

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16349

研究課題名(和文)"GPCR in the gut"-イメージング技術の開発と腸内細菌との相互作用

研究課題名(英文)Development of imaging technique for GPCR activation in the gut

研究代表者

堀 亜紀 (Hori, Aki)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：90825150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： ショウジョウバエ個体内でのGPCR活性化をTANGO法を改変することによって試みようと考えた。GPCRやアレクチンについてヒトの遺伝子を使い、二種類のヒトGPCRを用いて、ショウジョウバエのS2細胞にTANGOコンストラクトをトランスフェクションして検討した。その結果、リガンド濃度依存的な活性化を検出することができた。また、リガンド依存的なGPCRの活性化を腸管で観察可能なことを示唆するデータを得た。ヒトGPCRの活性化をショウジョウバエで検出する実験系はこれまでに無いものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトGタンパク質共役受容体(GPCR)は極めて有望な創薬ターゲットである。したがって、医薬品候補となる化合物が実際に体内で効果を示すか評価するための動物個体実験系の開発が望まれている。本研究開発では、GPCRの活性化程度をショウジョウバエ個体内で検出して評価可能な新規実験系を確立することを目的して研究を進めた。その結果、すくなくともショウジョウバエの培養細胞ではリガンド濃度依存的な活性化を検出することができた。ショウジョウバエ個体での検出法をさらに改良し、今後は、本研究において確立したGPCR活性化検出系が薬剤等のスクリーニング系として利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)： We tried to development experimental technique that enables researchers to detect activation of G protein-coupled receptors (GPCR) in the gut. In particular, we intended to set up the method to detect the activation of human GPCR in the gut of *Drosophila melanogaster*. We utilized modified TANFG system to observe GPCR activation, and as a proof-of-principle, we selected two human GPCR for this project. We successfully constructed transgenic vectors for TANGO system, and firstly we examined whether the constructs work in *Drosophila* culture cells. We are able to detect human GPCR in a ligand concentration-dependent manner in cell lines. Next, we generated transgenic flies that contain these constructs and produced flies to perform TANGO assay. Though we need to carefully confirm reproducibility, we are able to detect GPCR activation in the gut of *Drosophila*.

研究分野：腸管免疫

キーワード：ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病は公衆衛生上の世界的な主要課題であり、関与する因子として腸内細菌が果たす役割について関心が高まってきている。例えば、「メタボマウス」の腸内細菌叢を無菌マウスに定着させるとメタボリックシンドロームが誘導される (*Science*, 328, 228) ことが示されている。しかし、宿主の消化・代謝や摂食行動に関わる腸内細菌種はほとんどわかっておらず、宿主との相互作用メカニズムは不明である。

消化管内分泌細胞は、消化管上皮層のわずか数%を占めるマイナーな細胞であり、食餌性脂質や糖質を G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor : GPCR) により感知することで様々なペプチドホルモンを分泌することが知られている。興味深いことに、消化管ホルモンと腸内細菌の持つ機能には興味深いオーバーラップが認められる。すなわち、腸内細菌叢も消化管ペプチドホルモンも、消化や食欲や代謝といった宿主の機能を調節する。これは、腸内細菌が宿主に与える影響の一部は消化管内分泌細胞を介していることを示唆するが、それを示唆・証明する研究はまだない。

ショウジョウバエの腸内細菌も宿主の栄養・成長・代謝に関与していることが複数報告されており、ショウジョウバエから単離・同定された宿主の成長に影響を与える腸内細菌が、マウスでも類似の機能を示すことが最近報告された (*Science*, 351, 854)。そして、消化管内分泌細胞の機能は、ショウジョウバエから哺乳類に至るまで、進化的に高度に保存されている (*J Clin Endocrinol Metab*, 101, 778)。実際、ショウジョウバエの消化管内分泌細胞は哺乳類と同様に、ペプチドホルモンを分泌することにより、摂食行動、腸管構造の維持、遠隔器官の代謝酵素発現に影響を与えることがよく知られている。さらに、マウス消化管ホルモンのニューロテンシンがショウジョウバエでも同じ働きを示すことが最近報告された (*Nature*, 533, 411)。加えて、ショウジョウバエでも、消化管ペプチドホルモンの発現は GPCR によって調節される。ここから申請者は、ハエの消化管を使って哺乳類分子の機能解析を行うことができると着想した。

GPCR はヒトのゲノムにおいて約 800 種類からなる最大の遺伝子ファミリーを形成している。さまざまな組織に発現する GPCR は内因性および外因性のリガンドを認識し、あらゆる生命現象に関与している。それゆえ GPCR は極めて重要な創薬標的である。興味深いことに、消化管には多くの機能未知 GPCR が発現しており、何らかの「外部環境」を認識していると推察される。生物学的にも臨床的にも重要な受容体群であるが、その活性化を *in vivo* で観察する手法は立ち後れており、活性化のイメージング技術開発は喫緊の課題であった。

2. 研究の目的

ヒト G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor : GPCR) は極めて有望な創薬ターゲットである。また、消化管に発現する GPCR の機能解析は腸内細菌と宿主の相互作用を理解する重要な鍵であると考えられる。具体的には、「GPCR が腸内細菌由来の低分子化合物を認

識して宿主の生理機能を調節している」との作業仮説を検証したいと考えた。この作業仮説を検証することにより、腸内細菌のさまざま違いを宿主が認識して制御するメカニズムの原理の解明に寄与することになると考えた。そこで本研究では、GPCR の活性化程度をショウジョウバエ個体内で検出して評価可能な新規実験系を確立することを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ個体内での GPCR 活性化は TANGO 法を改変することによって試みようと考えた。TANGO 法とは、アレクチンが GPCR に結合したときのみ標的細胞で蛍光タンパク質が発現するような人工シグナル伝達系である。この人工シグナル伝達系は 2 種類の人工タンパク質よりなる。ひとつは GPCR を TEV プロテアーゼの切断配列を介し転写因子と結合させた融合タンパク質、もうひとつはアレクチンと TEV プロテアーゼとの融合タンパク質である。リガンドが GPCR と転写因子との融合タンパク質に結合すると、アレクチン-TEV プロテアーゼ融合タンパク質が GPCR の側に結合し転写因子とのあいだにある TEV プロテアーゼ切断配列を切断する。すると、転写因子が遊離して核移行し、GFP など蛍光タンパク質をコードするレポーター遺伝子を発現させる。この人工シグナル伝達系を用いることで、リガンドと GPCR の結合程度を評価することが可能となる。

この TANGO 法を改変し、GPCR やアレクチンについてヒトの遺伝子を用いることで、経口投与した化合物や天然物抽出液が腸管内で GPCR と結合し、その結合程度を評価することができると想定して研究を進めた。そして、このようなレポーターショウジョウバエの作出を行った。ヒト GPCR である Dopamine receptor D4 (DRD4) と Free fatty acid receptor 2 (FFR2) の二種類を用いてトランスジェニックショウジョウバエの作出を進めた。いずれの GPCR もリガンドが既知であり、DRD4 はリガンドとの親和性が極めて高く、FFR2 は比較的弱い親和性を持つ。この 2 種類の GPCR を有するトランスジェニックショウジョウバエを使って、リガンドと GPCR の相互作用を検出する本手法の感度を評価できると考えたためである。

4. 研究成果

本研究において、ヒト GPCR である Dopamine receptor D4 (DRD4) と Free fatty acid receptor 2 (FFR2) の二種類を用いて TANGO 法により活性化を検出するコンストラクトの作成した。すなわち、GPCR-TEVp cleavage site-LexA、 β -Arrestin-TEV protease、lexAop-nanoLuc、の 3 つのコンポーネントに分けたトランスジェニックショウジョウバエ用ベクターを構築し、これを完了した。作成したコンストラクトを胚へのインジェクションによりトランスジェニックショウジョウバエの作出を行いこれに成功し、必要なショウジョウバエ系統の作出がすべて完了した。さらに、作出ショウジョウバエ系統を用いて TANGO 法を行うための交配を行い、ほぼ完了した。

受容体活性化検出のコンストラクトについて、DRD4 受容体 (リガンドは Dopamin) の活性化を検出するため、ショウジョウバエの S2 細胞にコンストラクトをトランスフェクションして検討した。その結果、リガンド濃度依存的な活性化を検出することができた。FFR2 受容体について

も、強い活性化を誘導する条件を見出すことはできなかったが、リガンド刺激により統計的に有意な活性化を S2 細胞において検出することができた。ヒト GPCR の活性化をショウジョウバエ培養細胞で検出できたという報告は少ないため、新しい成果である。

さらに、受容体活性化をハエ個体で検出するため、ヒト GPCR の TANGO システムを発現するハエを用いてリガンドを摂食させ、全身のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、現在慎重に再現性を確認しているところではあるが、リガンド依存的な受容体活性化を検出できる可能性を示唆するデータを得た。ヒト GPCR の活性化をショウジョウバエ個体の腸管で検出できたという報告はまだ無いため、新しい成果につながることを期待できる。

今後の展望として、本実験系を用いてヒト消化管に発現する GPCR について、ショウジョウバエ腸管にて腸内細菌が産生するリガンドによる活性化を検出し、「GPCR が腸内細菌由来の低分子化合物を認識して宿主の生理機能を調節している」との仮説を検討していきたい。消化管内分泌細胞に発現する GPCR が腸内細菌によって産生されるさまざまな代謝産物を認識し、その結果消化管ペプチドホルモン分泌が制御されて宿主の代謝・摂食行動が変化すると研究代表者は予想している。そこで研究代表者らは、消化管内分泌細胞に発現している GPCR を腸内細菌由来代謝産物の受容体候補とし、無菌マウスを用いて RNA-sequence (RNA-seq) による遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、GPCR の受容体 A が消化管内分泌細胞の一種である K 細胞に選択的に高発現しており、ヒトのホモログもほぼ同じ一次構造を有していることを見出した。そこで今後は受容体 A を標的として、本研究において確立した *in vivo* での GPCR 活性化検出系を用いて、リガンドやアゴニストの探索を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 1. Tsukada K, Shinki S, Kaneko A, Murakami K, Irie K, Murai M, Miyoshi H, Dan S, Kawaji K, Hayashi H, Kodama E, Hori A, Salim E, Kuraishi T, Hirata N, Kanda Y, Asai T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Synthetic biology based construction of biological activity-related library focused on fungal decalin-containing diterpenoid pyrones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15664-4.	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 2. Nonaka S†, Salim E†, Kamiya K*, Hori A, Nainu F, Asri RM, Masyita A, Nishiuchii T, Takeuchi S, Kodera N*, Kuraishi T*	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular and functional analysis of pore-forming toxin Monalysin from entomopathogenic bacterium Pseudomonas entomophila	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.00520.	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 該当する

1. 著者名 4. Benderli NC†, Ogai K†, Lloyd YM, Arios JP, Jiyarom B, Awanakam AH, Esemu LF, Hori A, Megnekou R, Leke RGF, Kuraishi T*, Okamoto S*, Ekali GL	4. 巻 13
2. 論文標題 Feasibility of microbial sample collection on the skin from people in Yaounde, Cameroon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Discov Ther.	6. 最初と最後の頁 360-364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2019.01075	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------