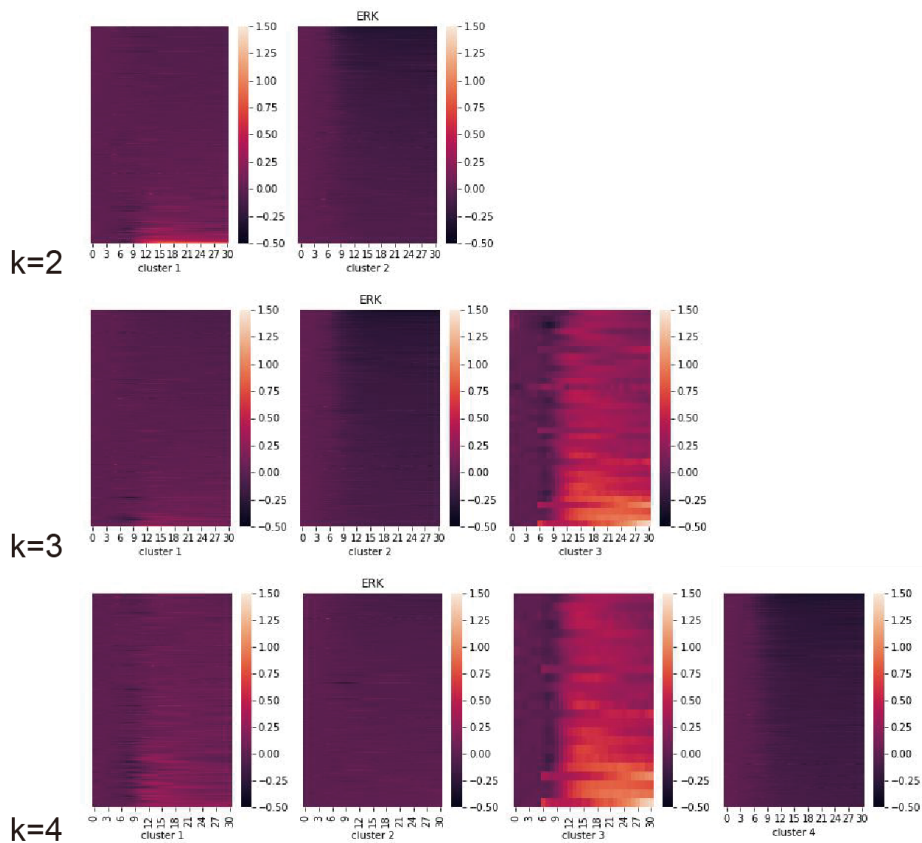


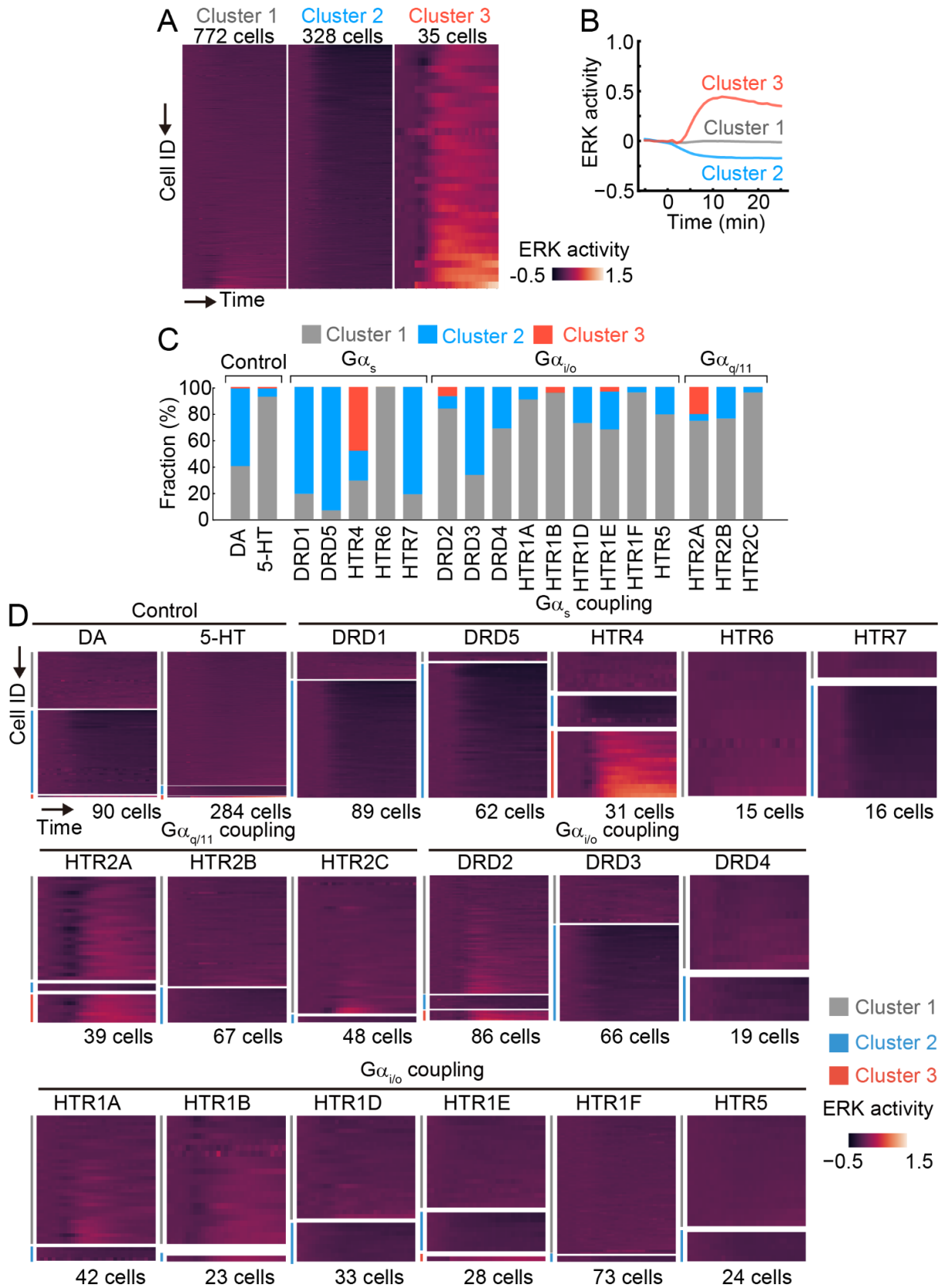
図29. ERK活性のK-meansクラスタリング

クラスター数(k)が2~4の場合の各クラスターの時系列ヒートマップを示す。

そこで、クラスター数を3に設定し、ERK活性の時系列データを分類した(図30A)。その結果、ほぼERK活性が変化しないCluster 1、ERK活性が低下するCluster 2、ERK活性が上昇するCluster 3に分かれた(図30B)。また、Cluster 3に注目すると、ERK活性が上昇する前に一旦下がるダイナミクスが多いことが分かった。ERK活性のみ、基底状態よりも活性が低下するダイナミクスが見られた。また、GPCRごとにクラスターを分類して示した(図30C)。Ga<sub>q/11</sub>共役型の5-HT

受容体のサブタイプで比較すると、HTR2A発現細胞とHTR2B発現細胞で反対のERK活性のダイナミクスを示すことが分かった。さらに、それぞれの時系列をヒートマップで示した(図30D)。細胞が示すERK活性のダイナミクスは発現させたGPCRごとに異なり、上昇する細胞が多いもの、低下する細胞が多いもの、上昇する細胞と低下する細胞が両方あるものと様々であった。Gα<sub>s</sub>共役型GPCRの発現細胞ではERK活性が上昇または低下する細胞が他のGαタンパク質と共役するGPCRの発現細胞よりも多いが、Gα<sub>s</sub>共役型のHTR6発現細胞のみERK活性が変化する細胞が全く見られなかった。





**図30. K-meansクラスタリングによるERK活性の分類**

(A) 時系列K-meansクラスタリングにより3種類のクラスターに分類されたERK活性の時系列ヒートマップを示す。(B) 各クラスターの平均値のダイナミクスを示す。(C) GPCRを発現させていないコントロール細胞(DAまたは5-HT)、DA受容体および5-HT受容体のERK活性のクラスターの割合を示す。(D) Cで説明したクラスター分類の細胞ごとのERK活性の時系列をヒートマップを用いて表した。ヒートマップは $\Delta R/R_0$ で示した。ヒートマップは、コントロール(DAまたは5-HT)、 $G\alpha_s$ 共役型、 $G\alpha_{q/11}$ 共役型、 $G\alpha_{i/o}$ 共役型のGPCRで分類している。

### 3.6. $G\alpha_{i/o}$ 共役型GPCR活性の測定系の開発

ここまでの実験で、DA受容体および5-HT受容体の計17種類のGPCRの下流シグナルのダイナミクスを測定した。しかし、いくつかのGPCRでは、4種類のいずれの下流シグナルも応答がないものが見られた。これらの多くは、 $G\alpha_{i/o}$ 共役型のGPCRであった。 $G\alpha_{i/o}$ タンパク質活性を測定できない理由として、基底状態の細胞内cAMP濃度が低く、cAMPセンサーではこれ以上低い値を検出できないということが考えられた。そこで、 $G\alpha_{i/o}$ 共役型GPCR発現細胞のcAMP濃度を予め上昇させた状態で、リガンド刺激を行うことで細胞内cAMP濃度の低下を観察することを試みた。細胞内cAMP濃度を上昇させるための手段として、HeLa細胞に内在的に発現する $G\alpha_s$ 共役型のアドレナリン $\beta$ 受容体の選択的アゴニストであるイソプロテレノール(ISO)を採用し、適した濃度の評価を行った。これにより、細胞内cAMP濃度を上昇させた状態で $G\alpha_{i/o}$ 共役型のDA受容体を活性化させることでシグナル伝達を定量する実験系を構築した(図31)。

#### 3.6.1. $G\alpha_{i/o}$ 共役型DA受容体の $G\alpha_{i/o}$ 活性の測定

確立した多重蛍光イメージング法を用いて、それぞれDRD2、DRD3、DRD4の発現細胞を評価した。まず、測定開始から5分後にISO刺激を行い、細胞内cAMP濃度を上昇させた。さらに10分後、DAまたはコントロールとしてDAの溶媒である10 mM HCl水溶液を添加し、その後のcAMP濃度を測定した。その結果、コントロール細胞と比較するとDA受容体を発現させた細胞ではcAMP濃度が低下する細胞が増加することが分かった(図32)。また、DRD2発現細胞ではDAの添加に関わらず、cAMP濃度が低下する細胞が多いことが分かった。

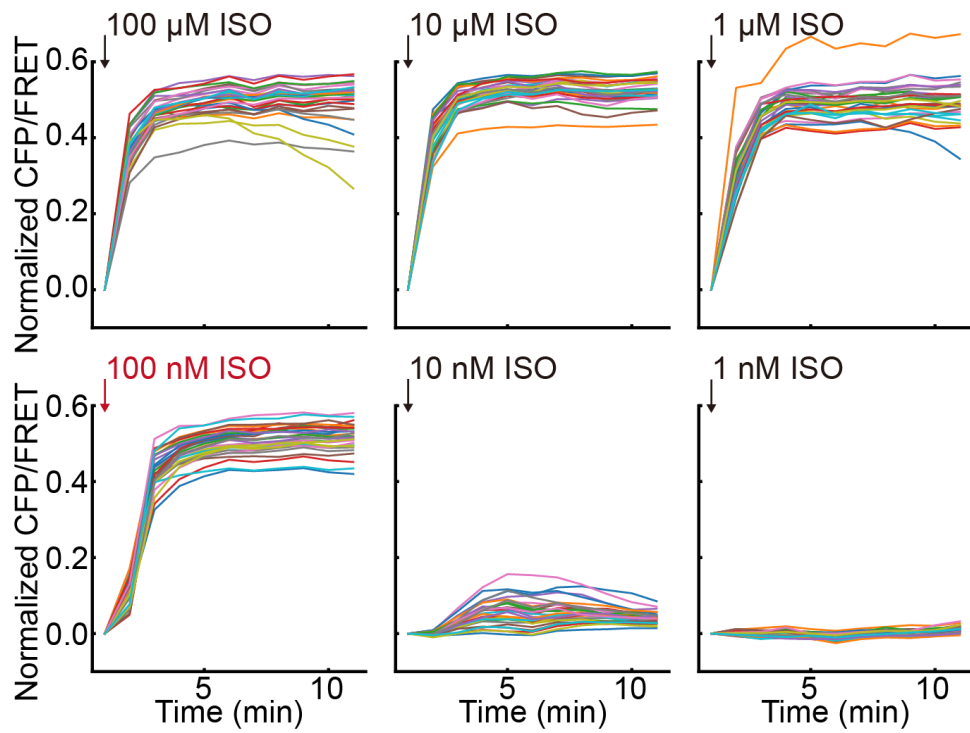


図31. 濃度ごとのISO刺激によるHeLa細胞内cAMP応答

cAMPセンサーを安定発現させたHeLa細胞に、濃度の異なるISOを添加した時のCFP/FRETの変化率( $\Delta R/R_0$ )を示す。

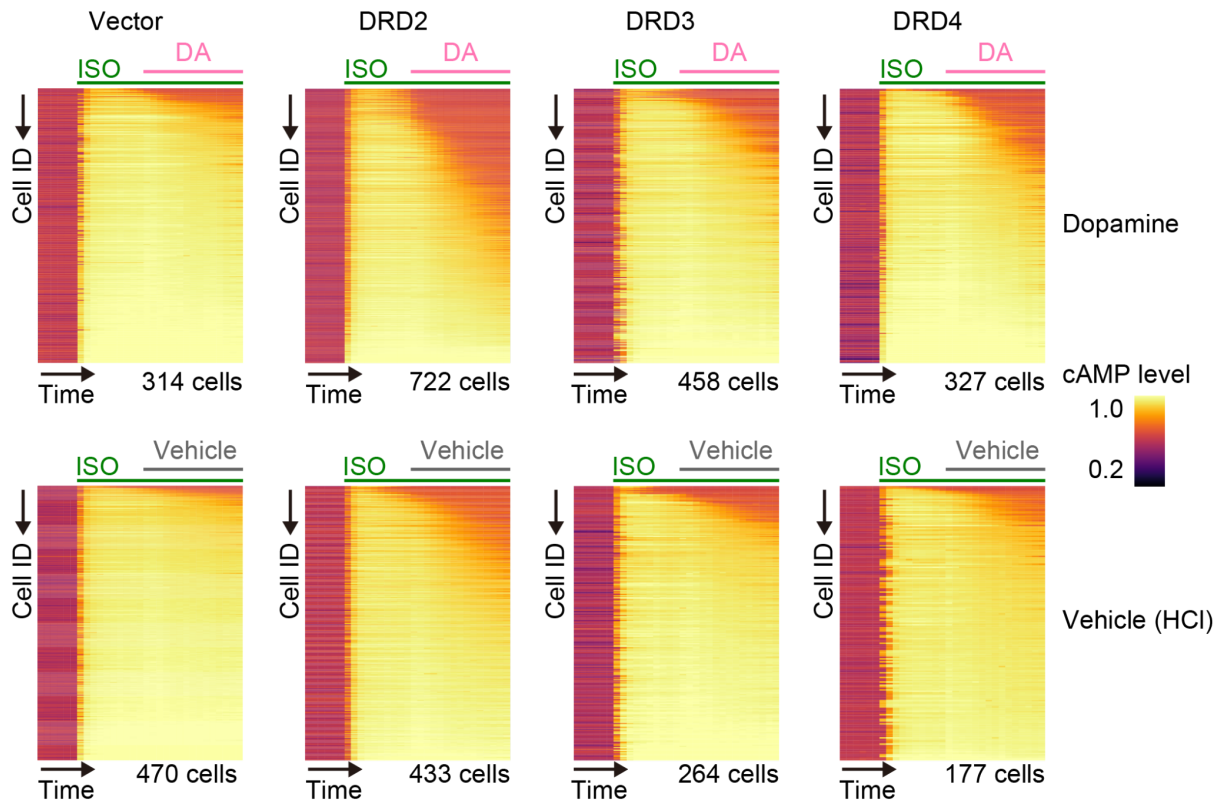
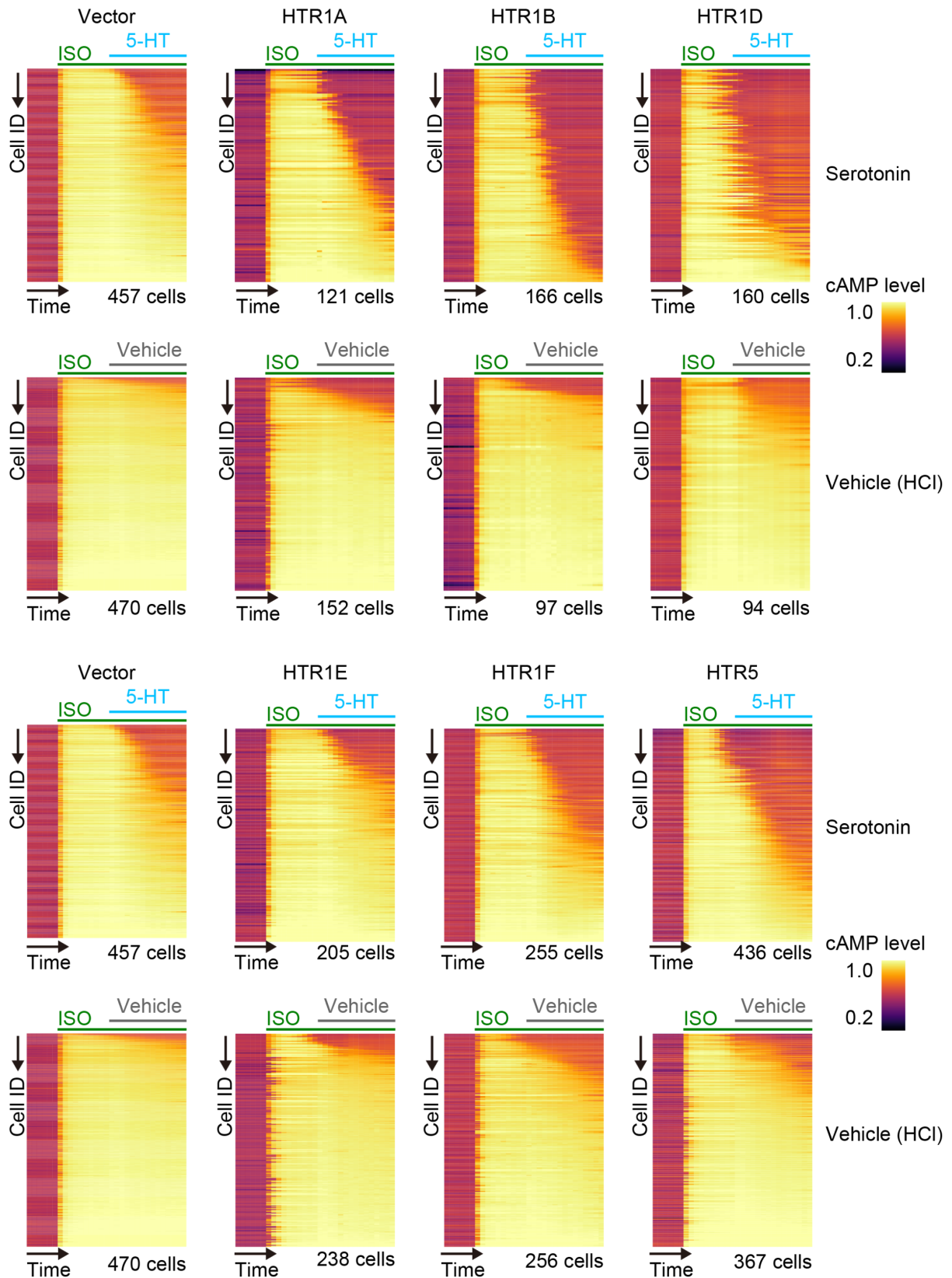


図32.  $G\alpha_{i/o}$ 共役型のDA受容体の活性によるcAMP減少

イメージング開始5分後、コントロール細胞または $G\alpha_{i/o}$ 共役型DA受容体(DRD2、DRD3、DRD4)発現細胞をISO(100 nM)で刺激して細胞内cAMP濃度を上昇させた。ISO刺激から10分後、DA 10  $\mu$ M刺激またはHCl添加を行い、細胞内cAMP濃度の変化を観察した。各時系列を規格化し、cAMP濃度の積分値が低い順に細胞を並べたヒートマップを作製した。

### 3.6.2. $G\alpha_{i/o}$ 共役型5-HT受容体の $G\alpha_{i/o}$ 活性の測定

$G\alpha_{i/o}$ 共役型のDA受容体と同様に、5-HT刺激により $G\alpha_{i/o}$ 共役型の5-HT受容体が、予め上昇した状態のcAMP濃度を低下するかを調べた。HTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1E、HTR1F、HTR5の6種類をそれぞれ発現させた細胞を用意し、観察開始5分後にISO刺激してcAMP濃度を予め上昇させた。さらに10分後に5-HTまたはHClで刺激し、細胞内cAMP濃度を測定した(図33)。その結果、5-HT受容体を発現させていないコントロール細胞でも5-HT刺激によって細胞内cAMP濃度を低下させる細胞が増えた。このことから、HeLa細胞に $G\alpha_{i/o}$ 共役型の5-HT受容体が内在的に発現していることが考えられた。また、HTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1F、HTR5を発現させた細胞では、コントロール細胞と比較して、基底のcAMP濃度に戻る細胞が増加することが分かった。一方で、HTR1E発現細胞は、コントロール細胞と比較して大きな違いはなかった。



**図33.  $G\alpha_{i/o}$  共役型の5-HT受容体の活性化によるcAMP減少**

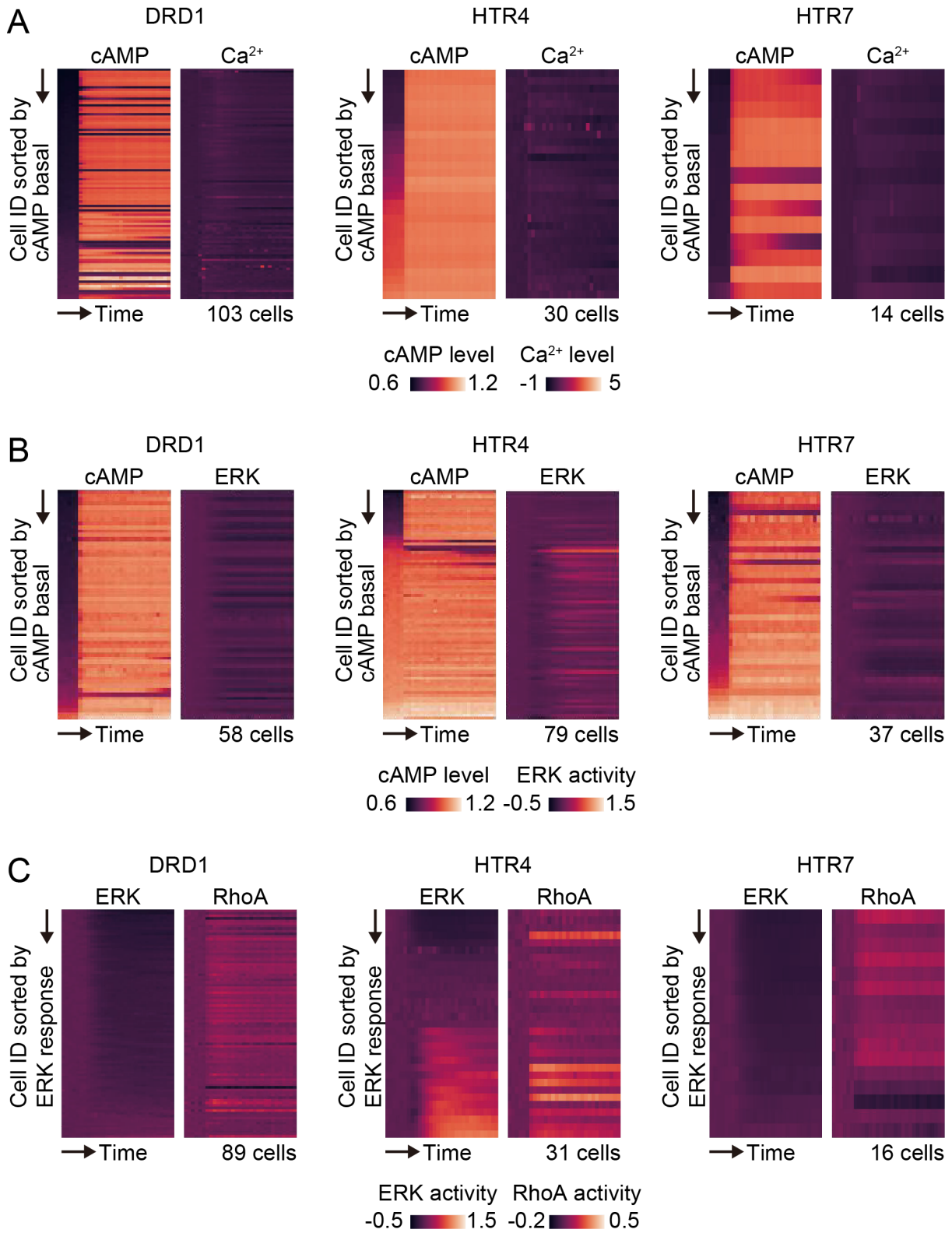
イメージング開始5分後、コントロール細胞または $G\alpha_{i/o}$ 共役型5-HT受容体(HTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1E、HTR1F、HTR5)発現細胞をISO(100 nM)で刺激して細胞内cAMP濃度を上昇させた。ISO刺激から10分後、5-HT 10  $\mu$ M刺激またはHCl添加を行い、細胞内cAMP濃度の変化を観察した。各ヒートマップの時系列を規格化し、cAMP濃度の積分値が低い順に細胞を並べたヒートマップを作製した。



### 3.7. 2種類の下流シグナル同士の相関の解析

ここまでの結果から、GPCR発現細胞の集団の中で、シグナル応答が見られる細胞と見られない細胞があった。本研究では、2種類のバイオセンサーを安定発現させた細胞株を利用しているため、一方のシグナル応答の有無がもう一方のシグナル応答にどのような影響を与えるかを調べることで、GPCRシグナルに関する知見をさらに得られると考えた。そこで、HeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup>とHeLa/RhoA/ERKのそれぞれの定量データから、cAMP応答とCa<sup>2+</sup>応答の相関、およびRhoA活性とERK活性の相関を調べた。加えて、DRD1発現細胞やHTR7発現細胞のシグナルダイナミクスの評価から、cAMP応答がある時に、ERK活性が低下する傾向があるのではないかと考え、新たにcAMPセンサーとERKセンサー、核マーカーを安定発現させた細胞株(HeLa/cAMP/ERK)を樹立し、両者の相関を調べた。ここでは、特にcAMP応答をよく観察できたDRD1、HTR4、HTR7の3種類のGPCRを標的にし、下流シグナル同士の関係性を評価した。

まず、cAMP応答とCa<sup>2+</sup>応答の相関について調べようとしたが、本研究の測定結果では両者が共に応答するGPCRはなかったために、cAMP応答とCa<sup>2+</sup>応答の相関の正確な評価は困難であった(図34A)。次に、cAMP応答とERK活性の相関について調べたところ、刺激前からcAMP濃度が高いHTR4発現細胞で5-HT刺激によるERKの活性化が起こっていることが示唆された(図34B)。一方で、DRD1発現細胞とHTR7発現細胞については、cAMP応答が見られる細胞において、ERK活性が低下する細胞、変化しない細胞の両方が見られるため、cAMP応答とERK活性との間に強い相関はないと考えられた。ERK活性とRhoA活性については、いずれのGPCRでもERK活性化とRhoA活性化の間に相関は見られなかった(図34C)。これら3種類のGPCRの解析から、cAMP応答とCa<sup>2+</sup>応答、およびRhoA活性とERK活性の間に相関は見られないが、HTR4発現細胞では刺激前からcAMP濃度の高い細胞で、5-HT刺激によるERK活性化を示すことがわかった(表7)。



### 図34. 2種類の下流シグナル間の相関の解析

(A) DRD1、HTR4、またはHTR7を発現させたHeLa/cAMP/Ca<sup>2+</sup>のcAMP応答とCa<sup>2+</sup>応答を比較した。cAMP応答の時系列は規格化せず、Ca<sup>2+</sup>応答のみ規格化している。各細胞は刺激前の細胞内cAMP濃度が低い順に並べられている。(B) DRD1、HTR4、またはHTR7を発現させたHeLa/cAMP/ERKのcAMP応答とERK活性の相関を示す。cAMP応答は規格化せず、ERK活性のみ規格化した。各細胞は刺激前の細胞内cAMP濃度が低い順に並べられている。(C) DRD1、HTR4、またはHTR7を発現させたHeLa/RhoA/ERKのRhoA活性とERK活性の相関を示す。各細胞はERK活性の低い順に並べられている。

表7. 2種類の下流シグナル間の相関の解析結果の要約

	DRD1	HTR4	HTR7
cAMP / Ca <sup>2+</sup>	-	-	-
cAMP / ERK	-	高cAMP濃度 ERK活性化	-
ERK / RhoA	-	-	-

## 4. 考察

### 4.1. GPCRシグナルのダイナミクスが持つ情報量

本研究では、初めて4種類のGPCR下流シグナルを時系列ごとに定量し、さらに下流シグナルのダイナミクスを、5種類のDA受容体サブタイプと12種類の5-HT受容体サブタイプの計17種類のGPCR間で比較した。その結果、共役するGαタンパク質サブファミリーが同じであっても、GPCRサブタイプ間で下流シグナルのダイナミクスが多様であることを示した。まず、cAMP応答は一度活性化すると高cAMP濃度の状態を維持する持続的な応答と、一時的に高cAMP濃度状態になって基底状態へと戻る一過的な応答の2種類を観察した。また、本実験で観察した下流シグナルのダイナミクス以外では、膵臓β細胞へのグルカゴン様ペプチド (glucagon-like peptide、GLP-1) 刺激で、パルス状のcAMP応答を示すことが先行研究で報告されている(Dyachok et al., 2006)。Ca<sup>2+</sup>応答について、本実験ではパルス状の応答を観察した。Ca<sup>2+</sup>のパルスは、大きさや頻度によってNF-κBなどの様々な転写因子を活性化することが報告されている(Dolmetsch et al., 1998)。GPCR間でCa<sup>2+</sup>応答の違いをさらに細かく区別できるとすれば、より膨大な情報量を確保することができると考えられる。RhoA活性の変化を見ると、いずれもRhoA活性が上昇した後、徐々に刺激前の状態に戻るダイナミクスを示している。しかし、GPCRごとに比較すると活性化のピークの大きさが異なることから、ピークの大きさの違いがGPCRを区別するための情報となっている可能性がある。最後に、ERK活性の観察では、GPCRによって活性が上昇したり低下したりすることが示された。ERKは様々な細胞内シグナルの影響を受け、細胞増殖や、細胞分化、細胞遊走などを制御している。このことから、GPCRシグナルもERK活性を上昇または低下することで、ERKの複雑なネットワークに加わっていることが考えられた。

例えば、本研究でターゲットとしたcAMP、Ca<sup>2+</sup>、RhoA、ERKのそれぞれが3種類のダイナミクスを示す場合、組み合わせは $3^4 = 81$ 通りとなり、単純計算でも数十種類程度のGPCRシグナルを区別できる可能性がある。従って、何十種類ものGPCRが共通する下流シグナルを用いて情報伝達を行う場合においても、それぞれのGPCRは固有のシグナルダイナミクスを持ち、さらに、

シグナルダイナミクスの組み合わせも考えられるために、細胞ほどのGPCRが活性化したのかを認識できるという可能性を示すことができた。

## 4.2. GPCRサブタイプ間の比較

DA受容体による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化について、DRD1およびDRD2では一部の発現細胞でパルス状のCa<sup>2+</sup>応答も見られた。また、RhoA活性のダイナミクスに注目すると、DRD1とDRD2では、5%程度のFRET/CFPの一過的な上昇が見られた。Gα<sub>12/13</sub>タンパク質との共役によるRhoA活性化も考えられるが、先行研究ではGα<sub>s</sub>タンパク質やGα<sub>q/11</sub>タンパク質によるRhoA活性化も報告されている(Castillo-Kauil et al., 2020; Rojas et al., 2007)。また、Gβγ複合体によるRhoA活性化も報告されている(Sugiyama et al., 2017)。ERK活性のダイナミクスについては、DRD2のみがERK活性の上昇を示した。一方で、DRD3およびDRD4ではERK活性に変化は見られなかった。DRD2欠損マウスでは、DRD3欠損マウスやDRD4欠損マウスと比較して高血圧や成長の遅滞などの表現型が現れることと関与しているかもしれない(Kelly et al., 1997; Li et al., 2001)。

Gα<sub>q/11</sub>共役型GPCRとして、HTR2A、HTR2B、およびHTR2Cの3種類のGPCRを調べた。RhoA活性に注目すると、HTR2A発現細胞で一過的なRhoA活性化を示す細胞が多いことが分かる。先行研究では、HTR2AはGα<sub>12/13</sub>タンパク質とほぼ共役しないことが示されている(Avet et al., 2022; Inoue et al., 2019)。また、Trioと呼ばれるRhoGEFの1つがGα<sub>q/11</sub>タンパク質によって活性化されることが報告されている(Rojas et al., 2007)。このことから、Gα<sub>12/13</sub>タンパク質とは別の経路でRhoA活性が上昇したことが考えられた。またERK活性の変化も、HTR2A発現細胞で特に顕著に見られた。HTR2AのCa<sup>2+</sup>応答が他のサブタイプより強いことから、Ca<sup>2+</sup>がPKCに作用してMAPK経路のRafを活性化してERK活性を上昇していることが考えられた。Gα<sub>q/11</sub>共役型5-HT受容体の中では、HTR2B発現細胞のみCa<sup>2+</sup>応答を示す細胞が見られなかった。先行研究では、マウス神経芽腫(N1E-115)細胞を用いたCa<sup>2+</sup>イメージングで、HTR2A発現細胞とHTR2B発現細胞の両方のCa<sup>2+</sup>応答を観察しており、さらに両者のCa<sup>2+</sup>応答のダイナミクスが異なることを示している(Niebert et al., 2011)。また、Avetらは、HTR2AとHTR2Bを比較すると、共役するGα<sub>q/11</sub>タンパク質のメンバー(G<sub>q</sub>、G<sub>11</sub>、G<sub>14</sub>、G<sub>15</sub>)の嗜好性(選択性)が異なることを示している(Avet et al., 2022)。内在的に発現するGαタンパク質の種類は細胞株によって変わることが考えられるため、

本研究でHTR2B発現細胞でCa<sup>2+</sup>応答が見られなかった理由は、HeLa細胞内に発現しているGα<sub>q/11</sub>タンパク質のメンバーの比率に偏りがあり、HTR2Aと親和性の高いGα<sub>q/11</sub>タンパク質のメンバーは十分に発現している一方で、HTR2Bと親和性の高いGα<sub>q/11</sub>タンパク質のメンバーはあまり発現していなかったことが可能性として考えられた。

Gα<sub>i/o</sub>共役型の5-HT受容体サブタイプ(HTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1E、HTR1F、HTR5)間でも、それぞれに特有の応答がいくつか見られた。HTR1Bは、特に強いCa<sup>2+</sup>応答を示した。先行研究では、HTR1Bが一部のGα<sub>q/11</sub>タンパク質のメンバーと共役することが報告されている(Avet et al., 2022; Inoue et al., 2019)。一方で、HTR1B以外のサブタイプでもGα<sub>q/11</sub>タンパク質と共役するものもあるとされているが、GPCRシグナルによる強いCa<sup>2+</sup>応答は見られなかった。このことも、HTR2B発現細胞でCa<sup>2+</sup>応答を観察できなかつたように、内在性のGα<sub>q/11</sub>タンパク質のメンバーの比率が関与している可能性が考えられる。

Gα<sub>s</sub>共役型の5-HT受容体サブタイプ(HTR4、HTR6、HTR7)間では、下流シグナルの様々な違いが見られた。まず、cAMP応答では、HTR4とHTR6で基底状態のcAMP濃度が高い細胞がいくつか見られた。HTR4とHTR6には恒常活性があることが報告されており、そのために刺激前から高いcAMP濃度を維持した細胞があったと考えられる(Cochet et al., 2013; Duhr et al., 2014)。細胞間の基底状態cAMP濃度のバラつきは、過剰発現させたGPCRの発現量の違いによって生じているのではないかと考えられる。興味深いのは、5-HTを認識してGα<sub>s</sub>タンパク質と共役するHTR4発現細胞はERK活性を上昇し、HTR7発現細胞はERK活性を低下するという、反対の応答を示すことである。これらの違いから、細胞がHTR4とHTR7からのシグナルを明確に区別することができると考えられる。

### 4.3. $G\alpha_{i/o}$ 共役型GPCRの活性ダイナミクスの比較

予め細胞内cAMP濃度を上昇させてからリガンド刺激を行う実験系を確立し、 $G\alpha_{i/o}$  共役型GPCRの活性による細胞内cAMP濃度の低下を観察した。その結果、同じ $G\alpha_{i/o}$  共役型でも細胞内cAMP濃度の低下が起こりやすいGPCRと起こりにくいGPCRが見られた。このことは、複数の $G\alpha_{i/o}$  共役型GPCRが発現した状態でも、cAMP濃度の低下の程度の違いから異なるGPCRシグナルとなっている可能性を示唆するものである。

しかし、どのようにGPCR間でcAMP濃度の低下の違いが生じているのかの分子機構については明らかにされていない。この疑問点について、GPCR間の発現量の違いが、原因の1つとして考えられた。しかし、5-HT受容体の免疫染色の結果から、発現量が高い5-HT受容体がよりcAMP濃度の低下を示しているわけではなかった。次に、HeLa細胞に内在する $G\alpha_{i/o}$  タンパク質のタイプの発現量の違いが仮説として挙げられた。 $G\alpha_{q/11}$  タンパク質同様に、 $G\alpha_{i/o}$  タンパク質のメンバーには、 $G_{i1}$ 、 $G_{i2}$ 、 $G_{i3}$ 、 $G_o$ 、 $G_2$ などが存在し、4種類の $G\alpha$ タンパク質の中でも最もメンバーの種類が多いことが分かっている(Syrovatkina et al., 2016)。今回調べた $G\alpha_{i/o}$  共役型GPCR間では、 $G\alpha_{i/o}$  タンパク質のタイプ間で親和性が異なることが示唆されている(Avet et al., 2022; Inoue et al., 2019)。このことから、HeLa細胞に発現する $G\alpha_{i/o}$  タンパク質のメンバーの発現量に違いがあれば、GPCR間でcAMP濃度の低下の起こりやすさが異なることが考えられた。



#### 4.4. クロストークの考察

cAMP応答とCa<sup>2+</sup>応答、cAMP応答とERK活性、ERK活性とRhoA活性の3点で、1細胞の下流シグナル間の相関について評価した。今回、観察したGPCRの中では、cAMPとCa<sup>2+</sup>の両方が顕著に応答する例がなかった。このため、現状としては、cAMP応答とCa<sup>2+</sup>応答の間に相互関係があるかどうかを評価するのは困難であった。先行研究では、HEK293細胞に発現させたケモカイン受容体CXCR4でcAMP応答とCa<sup>2+</sup>応答の両方が見られており(Tchernychev et al., 2010)、本研究の実験系を用いることでより詳細なcAMPとCa<sup>2+</sup>間の相関を調べることができるかもしれない。cAMP応答とERK活性との相関について調べると、DRD1およびHTR7ではERKの活性化が見られない一方で、HTR4では、基底状態のcAMP濃度が高い細胞で、ERK活性の上昇がよく見られた。このことから、細胞内cAMPの濃度の絶対値ではなく、cAMP応答の変化量がERK活性の低下を引き起こしている可能性が考えられた。ERK活性とRhoA活性の関係については、ERK活性の上昇や低下に関わらず、RhoAが活性化する細胞が見られたことから、ERKとRhoAとの間のクロストークがないことが示唆された。

また、本研究によってHTR4発現細胞の結果から、細胞間のcAMP濃度の不均一性(heterogeneity)がERK活性の違いを生み出している可能性を示した。このことは、細胞集団においてERK活性化が細胞ごとにそれぞれ異なる理由の1つとして説明できるかも知れない。

## 4.5. 今後の展望

本研究では、GPCRごとに下流シグナルのダイナミクスが異なることを示し、シグナルダイナミクスの違いがGPCRシグナルを区別するための情報になっている可能性を示した。しかし、実際に細胞がダイナミクスの違いを符号化(encoding)し、情報を復号化(decoding)しているのかについては、さらなる研究が必要である。また、本研究によって、GPCRシグナルのダイナミクスがGPCRサブタイプ間で異なることが示されたが、ダイナミクスが変化する仕組みについては未だ不明である。例えば、同じGαタンパク質サブファミリーと共役するGPCRサブタイプ間でも、Gαタンパク質サブファミリーのメンバーとの親和性の違いによって異なるダイナミクスを生み出すことも考えられた。また、これまでの考察でも触れたように、4種類に大別されるGαタンパク質サブファミリーはさらに細かく分かれる。Gα<sub>q/11</sub>タンパク質のシグナルはCa<sup>2+</sup>応答を引き起こすが、G<sub>q</sub>やG<sub>11</sub>などのメンバー間でCa<sup>2+</sup>応答のダイナミクスが変化することも考えられる。このことから、例えば、Gα<sub>q/11</sub>共役型GPCRがG<sub>q</sub>、G<sub>11</sub>、G<sub>14</sub>、G<sub>15</sub>とそれぞれ結合した時の構造を調べ、さらにGα<sub>q/11</sub>共役型GPCRサブタイプ間で比較解析することで、GPCR下流シグナルのダイナミクスの違いが生まれる仕組みを理解できるかも知れない。

本研究では、蛍光バイオセンサーの組み合わせにより、cAMPとCa<sup>2+</sup>の応答を検出できる細胞株と、RhoAとERKの活性を検出できる細胞株の2種類を用意した。しかしながら、1つの細胞株に蛍光バイオセンサーを発現させ、全ての下流シグナルを検出できる細胞株が理想的である。例えば、本研究で使用したCFP-Epac-YFPやDORA-RhoAなどのFRETバイオセンサーを使わず、単色の蛍光バイオセンサー4種類を利用することで、これら全ての下流シグナルを同時に検出できる細胞株を樹立させることができれば、GPCR下流シグナル間の相互関係についてより詳細に解明することが可能となる。

また、今回の実験では、GPCRによるERKの活性化を観察すると、リガンド刺激後にERK活性が一過的に低下してから上昇するというダイナミクスが見られた(HTR2AやHTR4など)。このダイナミクスは、例えばEGF刺激によるERK活性化では見られない。一方で、他のGPCR研究でも、ヒスタミン受容体(HRH1)やアンジオテンシン受容体(AGTR1)などの他のGPCRによるERK

の活性化で同様のダイナミクスが観察されている(Pietraszewska-Bogiel et al., 2020)。さらに先行研究では、 $G\alpha_s$ 共役型GPCRが $G\alpha_s$ タンパク質と共役する前に $G\alpha_{q/11}$ タンパク質と短時間共役することでより強いcAMP応答を誘導するGPCRプライミング(GPCR priming)が提唱されている(Gupte et al., 2017)。このように、 $G\alpha$ タンパク質と短時間共役することで生じるシグナルが、一過的なERK活性の低下を引き起こしている可能性も考えられた。一方で、数分程度のERK活性の微小な低下が細胞への生理的機能を持つのかについては不明であり、さらに検討する必要がある。

本研究によって、同じリガンドを認識し、同じ $G\alpha$ タンパク質と共役するGPCRサブタイプ間であっても、下流シグナルのダイナミクスが多様であることが示された。このことからGPCR研究において、「どの化合物をリガンドとして認識するか」や「どの $G\alpha$ タンパク質サブファミリーと共役するか」といった知見と同じように、「GPCR下流ではどのようなシグナルダイナミクスが見られるか」という情報が重要になると考えられた。個々のGPCRのシグナルダイナミクスの特徴を明らかにすることで期待できることがある。その1つの例として、導入ではHTR4の一塩基多型が統合失調症に関わっていることを述べた。これらのGPCR遺伝子を細胞に発現させ、シグナルを定量することでダイナミクスの違いを捉えることで、統合失調症発症のメカニズムに迫ることができる可能性がある。さらに、ダイナミクスの違いが原因であるとするれば、適切なシグナルダイナミクスを誘導する薬剤を開発するなどの創薬のアプローチの開拓に繋げることも可能になる。

## 謝辞

本研究は、自然科学研究機構基礎生物学研究所定量生物学研究部門の青木一洋教授の指導の下に行われた。2018年4月より基礎生物学研究所にやってきた私は、これまで4年半の間、青木教授を始めとする研究室のメンバーに囲まれて過ごしてきた。その間に各々から賜ったものの大きさは計り知れない。計画して遂行する能力、論理的な思考や洞察力、発信する能力や文章力など、これらの能力は博士課程を経ることで初めて獲得できたものであると確信している。故に、博士課程の日々は辛く厳しいものであったが、同時に極めて有意義であったと感じている。そしてこれらは、私を受け入れて下さった青木研究室の方々によってもたらされたものであることは言うまでもない。以上から、青木一洋教授、近藤洋平助教、杉山博紀研究員、平野咲雪研究員、尾納隆大技術支援員、海老根映美技術支援員、富沢瑤子技術支援員、小野田香織秘書、酒井啓一郎大学院生、鶴岡樹大学院生、伊藤冬馬大学院生、小田茂和博士、伊藤玲奈博士、小松原晃博士、眞流玄武博士、三浦晴子博士、宇田耀一博士、中村彰伸博士、山本啓博士、福山達也博士(齊藤稔研究室)、中本千尋博士(竹内倫徳研究室)、そして私が所属した当初からこれまでの全ての期間で常に手厚い指導を頂いた後藤祐平助教に、心から感謝を申し上げたい。

また、日常生活を送る上で両親と友人の存在は極めて重要であった。特に高校時代の友人たちについては非常に強い感謝の気持ちを持っている。研究室での生活から時に辛くなることもあったが、そんな時でも彼らとのやり取りは楽しく、充実したものであった。談笑したりTRPG(tabletop role-playing game)に興じたり、時には集まって小旅行したり、様々なことを行った。これらは全て励みとなり、これらをなくして本学位論文の完成は困難であったと感じている。高校時代からの友人であるK.K.、Y.F.、M.K.、Y.Y.の4名に心から御礼を申し上げたい。そして私をここまで育て上げ、この道に私が進むことにも反対せずに見守り続けてくれた両親にも改めて感謝申し上げます。

## 参考文献

Akagi, T., Shishido, T., Murata, K., and Hanafusa, H. (2000). v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway in transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7290–7295. .

Alexander, S.P.H., Mathie, A., and Peters, J.A. (2011). *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 5th edition. *Br. J. Pharmacol.* 164 *Suppl 1*, S1–S324. .

Amisten, S., Salehi, A., Rorsman, P., Jones, P.M., and Persaud, S.J. (2013). An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans. *Pharmacol. Ther.* 139, 359–391. .

Amisten, S., Neville, M., Hawkes, R., Persaud, S.J., Karpe, F., and Salehi, A. (2015). An atlas of G-protein coupled receptor expression and function in human subcutaneous adipose tissue. *Pharmacol. Ther.* 146, 61–93. .

Anden, N.E., Carlsson, A., Dahlstroem, A., Fuxe, K., Hillarp, N.A., and Larsson, K. (1964). DEMONSTRATION AND MAPPING OUT OF NIGRO-NEOSTRIATAL DOPAMINE NEURONS. *Life Sci.* 3, 523–530. .

Aoki, K., Kumagai, Y., Sakurai, A., Komatsu, N., Fujita, Y., Shionyu, C., and Matsuda, M. (2013). Stochastic ERK activation induced by noise and cell-to-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation. *Mol. Cell* 52, 529–540. .

Aoki, K., Kondo, Y., Naoki, H., Hiratsuka, T., Itoh, R.E., and Matsuda, M. (2017). Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration. *Dev. Cell* 43, 305–317.e5. .

Asico, L.D., Ladines, C., Fuchs, S., Accili, D., Carey, R.M., Semeraro, C., Pocchiari, F., Felder, R.A., Eisner, G.M., and Jose, P.A. (1998). Disruption of the dopamine D3 receptor gene produces renin-dependent hypertension. *J. Clin. Invest.* 102, 493–498. .

Atwood, B.K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., and Straiker, A. (2011). Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics* 12, 14. .

Avet, C., Mancini, A., Breton, B., Le Gouill, C., Hauser, A.S., Normand, C., Kobayashi, H., Gross, F., Hogue, M., Lukashova, V., et al. (2022). Effector membrane translocation biosensors reveal G protein and  $\beta$ arrestin coupling profiles of 100 therapeutically relevant GPCRs. *Elife* 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.74101>.

Batchelor, E., Loewer, A., Mock, C., and Lahav, G. (2011). Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Mol. Syst. Biol.* 7, 488. .

Beaulieu, J.-M., and Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182–217. .

Berger, M., Gray, J.A., and Roth, B.L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 60, 355–366. .

- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 11–21. .
- Bjarnadóttir, T.K., Gloriam, D.E., Hellstrand, S.H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., and Schiöth, H.B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* *88*, 263–273. .
- Blaukat, A., Barac, A., Cross, M.J., Offermanns, S., and Dikic, I. (2000). G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 6837–6848. .
- Bockaert, J., Bécamel, C., Chaumont-Dubel, S., Claeysen, S., Vandermoere, F., and Marin, P. (2021). Novel and atypical pathways for serotonin signaling. *Fac Rev* *10*, 52. .
- Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M.A., Lytton, J., and Hebert, S.C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* *366*, 575–580. .
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* *65*, 175–187. .
- Bugaj, L.J., Sabnis, A.J., Mitchell, A., Garbarino, J.E., Toettcher, J.E., Bivona, T.G., and Lim, W.A. (2018). Cancer mutations and targeted drugs can disrupt dynamic signal encoding by the Ras-Erk pathway. *Science* *361*. <https://doi.org/10.1126/science.aao3048>.
- Carlsson, A. (2001). A half-century of neurotransmitter research: impact on neurology and psychiatry (Nobel lecture). *Chembiochem* *2*, 484–493. .
- Carlsson, A., Lindqvist, M., and Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* *180*, 1200. .
- Carroll, M.P., and May, W.S. (1994). Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 1249–1256. .
- Castillo-Kauil, A., García-Jiménez, I., Cervantes-Villagrana, R.D., Adame-García, S.R., Beltrán-Navarro, Y.M., Gutkind, J.S., Reyes-Cruz, G., and Vázquez-Prado, J. (2020). Gαs directly drives PDZ-RhoGEF signaling to Cdc42. *J. Biol. Chem.* *295*, 16920–16928. .
- Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* *444*, 288–294. .
- Chen, Y., Palczewska, G., Mustafi, D., Golczak, M., Dong, Z., Sawada, O., Maeda, T., Maeda, A., and Palczewski, K. (2013). Systems pharmacology identifies drug targets for Stargardt disease-associated retinal degeneration. *J. Clin. Invest.* *123*, 5119–5134. .
- Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S.F., Marin, P., Bockaert, J., Dumuis, A., and Claeysen, S. (2013). 5-HT<sub>4</sub> receptors constitutively promote the non-amyloidogenic pathway of APP cleavage and interact with ADAM10. *ACS Chem. Neurosci.* *4*, 130–140. .
- Dolmetsch, R.E., Xu, K., and Lewis, R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* *392*, 933–936. .
- Duhr, F., Déléris, P., Raynaud, F., Séveno, M., Morisset-Lopez, S., Mannoury la Cour, C., Millan, M.J., Bockaert, J., Marin, P., and Chaumont-Dubel, S. (2014). Cdk5 induces

constitutive activation of 5-HT<sub>6</sub> receptors to promote neurite growth. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 590–597. .

Dyachok, O., Isakov, Y., Sågetorp, J., and Tengholm, A. (2006). Oscillations of cyclic AMP in hormone-stimulated insulin-secreting beta-cells. *Nature* **439**, 349–352. .

Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–1272. .

Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A.W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., et al. (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat. Neurosci.* **8**, 1289–1291. .

Gupte, T.M., Malik, R.U., Sommese, R.F., Ritt, M., and Sivaramakrishnan, S. (2017). Priming GPCR signaling through the synergistic effect of two G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 3756–3761. .

Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2019). GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front. Pharmacol.* **10**, 125. .

Häfner, S., Adler, H.S., Mischak, H., Janosch, P., Heidecker, G., Wolfman, A., Pippig, S., Lohse, M., Ueffing, M., and Kolch, W. (1994). Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6696–6703. .

Hasbi, A., Fan, T., Alijaniam, M., Nguyen, T., Perreault, M.L., O’Dowd, B.F., and George, S.R. (2009). Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21377–21382. .

Heemskerk, N., Schimmel, L., Oort, C., van Rijssel, J., Yin, T., Ma, B., van Unen, J., Pitter, B., Huveneers, S., Goedhart, J., et al. (2016). F-actin-rich contractile endothelial pores prevent vascular leakage during leukocyte diapedesis through local RhoA signalling. *Nat. Commun.* **7**, 10493. .

Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., and Humphrey, P.P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* **46**, 157–203. .

Hwang, R., Shinkai, T., De Luca, V., Ni, X., Potkin, S.G., Lieberman, J.A., Meltzer, H.Y., and Kennedy, J.L. (2007). Association study of four dopamine D1 receptor gene polymorphisms and clozapine treatment response. *J. Psychopharmacol.* **21**, 718–727. .

Imanishi, A., Murata, T., Sato, M., Hotta, K., Imayoshi, I., Matsuda, M., and Terai, K. (2018). A Novel Morphological Marker for the Analysis of Molecular Activities at the Single-cell Level. *Cell Struct. Funct.* **43**, 129–140. .

Inoue, A., Raimondi, F., Kadji, F.M.N., Singh, G., Kishi, T., Uwamizu, A., Ono, Y., Shinjo, Y., Ishida, S., Arang, N., et al. (2019). Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell* **0**. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.044>.

Isberg, V., Mordalski, S., Munk, C., Rataj, K., Harpsøe, K., Hauser, A.S., Vroiling, B., Bojarski, A.J., Vriend, G., and Gloriam, D.E. (2016). GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* **44**, D356–D364. .

- Iversen, S.D., and Iversen, L.L. (2007). Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* **30**, 188–193. .
- Jain, R., Watson, U., Vasudevan, L., and Saini, D.K. (2018). Chapter Three - ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, A.K. Shukla, ed. (Academic Press), pp. 79–109.
- Jin, H., Oksenberg, D., Ashkenazi, A., Peroutka, S.J., Duncan, A.M., Rozmahel, R., Yang, Y., Mengod, G., Palacios, J.M., and O'Dowd, B.F. (1992). Characterization of the human 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 5735–5738. .
- Kawakami, K., and Noda, T. (2004). Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics* **166**, 895–899. .
- Kelly, M.A., Rubinstein, M., Asa, S.L., Zhang, G., Saez, C., Bunzow, J.R., Allen, R.G., Hnasko, R., Ben-Jonathan, N., Grandy, D.K., et al. (1997). Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D<sub>2</sub> receptor-deficient mice. *Neuron* **19**, 103–113. .
- King, M.V., Marsden, C.A., and Fone, K.C.F. (2008). A role for the 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptors in learning and memory. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 482–492. .
- Kroeze, W.K., Kristiansen, K., and Roth, B.L. (2002). Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr. Top. Med. Chem.* **2**, 507–528. .
- Kroeze, W.K., Sassano, M.F., Huang, X.-P., Lansu, K., McCorvy, J.D., Giguère, P.M., Sciaky, N., and Roth, B.L. (2015). PRESTO-Tango as an open-source resource for interrogation of the druggable human GPCRome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 362–369. .
- Kudo, T., Jeknić, S., Macklin, D.N., Akhter, S., Hughey, J.J., Regot, S., and Covert, M.W. (2018). Live-cell measurements of kinase activity in single cells using translocation reporters. *Nat. Protoc.* **13**, 155–169. .
- Li, X.X., Bek, M., Asico, L.D., Yang, Z., Grandy, D.K., Goldstein, D.S., Rubinstein, M., Eisner, G.M., and Jose, P.A. (2001). Adrenergic and endothelin B receptor-dependent hypertension in dopamine receptor type-2 knockout mice. *Hypertension* **38**, 303–308. .
- Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179–185. .
- Martel, J.C., and Gatti McArthur, S. (2020). Dopamine Receptor Subtypes, Physiology and Pharmacology: New Ligands and Concepts in Schizophrenia. *Front. Pharmacol.* **11**, 1003. .
- Maryu, G., Matsuda, M., and Aoki, K. (2016). Multiplexed Fluorescence Imaging of ERK and Akt Activities and Cell-cycle Progression. *Cell Struct. Funct.* **41**, 81–92. .
- Masuh, I., Balaji, S., Muntean, B.S., Skamangas, N.K., Chavali, S., Tesmer, J.J.G., Madan Babu, M., and Martemyanov, K.A. (2020). A Global Map of G Protein Signaling Regulation by RGS Proteins. *Cell* **0**. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.052>.
- Millan, M.J., Marin, P., Bockaert, J., and Mannoury la Cour, C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 454–464. .



- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., and Caron, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* *78*, 189–225. .
- Miura, H., Kondo, Y., Matsuda, M., and Aoki, K. (2018). Cell-to-Cell Heterogeneity in p38-Mediated Cross-Inhibition of JNK Causes Stochastic Cell Death. *Cell Rep.* *24*, 2658–2668. .
- Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* *72*, 8150–8157. .
- Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T., Ozaki, T., Kitabatake, A., Nagashima, K., and Matsuda, M. (1999). Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with Gai. *Nature* *400*, 891. .
- Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloepfer, A.M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T.M., Luo, B., Grenier, J.K., et al. (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* *124*, 1283–1298. .
- Monti, J.M. (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Med. Rev.* *15*, 269–281. .
- Nakamoto, C., Goto, Y., Tomizawa, Y., Fukata, Y., Fukata, M., Harpsøe, K., Gloriam, D.E., Aoki, K., and Takeuchi, T. (2021). A novel red fluorescence dopamine biosensor selectively detects dopamine in the presence of norepinephrine in vitro. *Mol. Brain* *14*, 173. .
- Nebigil, C.G., Hickel, P., Messaddeq, N., Vonesch, J.L., Douchet, M.P., Monassier, L., György, K., Matz, R., Andriantsitohaina, R., Manivet, P., et al. (2001). Ablation of serotonin 5-HT(2B) receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation* *103*, 2973–2979. .
- Nelson, D.E., Ihekweba, A.E.C., Elliott, M., Johnson, J.R., Gibney, C.A., Foreman, B.E., Nelson, G., See, V., Horton, C.A., Spiller, D.G., et al. (2004). Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* *306*, 704–708. .
- Niebert, M., Vogelgesang, S., Koch, U.R., Bischoff, A.-M., Kron, M., Bock, N., and Manzke, T. (2011). Expression and function of serotonin 2A and 2B receptors in the mammalian respiratory network. *PLoS One* *6*, e21395. .
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* *108*, 193–199. .
- Pedragosa-Badia, X., Stichel, J., and Beck-Sickinger, A.G. (2013). Neuropeptide Y receptors: how to get subtype selectivity. *Front. Endocrinol.* *4*, 5. .
- Perreault, M.L., Hasbi, A., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2014). Heteromeric dopamine receptor signaling complexes: emerging neurobiology and disease relevance. *Neuropsychopharmacology* *39*, 156–168. .
- Pietraszewska-Bogiel, A., Joosen, L., Chertkova, A.O., and Goedhart, J. (2020). Not So Dry After All: DRY Mutants of the AT1A Receptor and H1 Receptor Can Induce G-Protein-Dependent Signaling. *ACS Omega* <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03146>.
- Polouliakh, N., Nock, R., Nielsen, F., and Kitano, H. (2009). G-protein coupled receptor signaling architecture of mammalian immune cells. *PLoS One* *4*, e4189. .

- Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W.H., Bos, J.L., and Jalink, K. (2004). Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep.* *5*, 1176–1180. .
- Preinerger, A.M., and Hamm, H.E. (2004). G protein signaling: insights from new structures. *Sci. STKE* *2004*, re3. .
- Purvis, J.E., and Lahav, G. (2013). Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell* *152*, 945–956. .
- Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V., and Felšöci, M. (2011). Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol. Res.* *60*, 15–25. .
- Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M.C., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2007). D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 654–659. .
- Regot, S., Hughey, J.J., Bajar, B.T., Carrasco, S., and Covert, M.W. (2014). High-sensitivity measurements of multiple kinase activities in live single cells. *Cell* *157*, 1724–1734. .
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* *70*, 389–399. .
- Roberts, D.J., and Strange, P.G. (2005). Mechanisms of inverse agonist action at D2 dopamine receptors. *Br. J. Pharmacol.* *145*, 34–42. .
- Rojas, R.J., Yohe, M.E., Gershburg, S., Kawano, T., Kozasa, T., and Sondek, J. (2007). Gαq Directly Activates p63RhoGEF and Trio via a Conserved Extension of the Dbl Homology-associated Pleckstrin Homology Domain. *J. Biol. Chem.* *282*, 29201–29210. .
- Rønnekleiv, O.K., Fang, Y., Zhang, C., Nestor, C.C., Mao, P., and Kelly, M.J. (2014). Research resource: Gene profiling of G protein-coupled receptors in the arcuate nucleus of the female. *Mol. Endocrinol.* *28*, 1362–1380. .
- Rubinstein, M., Phillips, T.J., Bunzow, J.R., Falzone, T.L., Dziewczapolski, G., Zhang, G., Fang, Y., Larson, J.L., McDougall, J.A., Chester, J.A., et al. (1997). Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* *90*, 991–1001. .
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 19–34. .
- Sariñana, J., and Tonegawa, S. (2016). Differentiation of forebrain and hippocampal dopamine 1-class receptors, D1R and D5R, in spatial learning and memory. *Hippocampus* *26*, 76–86. .
- Sasamori, H., Asakura, T., Sugiura, C., Bouchekioua, Y., Nishitani, N., Sato, M., Yoshida, T., Yamasaki, M., Terao, A., Watanabe, M., et al. (2022). Behavioral characteristics of dopamine D5 receptor knockout mice. *Sci. Rep.* *12*, 6014. .
- Seeman, P., Lee, T., Chau-Wong, M., and Wong, K. (1976). Antipsychotic drug doses and

neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261, 717–719. .

Shcherbakova, D.M., Baloban, M., Emelyanov, A.V., Brenowitz, M., Guo, P., and Verkhusha, V.V. (2016). Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for multiscale imaging. *Nat. Commun.* 7, 12405. .

Sibley, D.R. (1999). NEW INSIGHTS INTO DOPAMINERGIC RECEPTOR FUNCTION USING ANTISENSE AND GENETICALLY ALTERED ANIMALS1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.313>.

Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* 1, 51–66. .

Simpson, E.H., and Kellendonk, C. (2017). Insights About Striatal Circuit Function and Schizophrenia From a Mouse Model of Dopamine D2 Receptor Upregulation. *Biol. Psychiatry* 81, 21–30. .

Siuda, E.R., McCall, J.G., Al-Hasani, R., Shin, G., Il Park, S., Schmidt, M.J., Anderson, S.L., Planer, W.J., Rogers, J.A., and Bruchas, M.R. (2015). Optodynamic simulation of  $\beta$ -adrenergic receptor signalling. *Nat. Commun.* 6, 8480. .

Snyder, S.H., Taylor, K.M., Coyle, J.T., and Meyerhoff, J.L. (1970). The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am. J. Psychiatry* 127, 199–207. .

Sugiyama, K., Tago, K., Matsushita, S., Nishikawa, M., Sato, K., Muto, Y., Nagase, T., and Ueda, H. (2017). Heterotrimeric G protein G $\alpha$ s subunit attenuates PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, by direct interaction. *Cell. Signal.* 32, 115–123. .

Suzuki, K., Simpson, K.A., Minnion, J.S., Shillito, J.C., and Bloom, S.R. (2010). The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr. J.* 57, 359–372. .

Suzuki, T., Iwata, N., Kitamura, Y., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Ikeda, M., Nishiyama, T., Kamatani, N., and Ozaki, N. (2003). Association of a haplotype in the serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor gene (HTR4) with Japanese schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 121B, 7–13. .

Syrovatkina, V., Alegre, K.O., Dey, R., and Huang, X.-Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* 428, 3850–3868. .

Tchernychev, B., Ren, Y., Sachdev, P., Janz, J.M., Haggis, L., O'Shea, A., McBride, E., Looby, R., Deng, Q., McMurry, T., et al. (2010). Discovery of a CXCR4 agonist pepducin that mobilizes bone marrow hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22255–22259. .

Tecott, L.H., Sun, L.M., Akana, S.F., Strack, A.M., Lowenstein, D.H., Dallman, M.F., and Julius, D. (1995). Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT<sub>2c</sub> serotonin receptors. *Nature* 374, 542–546. .

Tesmer, J.J.G. (2009). Chapter 4 Structure and Function of Regulator of G Protein Signaling Homology Domains. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Academic Press), pp. 75–113.

- Thevenaz, P., Ruttimann, U.E., and Unser, M. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process.* 7, 27–41. .
- van Unen, J., Reinhard, N.R., Yin, T., Wu, Y.I., Postma, M., Gadella, T.W.J., and Goedhart, J. (2015). Plasma membrane restricted RhoGEF activity is sufficient for RhoA-mediated actin polymerization. *Sci. Rep.* 5, 14693. .
- UniProt Consortium (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, D480–D489. .
- Wang, W., Qiao, Y., and Li, Z. (2018). New Insights into Modes of GPCR Activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 367–386. .
- Weigert, M., Schmidt, U., Haase, R., Sugawara, K., and Myers, G. (2019). Star-convex Polyhedra for 3D Object Detection and Segmentation in Microscopy.
- Wei Yuan, A.L.B. (2007). Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. *BMC Pregnancy Childbirth* 7, S10. .
- Welter-Stahl, L., da Silva, C.M., Schachter, J., Persechini, P.M., Souza, H.S., Ojcius, D.M., and Coutinho-Silva, R. (2009). Expression of purinergic receptors and modulation of P2X7 function by the inflammatory cytokine IFN $\gamma$  in human epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788, 1176–1187. .
- Wise, R.A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 483–494. .
- Yohn, C.N., Gergues, M.M., and Samuels, B.A. (2017). The role of 5-HT receptors in depression. *Mol. Brain* 10, 28. .
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., and Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat. Methods* 6, 363–369. .
- Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y.-F., Nakano, M., Abdelfattah, A.S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., et al. (2011). An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca<sup>2+</sup> Indicators. *Science* 333, 1888–1891. .