

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07122

研究課題名（和文）心肥大の退縮を担う分子の探索とその分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Acquisition of functional molecules involving the regression of heart hypertrophy

研究代表者

長坂 明臣（Nagasaka, Akiomi）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：10723877

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Gタンパク質のシグナル活性を操作できるデザイナー受容体（DREADD）のうち、G<sub>13</sub>選択的に活性化させるDREADDを作製を目指した。様々な実験の結果、G<sub>13</sub>に選択性が強いDREADDが作製できたものの、G<sub>13</sub>のみ選択的DREADDの作製には至らなかった。しかしながら、本研究過程において、G<sub>13</sub>のDREADDの候補受容体の評価系の確立ができたことから、今後のGタンパク質の研究において、G<sub>13</sub>選択的なシグナル解析やその評価において非常に有用な実験系であることから、その研究的利用価値は高いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は、様々な疾患や病態の原因受容体であることから、GPCRを標的とした治療薬の開発が数多く進められている。このGPCRのシグナルを伝えるのが、共役タンパク質であるGタンパク質である。Gタンパク質の中でも、近年、様々な疾患においてG<sub>13</sub>の関与が示唆される一方で、その詳細なメカニズムは明らかになっていなかった。そこで、今回作製したG<sub>13</sub>の活性を特異的に*in vitro*で評価するシステムは、今後のG<sub>13</sub>のシグナル解明などにおいて有用であると思われる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to generate a G<sub>13</sub>-selective designer receptor (DREADD). As a result of examination, it was successful to create a G<sub>13</sub> preferable receptor, however, truly G<sub>13</sub> DREADD could not be produced. However, in this research process, since the evaluation system for G<sub>13</sub> specific activity *in vitro* was developed, it is a very valuable experimental system for G<sub>13</sub> selective signal analysis and its evaluation in future. Therefore, this system is considered to be high for G<sub>13</sub> protein research.

研究分野：薬理学

キーワード：Gタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

慢性的な高血圧などにより心臓への負荷が増加すると、心臓は心筋細胞を肥大させることで、ポンプ機能を代償しようとし、心室壁が肥厚する(心肥大)。心筋の肥大化には、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)を介したシグナルの活性化が強く関与しており、その活性化は、GPCRに共役するGタンパク質ファミリーのG13またはGqによって担われる。この心肥大は心臓への圧負荷がなくなると退縮するが、その退縮メカニズムは全く不明である。近年、DREADD(Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs)システムという、Gタンパク質を介したシグナルのON/OFFを自在に制御できるシステムが開発された。DREADDとは、遺伝子改変した人工GPCRのことで、Clozapine N-oxide(CNO)によってのみ活性化され、内在性リガンドには反応しない。これにより、発現させた特定の細胞のみでG $\alpha$ タンパク質を活性化させるなどの操作が可能となり、生体内の生理的現象を解析するのに用いられている。現在、G $\alpha_q$ 、G $\alpha_i$ 、G $\alpha_s$ 、G $\alpha_{12}$ のDREADDは作製されているが、G $\alpha_{13}$ のDREADDは存在しておらず、G $\alpha_{13}$ のシグナル解析や病態との関連性を調べるためには、G $\alpha_{13}$ のDREADDの作製が必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

G $\alpha_{13}$ のDREADDを作製することで、G $\alpha_{13}$ が関与する心肥大やその退縮などの病態における、G $\alpha_{13}$ が担う生理的機能の解析が可能になると考え、本研究を開始した。

## 3. 研究の方法

### ・キメラ受容体の作製

既知のDREADDの作製方法に則り、G $\alpha_q$ のDREADDを基に細胞内第3ループやC末端領域を他のGPCRと組み換えたキメラ受容体についてデータベースを利用して、G $\alpha_{13}$ に対する共役性を予測した(参考文献1)。その結果のうちG $\alpha_{13}$ と共役すると予測されたGPCRを用いたキメラ受容体を作製した。

1. A. Inoue *et al.*, "Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs," *Cell*, vol. 177, no. 7, pp. 1933–1947, 2019.

### ・Gタンパク質の選択性の評価

Gタンパク質の活性化を直接検出できるNanoBiTアッセイを用いて、従来のDREADD及びキメラ受容体のGタンパク質の選択性を評価した。

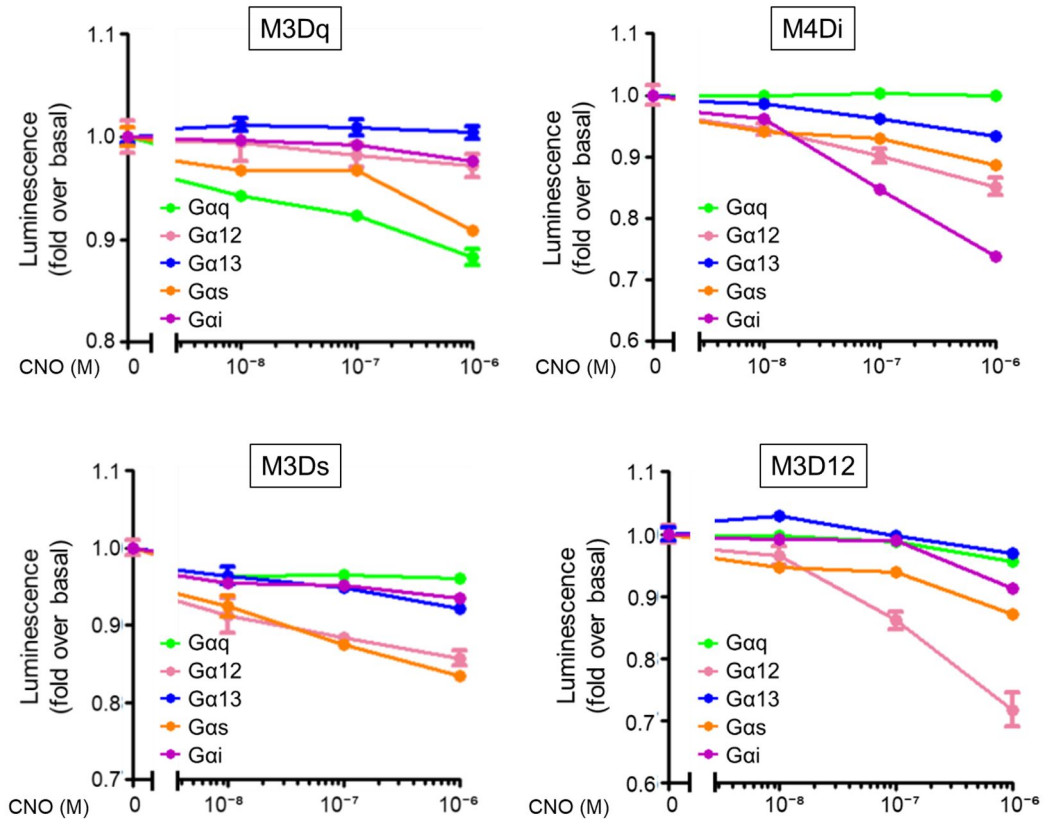
### ・下流シグナル活性化の評価系の構築と評価

G $\alpha_q$ 、G $\alpha_{12}$ 、G $\alpha_{13}$ の下流シグナルであるRhoシグナルの活性化を検出できるSRF-REルシフェラーゼアッセイを用いて、作製したキメラ受容体がRhoシグナルを活性化できるか評価した。この評価系を構築するため、まずはCrispr-Cas9システムによりG $\alpha_{13}$ 欠損HEK293A細胞株を樹立した。その後、野生株とG $\alpha_{13}$ 欠損細胞株を比較検証することにより、作製したキメラ受容体の活性化がG $\alpha_{13}$ を介しているかを評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 従来のDREADDの評価によりGタンパク質の選択性基準の設定

まず、これまでに報告されているDREADDの選択性についてNanoBiTルシフェラーゼアッセイを用いて評価した。この実験系は、G $\alpha$ タンパク質とG $\beta$ タンパク質に分割型ルシフェラーゼを融合したものを用いた。これにより、Gタンパク質が非活性化状態時では分割型ルシフェラーゼが近接するため発光が検出されるが、Gタンパク質が活性化すると、G $\alpha$ とG $\beta\gamma$ の解離に伴い発光が減弱されることから、共役するG $\alpha$ タンパク質の種類が解離値によりその程度が判別できる。つまり、NanoBiTルシフェラーゼアッセイの評価系は、DREADDの評価としてGタンパク質の活性化を直接検出し、Gタンパク質の選択性を評価することは重要である。そこで、従来のDREADDのM3Dq、M4Di、M3Ds、M3D12について測定したところ、それぞれの目的のGタンパク質に対する共役性が最も高いことが確認された一方で、M3DqはG $\alpha_s$ 、M3DsはG $\alpha_{12}$ に対しても共役性が高いことが明らかになった[図1]。従って、M4DiやM3D12のようにGタンパク質の選択性があれば目的のG $\alpha_{13}$ のDREADDであるという判断基準とした。



Designer receptor	Objective G protein	Other G protein (Max)	Objective / Other Ratio
M3Dq	0.12 ± 0.013 (Gaq)	0.09 ± 0.005 (Gas)	1.3 ± 0.16
M4Di	0.26 ± 0.005 (Gai)	0.15 ± 0.025 (Ga12)	1.8 ± 0.35
M3Ds	0.17 ± 0.004 (Gas)	0.14 ± 0.017 (Ga12)	1.2 ± 0.13
M3D12	0.28 ± 0.048 (Ga12)	0.13 ± 0.005 (Gas)	2.2 ± 0.38

図 1. NanoBiT ルシフェラーゼアッセイによる既存 DREADD 活性評価

各 DREADD と NanoBiT 構成タンパク質を共発現させた HEK293A 細胞に、各種濃度の CNO で刺激した後、発光強度を測定した(n=4)。

## (2). Ga13 の DREADD の評価系を確立

NanoBiT システムは直接 G タンパク質の活性化を評価できるが、下流のシグナルを活性化に関しては評価できない。そこで、新たにキメラ受容体を作製するにあたり、キメラ受容体の Ga13 選択性を評価する実験系の改良を試みた。Ga13 は、Rho の活性化を誘導することが知られていることから、Ga13 欠損細胞株とルシフェラーゼレポーターアッセイを組み合わせれば、Ga13 に対する選択性のみならず、Ga13 を介した下流のシグナルの誘導も同時に評価が行えると考えた。そこで、CRISPR-Cas9 システムにより Ga13 を欠損させた HEK293A 細胞株を複数樹立の後、Ga13 の活性を特異的に評価できる細胞株を選定した。これにより、Ga13 を介した下流シグナルの活性化を検出できる実験系を確立した。

## (3). キメラ受容体の作製と評価

新たにキメラ受容体を作製するうえで、Ga12 のデザイナー受容体の作製方法からデータベースを活用することにした。まず、Gaq のデザイナー受容体を基に Ga13 との共役について重要であるとされる細胞内第 3 ループを様々な GPCR と組み換えたキメラ受容体についてデータベースを用いて検討を行った (図. 2 左)。検討を行った結果、Ga13 の共役性の予測値が共役すると予測される 0.5 以上を示した約 20 種類のキメラ受容体を作製した (図. 2 右)。これらのキメラ受容体について、ルシフェラーゼレポーターアッセイ並びに NanoBiT をアッセイ用いて、作製キメラ受容体の Ga13 選択性を検証したが、Ga13 特異的な DREADD の作製には至らなかった。

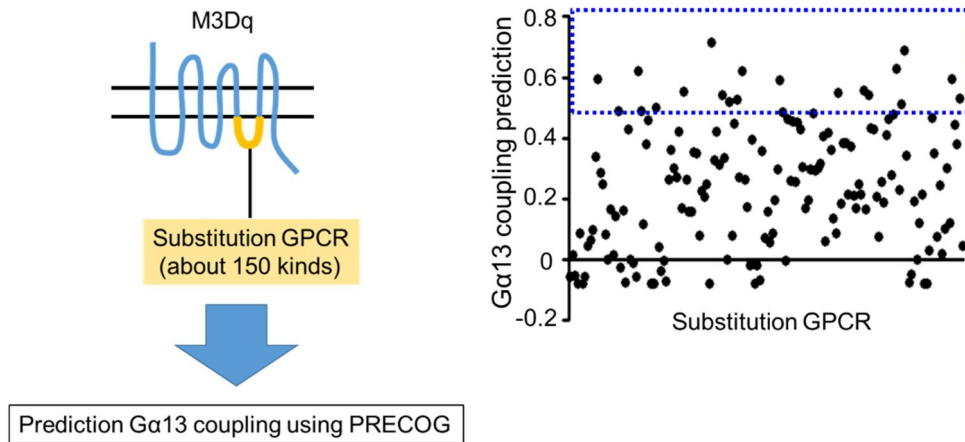


図 2.細胞内第 3 ループを置換した際の GPCR データベース (PRECOG) を利用した  $G\alpha 13$  共役シミュレーション

M3Dq をベースにし、細胞内第 3 ループを  $G\alpha 13$  と共役する報告がある上位約 150 種に置換した際、 $G\alpha 13$  との共役性があると予想されたキメラ受容体( 0.5)を作製した。

$G\alpha$  タンパク質の選択性に変化をもたらす GPCR の領域は、細胞内第 3 ループ以外にも C 末端領域が知られている。そこで、 $G\alpha q$  の DREADD を基に、 $G\alpha$  タンパク質との共役性に重要な細胞内第 3 ループと C 末端領域を他の GPCR と組み換えたキメラ受容体を作製した。作製したキメラ受容体が、選択的に  $G\alpha 13$  を介して Rho シグナルを活性化できるかについて、野生型株と  $G\alpha 13$  欠損細胞株を用いて比較検証した。その結果、CNO 刺激により誘導された Rho シグナルの活性化は、 $G\alpha 13$  欠損細胞株においてシグナルが減弱していたものの、依然シグナルが残存していた( 図 3)。従って、これらキメラ受容体は、 $G\alpha 13$  に対する選択性が弱いと考えられ、 $G\alpha 13$  の DREADD とするには不十分であることが判明した。

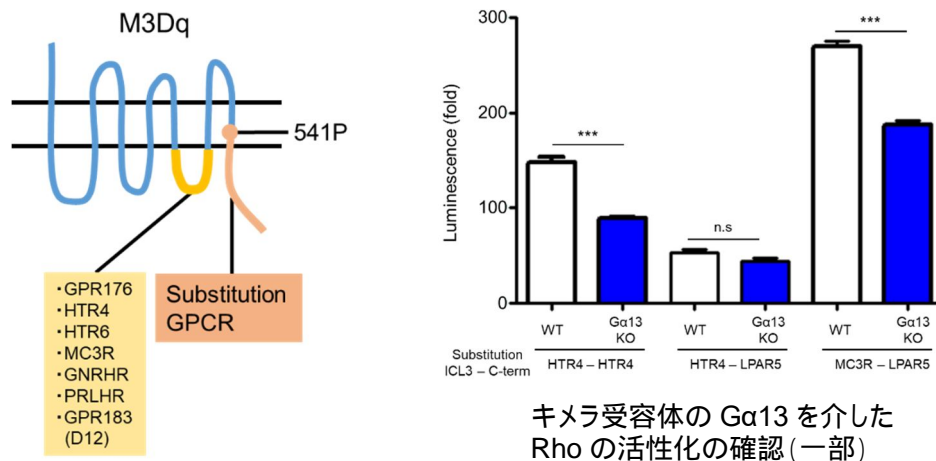


図 3.細胞内第 3 ループと C 末端を置換した際の G タンパク質の選択性の評価

#### まとめ

様々な検証の結果、 $G\alpha 13$  のみ選択的な DREADD の作製には至らなかった。しかしながら、本研究過程において、 $G\alpha 13$  の DREADD の候補受容体の評価系の確立ができたことから、今後の G タンパク質の研究において、 $G\alpha 13$  選択的なシグナル解析やその評価において非常に有用な実験系であることから、その研究的利用価値は高いと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horii Yuma, Nakaya Michio, Ohara Hiroki, Nishihara Hiroaki, Watari Kenji, Nagasaka Akiomi, Nakaya Takeo, Sugiura Yuki, Okuno Toshiaki, Koga Tomoaki, Tanaka Akira, Yokomizo Takehiko, Kurose Hitoshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Leukotriene B 4 receptor 1 exacerbates inflammation following myocardial infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 8749 ~ 8763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202000041R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hironaka Takanori, Ueno Tomoyuki, Mae Kyosuke, Yoshimura Chikashi, Morinaga Takumi, Horii Yuma, Nagasaka Akiomi, Kurose Hitoshi, Nakaya Michio	4. 巻 529
2. 論文標題 Drebrin is induced during myofibroblast differentiation and enhances the production of fibrosis-related genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 224 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.110	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takizawa Noburo, Hironaka Takanori, Mae Kyosuke, Ueno Tomoyuki, Horii Yuma, Nagasaka Akiomi, Nakaya Michio	4. 巻 561
2. 論文標題 GPRC5B promotes collagen production in myofibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 180 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.035	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura Chikashi, Nagasaka Akiomi, Kurose Hitoshi, Nakaya Michio	4. 巻 168
2. 論文標題 Efferocytosis during myocardial infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa051	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasai Kotaro, Horii Yuma, Hironaka Takanori, Mae Kyosuke, Ueno Tomoyuki, Nagasaka Akiomi, Nakaya Michio	4. 巻 4
2. 論文標題 Increased Expression of Heparan Sulfate 6-O-Sulfotransferase-2 Promotes Collagen Production in Cardiac Myofibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.4.3_85	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 長坂 明臣
2. 発表標題 The roles of T-cell death-associated gene 8 (TDAG8), a proton-sensing GPCR, in myocardial infarction
3. 学会等名 Translational Research on Metabolic and Inflammatory Diseases and Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野瑠星、伊藤峻太、渡健治、長坂明臣、仲矢道雄、黒瀬等
2. 発表標題 プロトン感知性GPCR (GPR4) に着目した心筋梗塞時におけるpH低下の生理的影響の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------