

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710247

研究課題名(和文)新規Gタンパク質共役受容体リガンド探索システムの開発とその応用

研究課題名(英文)Development of a novel ligand screening system for G protein-coupled receptors and its application

研究代表者

飯塚 怜(Iizuka, Ryo)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90541954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)は、創薬研究における最も重要な標的であり、新薬候補となるリガンドの探索が精力的に行われている。しかし、これまで行われてきた「化合物ライブラリーの中からリガンドをスクリーニングする」アプローチには様々な問題点が存在し、リガンド探索が立ち行かなくなってきている。そこで、この現状を打破する新たな方法論として「エマルジョンを利用したGPCR作動性ペプチドリガンド創出システム」を考案した。本研究を通じて、このシステムの要素技術の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptors (GPCRs) are particularly important drug targets. Thus, intense efforts have been devoted to screening novel ligands for GPCRs, which can lead to potential drug candidates. However, for many GPCRs, such efforts have failed to yield desired results. To overcome the problem, I envisioned a directed evolution system to generate agonistic peptides for GPCRs using water-in-oil emulsions. In this study, I established basic techniques for efficient implementation of the system.

研究分野：生物物理学

キーワード：Gタンパク質共役受容体 進化分子工学 出芽酵母 マイクロ流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、外界からの情報は主に細胞膜上の「受容体」と呼ばれるタンパク質を介して細胞内に伝えられる。Gタンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)は、細胞膜上に存在する受容体の1つである。GPCRは特異的な分子、すなわちリガンド(アミノ酸、生体アミン、ペプチド、脂質など)と結合すると構造変化を引き起こし、三量体Gタンパク質を介した細胞内シグナル伝達経路を駆動する。その結果、細胞の増殖、分化、形態変化などが誘起される。

GPCRは創薬研究の対象として非常に重要な存在であり、世界で市販されている医薬品の約半数がGPCRを標的としている。また、ヒトには内因性のリガンドが同定されていないGPCR(オーファンGPCR)が100種類程度存在しており、創薬ターゲットとしてのGPCRのポテンシャルは依然として高い。このため、現在も世界中の製薬会社・大学がしのぎを削り、GPCRの機能を制御するリガンドの創出・探索を進めている。

リガンド探索を実施するにあたり必須となるのが、リガンド候補のライブラリーとそのアッセイ系である。大手製薬会社は 10^9 種を超える化合物ライブラリーを独自に保有しているが、その大部分は低分子化合物である。GPCRの中には低分子化合物と強く結合できないものが多く、リガンドの取得は困難を極めている。またアッセイ系は、標的とするGPCRを動物培養細胞に発現させ、リガンド候補を作用させた際に起こる細胞の変化を観測することを基本にしている。このため、細胞内在性の受容体やシグナル伝達経路の効果を排除することができず、標的GPCRに特異的に作用しているのかがわかりにくい。以上より、従来とは異なるアプローチで、GPCRに対するリガンドを創出・探索するシステムが必要であると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者は、「*in vitro* compartmentalization」と呼ばれる進化分子工学の手法と「出芽酵母を用いたGPCRリガンドアッセイ法」を組み合わせ、標的GPCRに対するペプチドリガンドを創出することを考えた。リガンドをペプチドに設定したのは、「大半のGPCRがペプチドをリガンドとしている」、「配列によって様々な柔軟な構造を取り得るため、ペプチド以外をリガンドとするGPCRに対するリガンドの創出も可能である」、「容易に調製可能なDNAのライブラリーを翻訳するだけで、多様性に富んだペプチドライブラリーが得られる」といった理由からである。また出芽酵母を用いたリガンドアッセイ系を利用することで、動物培養細胞を用いた際に起こる問題を回避できると考えた。そこで本研究で

は、GPCRを作動するペプチドリガンドを効率よく創出するシステムを構築し、それを実践することを目指した。

3. 研究の方法

マイクロ流体デバイスを用いて、ペプチドをコードするDNAを多数提示した磁気ビーズ(事前にエマルジョンPCRにより調製する)、再構成型無細胞タンパク質合成系、標的GPCRを発現する出芽酵母をWater-in-oil(W/O)型エマルジョン(直径: ~20 μm)内に封入する(図1上段)。この出芽酵母は、内在性のGPCRであるSte2下流のシグナル伝達経路が遺伝子工学的に改変されており、リガンドがGPCRを作動させると蛍光タンパク質(ZsGreen)を発現する(図2)。W/O型エマルジョン内では、DNA配列に応じたペプチドが合成され、その活性評価が行われる。標的GPCRを作動するペプチドが合成されれば、酵母がZsGreenを発現し、蛍光を放つようになる(図1中段)。

次に、蛍光性の酵母を内包するエマルジョンを回収し(図1下段)、エマルジョン内のDNAを増幅、配列確認後、ランダム変異を導入して更なる探索ラウンドへと投入する。

以上の操作を繰り返すことで、標的GPCRを作動させるペプチドリガンドが簡便、かつ効率的に取得できると考えた。

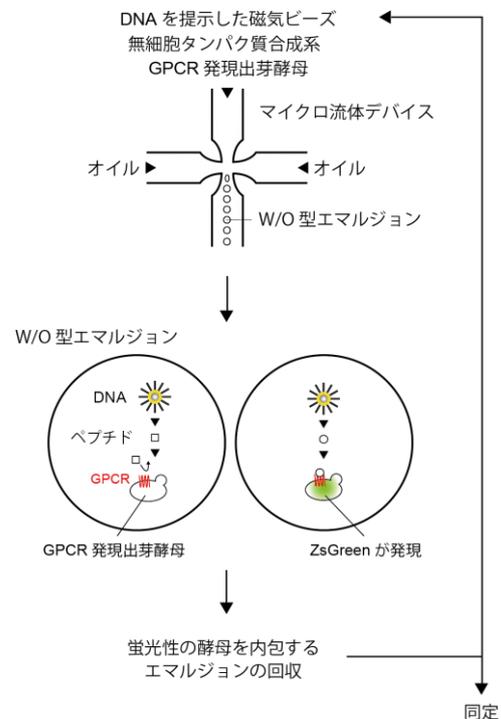


図1 GPCR 作動性ペプチドリガンドの創出システムの概要

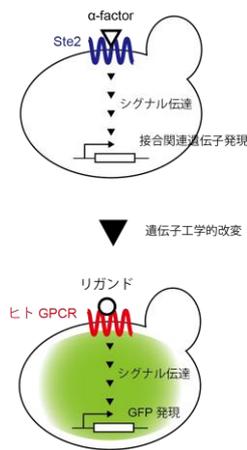


図2 出芽酵母を利用した GPCR リガンドアッセイ

4. 研究成果

本研究を通じて、GPCR 作動性ペプチドリンガンド創出システムの要素技術を確認することに成功した。以下に、その成果を述べる。

(1) W/O 型エマルジョンの作製

十字状の流路を持つマイクロ流体デバイスを用い、水相とオイル相を交差させることで、非常に均一な (CV 値: 1-2%) 径を有する W/O 型エマルジョンの作製に成功した。またオイル・界面活性剤溶液の組成を検討し、長時間のインキュベーションを行っても径がほとんど変動しない W/O 型エマルジョンの作出に成功した。現在、毎分 10^6 個程度の W/O エマルジョンを作製することができている。

(2) エマルジョン内での標的 GPCR に対するリガンド合成・リガンドアッセイ

まず、出芽酵母に内在性の G タンパク質共役受容体 (GPCR) である Ste2 とそのリガンド α -factor をモデル系にし、W/O 型エマルジョン内でのリガンド合成およびリガンドアッセイの条件検討を行った。 α -factor をコードする DNA を提示した磁気ビーズ、 α -factor 刺激により ZsGreen を発現する出芽酵母、再構成型無細胞タンパク質合成系とともに、グルコースを W/O 型エマルジョン内に封入したところ、蛍光を発する酵母が観察された。これに対し、 α -factor をコードする DNA を提示した磁気ビーズが存在しない場合には、蛍光性の酵母は観察できなかった (図3)。

次に、W/O 型エマルジョン内でのリガンド合成・リガンドアッセイ系が、ヒトの GPCR に対しても適用可能であるかどうかの検討を行った。ソマトスタチンをコードする DNA を提示した磁気ビーズ、ヒトソマトスタチン受容体 サブタイプ 2 (SSTR2) を発現する出芽酵母、再構成型タンパク質合成系、ジスル

フィド結合形成試薬、グルコース、および硫酸アンモニウムを W/O 型エマルジョン内に封入したところ、蛍光を発する酵母が観察された。これに対し、全く異なる配列のペプチドをコードする DNA を提示した磁気ビーズを封入した場合、ソマトスタチンをコードする DNA を提示した磁気ビーズが存在しない場合には、蛍光性の酵母は観察できなかった (図4)。またヒトソマトスタチン受容体 サブタイプ 5 (SSTR5) を発現する出芽酵母を用いても、同様の結果が得られた。

以上より、W/O 型エマルジョン内でリガンド合成およびリガンドアッセイが行えることが確認できた。

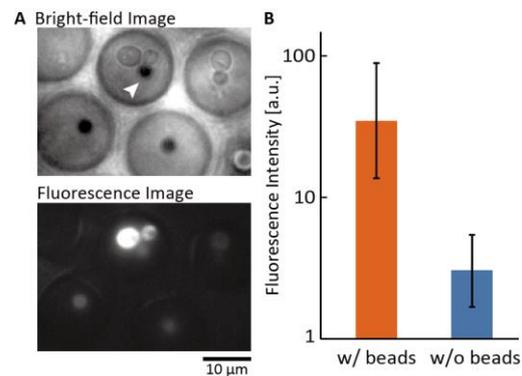


図3 W/O 型エマルジョン内での α -factor の合成およびリガンドアッセイ

(A) α -factor をコードする DNA を提示した磁気ビーズとともに、Ste2 (出芽酵母の GPCR) 発現出芽酵母を封入した W/O 型エマルジョンの明視野像 (上段) および蛍光像 (下段)。矢頭で示したのが、磁気ビーズ。(B) W/O 型エマルジョン内に出芽酵母の平均蛍光強度。オレンジのバーは、 α -factor をコードする DNA を提示した磁気ビーズとともに W/O 型エマルジョン内に封入された出芽酵母の平均蛍光強度 ($n = 56$)。青いバーは、磁気ビーズが封入されなかった W/O 型エマルジョンに存在する出芽酵母の平均蛍光強度 ($n = 62$)。エラーバーは、標準偏差。

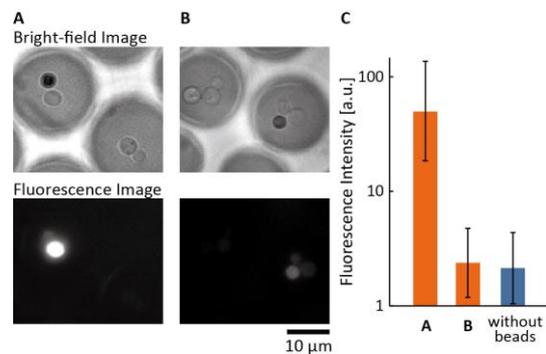


図4 W/O 型エマルジョン内でのソマトスタチンの合成およびリガンドアッセイ

(A) ソマトスタチンをコードする DNA を提示した磁気ビーズとともに、ヒト由来 SSTR2 発現出芽酵母を封入した W/O 型エマルジョンの明視野像

(上段) および蛍光像 (下段). (B) α -factor をコードする DNA を提示した磁気ビーズとともに, ヒト由来 SSTR2 発現出芽酵母を封入した W/O 型エマルジョンの明視野像 (上段) および蛍光像 (下段). (C) W/O 型エマルジョン内の出芽酵母の平均蛍光強度. A のバーは, ソマトスタチンをコードする DNA を提示した磁気ビーズとともに W/O 型エマルジョン内に封入された出芽酵母の平均蛍光強度 ($n=47$). B のバーは, α -factor をコードする DNA を提示した磁気ビーズとともに W/O 型エマルジョン内に封入された出芽酵母の平均蛍光強度 ($n=56$), 青いバーは, 磁気ビーズが封入されなかった W/O 型エマルジョンに存在する出芽酵母の平均蛍光強度 ($n=57$). エラーバーは, 標準偏差.

(3) 蛍光性の酵母を内包するエマルジョンの回収

当初計画していた, マイクロ流体デバイス上で蛍光性エマルジョンを赤外レーザーの光斥力により分離・回収することは技術的に困難であったため, 計画を変更した.

まず, 微量の溶液を吸引・吐出できるマイクロマニピュレータにガラス製のキャピラリーを装着し, マニュアルで蛍光性の酵母を内包する W/O 型エマルジョンを回収する方法を確立した.

次に, 蛍光性の酵母を内包するエマルジョンの分離・回収の自動化をすべく, 以下のような方法を確立した. まず, マイクロ流体デバイス上で, W/O 型エマルジョンから Water-in-oil-in-water (W/O/W) 型エマルジョンを生成させ, その内部の蛍光を蛍光顕微鏡にて高感度に検出し, 温度感受性ポリマーのゾル-ゲル相転移を利用して蛍光性の W/O/W 型エマルジョンを分離・回収する方法を確立した. この方法により, 90%程度の純度で蛍光性のエマルジョンを回収することに成功した. また, オンチップ・バイオテクノロジー社の On-chip Sort を利用し, 95%程度の効率・純度で蛍光性の酵母を内包する W/O 型エマルジョンを分離・回収することに成功した.

蛍光性の酵母を内包するエマルジョンの数が非常に少ない場合 (0.1%以下) はマニュアルでの回収が, 数が多い場合 (0.1%以上) は On-chip Sort を用いての回収が効率的である. リガンド創出を試みる際は, これらの回収方法を使い分けることを考えている.

(4) W/O 型エマルジョン内の DNA の回収

遠心により, 回収した W/O 型エマルジョンを破壊し, 内封された DNA を PCR により増幅, クローニング, 塩基配列の決定が行えることを実証した.

以上の要素技術を集積し, GPCR を作動させる新規のペプチドリガンドを創出するとこまでは至らなかった. しかし, これが実現できるだけの技術は確立できたと考えてい

る.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yang, Z., Iizuka, R., and Funatsu, T. “Nascent SecM chain outside the ribosome reinforces translation arrest.” *PLoS ONE* **10**(3), e0122017 (2015) (査読有) DOI: 10.1371/journal.pone.0122017
- ② T. Sakurai, R. Iizuka, R. Sekine, Y. Nakamura, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, J. Ishii, A. Kondo, S. Shoji, and T. Funatsu “PEPTIDE-BASED LIGAND SCREENING SYSTEM FOR G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS USING WATER-IN-OIL MICRODROPLETS” *Proceedings of the 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014)*, 965–967 (2014) (査読有) DOI: なし
- ③ H. Okada, A. Iguchi, R. Iizuka, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji, and T. Funatsu “SENSITIVE FLUORESCENCE-ACTIVATED SORTING OF MICRODROPLETS CONTAINING SUBCELLULAR STRUCTURES BY THERMOREVERSIBLE GELATION POLYMER” *Proceedings of the 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2014)*, 1259–1261 (2014) (査読有) DOI: なし
- ④ T. Sakurai, R. Iizuka, Y. Tanigaki, R. Sekine, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, J. Ishii, A. Kondo, N. Nemoto, S. Shoji, and T. Funatsu “YEAST-BASED LIGAND ASSAY SYSTEM FOR DETECTING G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR ACTIVATION IN WATER-IN-OIL DROPLETS” *Proceedings of the 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012)*, 1537–1539 (査読有) DOI: なし
- ⑤ Rui Sekine, Haruka Okada, Takashi Sakurai, Yoon Donghyun, Ryo Iizuka, Tetsushi Sekiguchi, Takashi Funatsu and Shuichi Shoji “SIMPLIFIED MICROFLUIDIC-BASED SYSTEM TO GENERATE DOUBLE EMULSION MICRO DROPLETS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS” *Proceedings of 1st International conference on MicroFluidic Handling Systems (MFHS2012)*, 127–130 (査読有) DOI: なし

[学会発表] (計 18 件)

- ① Takashi Sakurai, **Ryo Iizuka**, Rui Sekine, Yasuyuki Nakamura, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Shuichi Shoji, and Takashi Funatsu “Peptide-based ligand screening system for G protein-coupled receptors using water-in-oil droplets” International Workshop on Extended-nano Fluidics, Koshiba Hall, The University of Tokyo (東京都文京区), 2015 年 3 月 26-27 日 (ポスター発表)
- ② 赤木 仁, **飯塚 怜**, 藤村 祐 “使い捨てマイクロ流路チップを使ったエマルジョン (Water-in-Oil) ソーティング技術の開発” 日本薬学会第 135 年会, 神戸サンボーホール (兵庫県神戸市), 2015 年 3 月 27 日 (ポスター発表)
- ③ **飯塚 怜**, 櫻井 貴志, 中村 泰之, 石井 純, 関根 瑠威, 井口 彩香, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 藤村 祐, 赤木 仁, 近藤 昭彦, 庄子 習一, 船津 高志 “液滴を利用した G タンパク質共役型受容体作動性ペプチドリガンド創出技術の開発” 日本薬学会第 135 年会, 神戸学院大学 (兵庫県神戸市), 2015 年 3 月 26 日 (口頭発表)
- ④ T. Sakurai, **R. Iizuka**, R. Sekine, Y. Nakamura, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, J. Ishii, A. Kondo, S. Shoji, and T. Funatsu “PEPTIDE-BASED LIGAND SCREENING SYSTEM FOR G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS USING WATER-IN-OIL MICRODROPLETS” The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), Henry B. Gonzalez Convention Center (San Antonio, TX), 2014 年 10 月 28 日 (ポスター発表)
- ⑤ H. Okada, A. Iguchi, **R. Iizuka**, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji, and T. Funatsu “SENSITIVE FLUORESCENCE-ACTIVATED SORTING OF MICRODROPLETS CONTAINING SUBCELLULAR STRUCTURES BY THERMOREVERSIBLE GELATION POLYMER” The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), Henry B. Gonzalez Convention Center (San Antonio, TX), 2014 年 10 月 27 日 (ポスター発表)
- ⑥ Haruka Okada, **Ryo Iizuka**, Ayaka Iguchi, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Development of fluorescence-activated droplet sorting system using thermoreversible gelation polymer and its application” 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2014 年 9 月 27 日 (ポスター発表)
- ⑦ Takashi Sakurai, **Ryo Iizuka**, Yasuyuki Nakamura, Jun Ishii, Rui Sekine, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Akihiko Kondo, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Peptide-based ligand screening system for G protein-coupled receptors (GPCRs) using water-in-oil microdroplets” 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2014 年 9 月 26 日 (ポスター発表)
- ⑧ Zhuohao Yang, **Ryo Iizuka**, Takashi Funatsu “N-terminal region of SecM is essential for its stable translation arrest” 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2014 年 9 月 25 日 (ポスター発表)
- ⑨ Takashi Sakurai, **Ryo Iizuka**, Rui Sekine, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Yeast-based fluorescence assay system for detecting human G protein-coupled receptor activation in water-in-oil droplets” 第 51 回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館 (京都府京都市), 2013 年 10 月 28 日 (ポスター発表)
- ⑩ Haruka Okada, **Ryo Iizuka**, Rui Sekine, Dong H. Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Simple and Efficient Approach for Proteomic Analysis of Subcellular Structures using Droplet-Based Microfluidics” 第 51 回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館 (京都府京都市), 2013 年 10 月 28 日 (ポスター発表)
- ⑪ Takashi Sakurai, **Ryo Iizuka**, Yasuyuki Tanigaki, Rui Sekine, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Naoto Nemoto, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Yeast-based fluorescence assay system for detecting G protein-coupled receptor activation in water-in-oil droplets” 8th Asian Biophysics Association Symposium, Ramada Plaza Jeju Hotel (Jeju, Korea), 2013 年 5 月 28 日 (ポスター発表)
- ⑫ **飯塚 怜**, 櫻井 貴志, 谷垣 保幸, 関根 瑠威, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 石井 純, 中村 泰之, 近藤 昭彦, 根本 直人, 庄子 習一, 船津 高志 “微小液滴を利用した GPCR リガンドアッセイシステムの開発” 第 10 回 GPCR 研究会, 日本科学未来館 みらい CAN ホール (東京都江東区), 2013 年 5 月 10 日 (ポスター発表)
- ⑬ **Ryo Iizuka**, Takashi Sakurai, Yasuyuki Tanigaki, Rui Sekine, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Naoto Nemoto, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Yeast-based ligand assay system to detect G protein-coupled receptor activation in water-in-oil droplets” 細胞ア

ッセイ技術の現状と将来 (Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay), 東京大学弥生講堂一条ホール (東京都文京区), 2012年12月10日 (ポスター発表)

- ⑭ Takashi Sakurai, **Ryo Iizuka**, Yasuyuki Tanigaki, Rui Sekine, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Naoto Nemoto, Shuichi Shoji and Takashi Funatsu “YEAST-BASED LIGAND ASSAY SYSTEM FOR DETECTING G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR ACTIVATION IN WATER-IN-OIL DROPLETS” The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012), Okinawa Convention Center (沖縄県宜野湾市), 2012年10月31日 (ポスター発表)
- ⑮ Rui Sekine, Haruka Okada, Takashi Sakurai, Yoon Donghyun, **Ryo Iizuka**, Tetsushi Sekiguchi, Takashi Funatsu and Shuichi Shoji “SIMPLIFIED MICROFLUIDIC-BASED SYSTEM TO GENERATE DOUBLE EMULSION MICRO DROPLETS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS” 1st International conference on Microfluidic Handling Systems (MFHS2012), Holland Casino Enschede (Enschede, the Netherlands), 2012年10月11日 (ポスター発表)
- ⑯ **Ryo Iizuka** “Yeast-based ligand assay system to detect G protein-coupled receptor activation in water-in-oil droplets” 海洋・極限環境生物圏領域 海洋生物多様性研究プログラムセミナー, 海洋開発研究機構 (神奈川県横須賀市), 2012年9月25日 (口頭発表)
- ⑰ Takashi Sakurai, **Ryo Iizuka**, Yasuyuki Tanigaki, Rui Sekine, Dong H. Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Naoto Nemoto, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Yeast-based ligand assay system for detecting G protein-coupled receptor activation in water-in-oil droplets” 第50回日本生物物理学会年会, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県名古屋市), 2012年9月22日 (ポスター発表)
- ⑱ 櫻井 貴志, **飯塚 怜**, 谷垣 保幸, 関根 瑠威, Dong Hyun Yoon, 関口 哲志, 石井 純, 近藤 昭彦, 根本 直人, 庄子 習一, 船津 高志 “Yeast-based ligand assay system for detecting G protein-coupled receptor activation in water-in-oil droplets” 第12回東京大学生命科学シンポジウム, 東京大学本郷キャンパス (東京都文京区), 2012年6月30日 (ポスター発表)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)
[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 怜 (IIZUKA, Ryo)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号: 90541954

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし